

ББК 52.5

Ф 50

УДК 612.17+616.12-092

Издание рекомендовано для перевода
проф. БЕЛЕНКОВЫМ Ю. Н., директор ВРНЦ АМН СССР

Физиология и патофизиология сердца: Пер. с англ./Под
Ф 50 ред. Н. Сперелакиса: В 2 т. Т. 1. — М.: Медицина, 1988,
624 с.: ил. — ISBN 5—225—00226—9

Монография посвящена фундаментальным вопросам функциональной кардиологии. В 1 томе освещены физиологические и биофизические аспекты сердца, его ультраструктура, биохимия и фармакология. Сделана попытка интегрировать прикладные вопросы по факторам, влияющим на функцию сердца. Представлены современные концепции и гипотезы развития некоторых патологических процессов в сердце. Показан механизм действия большого числа кардиоактивных средств, в том числе антагонистов кальция, антиангинальных и антиаритмических препаратов, сердечных гликозидов и др.

Для кардиологов, физиологов и патофизиологов.

Ф $\frac{410600000-315}{039(01)-88}$ 87—88

ББК 52.5

ISBN 5—225—00226—9

© by Martinus Nijhoff Publishing,
Boston, 1984

© Перевод на русский язык. Издательство
«Медицина», Москва, 1988

ОГЛАВЛЕНИЕ

Авторский коллектив	7
Предисловие к русскому изданию	10
Предисловие	13
Предисловие издателя	14
Глава 1. Ультраструктура миокарда млекопитающих. <i>М. С. Форбс, Н. Сперелакис (M. S. Forbes, K. Sperelakis)</i>	15
Глава 2. Основные патологические процессы в миокарде. Связь с кардиомиопатиями. <i>Л. М. Вуйа (L. M. Vuja)</i>	67
Глава 3. Электрические характеристики клеток в покое и под- держание распределения ионов. <i>Н. Сперелакис (N. Sperela- kis)</i>	90
Глава 4. Ионные основы электрической активности сердца. <i>Р. С. Касс (R. S. Kass)</i>	128
Глава 5. Электрогенез пейсмекерного потенциала в атрио- вентрикулярном узле. <i>Х. Ирисава, А. Нома, С. Кокубин, Ю. Курачи (H. Irisawa, A. Noma, S. Kokubin, Y. Kurachi)</i>	150
Глава 6. Кабельные свойства и проведение потенциала дей- ствия. Возбудимость, источники и стоки. <i>М. Ф. Арнсдорф (M. F. Arnsdorf)</i>	166
Глава 7. Электрокардиограмма и ее связь с возбуждением сердца. <i>Р. К. Барр (R. C. Barr)</i>	214
Глава 8. Медленный потенциал действия и свойства медлен- ных каналов миокардиальных клеток. <i>Н. Сперелакис (N. Spe- relakis)</i>	241
Глава 9. Электромеханическое сопряжение. Связь медленно- го входящего тока с сокращением. <i>Т. Ф. Мак Дональд (T. F. McDonald)</i>	278
Глава 10. Роль Na^+ — Ca^{2+} -обмена в клетках ткани сердечной мышцы. <i>Л. Дж. Маллинс (L. J. Mullins)</i>	296

Глава 11. Методы регистрации освобождения кальция из саркоплазматического ретикулума скринированных миокардиальных клеток и соотношение между трансмембранным движением кальция и его освобождением. <i>А. Фабиато, К. М. Баумгартен (A. Fabiato, C. M. Baumgarten)</i>	323
Глава 12. Поглощение кальция саркоплазматическим ретикулумом, его регуляция и функциональное значение. <i>М. Тада, М. Шигекава, Й. Нимура (M. Tada, M. Shigekawa, Y. Nimura)</i>	380
Глава 13. Активные и пассивные механические свойства миокарда. <i>А. Дж. Брэди (A. J. Brady)</i>	416
Глава 14. Фармакологическое действие сердечных гликозидов. <i>Т. М. Броди, Т. Акера (T. M. Brady, T. Akera)</i>	450
Глава 15. Характеристики и механизм действия кальциевых антагонистов и других антиангинальных препаратов. <i>А. Флекенштейн, Г. Флекенштейн-Грюн (A. Fleckenstein, G. Fleckenstein-Grün)</i>	475
Глава 16. Клеточная электрофизиология и ишемия. <i>Р. Лаззара, В. Дж. Шерлаг (R. Lazzara, V. J. Scherlag)</i>	503
Глава 17. Механизм действия антиаритмических препаратов. <i>Л. М. Хондеггем, Б. Г. Катцунг (G. M. Hondeghem, B. G. Katzung)</i>	528
Глава 18. Кальций и повреждение кардиомиоцитов. <i>В. Г. Нейлер, М. Дж. Дейли (W. G. Nayler, M. J. Daly)</i>	555
Глава 19. Связь между клетками и заживление миокарда. <i>В. К. Де Мелло (W. C. De Mello)</i>	579
Глава 20. Действие кардиотоксинов на ионные каналы мембраны. <i>М. Лаздунский, Дж. Ф. Рено (M. Lazdunski, J. F. Renaud)</i>	593
Предметный указатель	617

АВТОРСКИЙ КОЛЛЕКТИВ

Dr. Tai Akera
Department of Pharmacology
and Toxicology
Life Sciences Building
Michigan State University
East Lansing, MI 48824 USA
Chicago, IL 60611 USA

Dr. Morton F. Arnsdorf
Department of Medicine
School of Medicine
University of Chicago
Chicago, IL 60637 USA

Dr. Roger C. Barr
Department of Biomedical
Engineering
Duke University School
of Medicine
Durham, NC 27706 USA

Dr. Arthur L. Bassett
Department of Pharmacology
Northwestern University Medical
School
Chicago, IL 60611 USA

Dr. Clive Marc Baumgarten
Department of Physiology
Medical College of Virginia
Box 551
Richmond, VA, 23298 USA

Dr. Richard J. Bing
Huntington Memorial Hospital
100 Congress Street
Pasadena, CA 91105 USA
Dallas, TX 75235 USA

Dr. Allan J. Brady
Medical Center
University of California
Los Angeles, CA 90024 USA

Prof. Hans Jürgen Bretschneider
Institute of Physiology
University of Göttingen
D-3400 Göttingen
West Germany

Dr. Theodore M. Brody
Department of Pharmacology
and Toxicology
Life Sciences Building
Michigan State University
East Lansing, MI 48824 USA

Dr. L. Maximilian Buja
Department of Pathology
School of Medicine
University of Texas
5232 Harry Hines Boulevard

Dallas, TX 75235 USA
Prof. R. Casteels
Laboratorium voor Fysiologie
K. U. L. Campus Gasthuisberg
Herestraat
B-300 Leuven, Belgium

Dr. M. J. Daly
Department of Medicine
University of Melbourne
Austin Hospital
Heidelberg
Victoria, Australia

Prof. Walmor C. De Mello
Department of Pharmacology
Medical Sciences Campus
University of Puerto Rico
GPO Box 5067
San Juan, Puerto Rico 00936

Dr. Donald F. DeWitt
Department of Physiology
School of Medicine
Michigan State University
East Lansing, MI 48824 USA

Dr. Steven R. Driska
Physiology Department, Box 551
Medical College of Virginia
Virginia Commonwealth University
MCV Station
Richmond, VA 23298 USA

Dr. G. Droogmans
Laboratorium voor Fysiologie
K. U. L. Campus Gasthuisberg
Herestraat
B-300 Leuven, Belgium

Dr. Alexandre Fabiato
Department of Physiology
Medical College of Virginia
Box 551
Richmond, VA 23298 USA

Dr. Victor J. Ferrans
Pathology Branch
National Heart, Lung, and Blood
Institute

ПРЕДИСЛОВИЕ ИЗДАТЕЛЯ

Темой монографии является физиология и функции сердца в норме и при различных патологиях. Книга состоит из двух основных разделов: I — миокард и составляющие его ткани, например, системы узловых клеток и волокон Пуркинью; II — коронарное кровообращение, включая свойства гладкомышечных клеток сосудов. В книге рассмотрены не только основные физиологические и биофизические механизмы, но также ультраструктура, биохимия и фармакология. Таким образом, сделана попытка связать воедино все важнейшие факторы, влияющие на функцию сердца, этого жизненно важного органа, в норме и патологии. В книге также предпринята попытка дать читателю основные представления о механизме действия на миокард различных кардиоактивных препаратов, включая кальциевые антагонисты, антиангинальные препараты, антиаритмические препараты и сердечные гликозиды.

Каждая глава написана одним или несколькими крупными специалистами в данной области. Авторы просили дать ясное, краткое, точное, современное изложение вопроса в стиле учебника. Предполагалось, что авторы приводят лишь самые основные ссылки, уделяя основное внимание работам, суммирующим результаты исследований в виде обзоров. Читатели могут в каждой главе найти наиболее важные факты, концепции и гипотезы по рассматриваемым вопросам, а если они захотят изучить вопрос глубже и более полно ознакомиться с результатами, полученными в интересующей его области, то могут обратиться к рекомендуемым литературным источникам.

Книга предназначена для практических врачей-кардиологов, клиницистов-исследователей, специалистов в родственных областях медицины и исследователей-физиологов. Она может оказаться полезной для ординаторов, аспирантов и студентов медицинских институтов в качестве дополнительного пособия, развивающего и углубляющего их знания по специальным вопросам, затронутым в лекциях или в более общих руководствах. Авторам заранее сообщили, для кого предназначается эта книга, и они обязались написать свои главы на соответствующем уровне. Предполагалось, что подробность изложения материала, количество приводимых экспериментальных данных и рисунков соответствует требованиям читателей, для которых предназначена эта книга. Клиницисты, несомненно, осознают важное значение результатов фундаментальных исследований сердца, лежащих в основе их практической работы, и данная монография должна послужить мостом между фундаментальной наукой и клинической практикой.

Я надеюсь, читатель по достоинству оценит все преимущества монографии и согласится со мной в том, что эта действительно ясная, краткая, современная книга охватывает практически все области изучения сердца.

Nicholas Sperelakis

Глава 1

УЛЬТРАСТРУКТУРА МИОКАРДА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

М. С. ФОРБС, Н. СПЕРЕЛАКИС (M. S. FORBES, N. SPERELAKIS)

ВВЕДЕНИЕ

Мышечные клетки сердца млекопитающих являются хорошо организованными системами. Интересно, что в большинстве случаев наблюдения проводятся на клетках, которые имеют тот же возраст, что и само животное, так как очень небольшое количество данных свидетельствует о возможности регенерации клеток сердца высших позвоночных (см. «Ядро»). Несмотря на такой возраст, эти клетки прекрасно адаптируются к различным условиям, требующим, например, осмотического равновесия или гипертрофии, а количество сарколеммальных и плазматических компонентов изменяется при этом так, что постоянство отношения площади поверхности к объему поддерживается с высокой степенью точности [1, 2]. В этой главе мы представим краткий обзор данных относительно тонкой структуры кардиоцитов сердца млекопитающих. Мы приводим множество электронно-микроскопических фотографий этих клеток для того, чтобы указать на трудности обобщения при рассмотрении различных аспектов ультраструктуры миокарда. Тем не менее мы укажем основные наиболее характерные черты миокардиальных клеток и попутно укажем на некоторые изменения установившихся представлений, выявленные к настоящему времени.

Миокардиальные клетки обычно классифицируются либо исходя из их положения в сердце (т. е. предсердные или желудочковые), либо в соответствии с их основной функцией (сократительные) или проводящие]. В данном обзоре мы в основном используем вторую из этих классификаций. «Рабочие» кардиоциты — это клетки, выполняющие основную часть механической работы сердца, в то время как клетки предсердно-желудочковой проводящей системы (ПЖПС) ответственны за генерацию и распространение потенциалов действия по миокарду, т. е. определяют частоту сокращений сердца и продолжительность его возбуждения. В зависимости от вида животного, различия между клетками рабочего миокарда и клетками ПЖПС могут быть как существенными, так и незначительными.

Общее описание ультраструктуры сердца дано в ряде обзорных работ [3—5], а кроме того, опубликовано множество специализированных сборников, посвященных одному или нескольким



Рис. 1.1. Общий вид тонкого среза миокарда цилиндрической мышцы правого желудочка сердца южноафриканской мартышки (*Cercopithecus aethiops*). Характерным признаком этих типичных миокардиальных клеток является продольное расположение всех основных оргanelл, включая миофибриллы (Мф), часто имеющие разветвленную форму, митохондрии (Мх), преимущественно образующие цепочки в пространстве между пучками миофибрилл, и ядра (Я), одно из которых находится в поле зрения. Вблизи каждого полюса ядра расположены участки миоплазмы, богатые митохондриями. В такой «миоплазме полюса ядра» часто выявляются частицы липофуцина (Лф). На концах клеток выявляется множество межмембранных контактов разного типа, образующих вставочные диски (ВД). Микрофотографий в проходящем электронном пучке.

ким клеточным компонентам, особенно мембранным системам [6—8]. Цель предлагаемого нами краткого обзора состоит в том, чтобы читатель смог представить себе общую картину ультраструктуры миокарда, что позволило бы эффективнее сравнивать результаты, полученные в разных электроно-микроскопических исследованиях, независимо от того, проводится они на нормальной или патологически измененной ткани. Кроме того, эта глава может до некоторой степени служить анатомическим фундаментом для остальных разделов книги. В связи с понятным интересом к структуре и функции сердца человека основная масса приводимых в этой главе сведений получена при исследовании кардиомиоцитов обезьяны как наиболее близкородственного вида; однако использование миокарда животного дает преимущество относительной доступности миокардиальных препаратов и отсутствия этических запретов на проведение оптимальной фиксации клеток путем перфузии фиксатора через кровеносные сосуды.

КРАТКИЙ ОБЗОР УЛЬТРАСТРУКТУРЫ МИОКАРДИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

В данном разделе описаны только самые общие черты, выявляемые в кардиомиоцитах млекопитающих при микроскопическом исследовании; детали и особенности структуры реальных клеток рассматриваются более полно в разделах «Клетки рабочего (сократительного) миокарда» и «Кардиомиоциты проводящей системы сердца».

Клетки рабочего миокарда желудочков

16408
Б
Сократительные кардиомиоциты стенок желудочков, папиллярных мышц и межжелудочковой перегородки представляют собой вытянутые, плотно упакованные клетки, которые сгруппированы в мышечные волокна, или тяжи. В этих клетках явно заметно продольное расположение большинства внутриклеточных компонентов, включая миофибриллы, митохондрии и ядра (рис. 1,1; 1,2). Близко расположенные части клеток — в основном их торцевые части — имеют множество соединений, образующих вместе вставочные диски, т. е. обширные области адгезии клеток, легко выявляемые при световой микроскопии [9, 10]. Миофибриллы — пучки нитей сократительных белков — являются основными внутриклеточными органеллами, несколько реже встречаются митохондрии, расположенные правильными рядами в межмиофибрилярном пространстве и образующие беспорядочные скопления в субсарколеммальном и околоядерном пространстве. Миокардиальные клетки желудка часто имеют два и более ядер. В кардиомиоцитах желудочков хорошо развиты две основные мембранные системы: а — поперечные (1) и продольные тубулы, образующие вместе с саркоплазматическим ретикулумом тубулярную систему (ПТС); б — саркоплазматическая система (2). Она образует

Академия наук СССР
Институт физиологии
Иркутского университета
Иркутск



Рис. 1.2. Миокардиальная клетка желудочка, изолированная из сердца крысы методом ферментативной обработки с последующей механической дисперсией [13]. Ясно видны продольно расположенные миофибриллы с четко определенной структурой полос саркомеров (сравните с рис. 1.1). Неправильная форма концов клеток обусловлена разной длиной миофибрилл в клетке. Световая микрофотография с фазовым контрастом.

ют правильные структуры, по-видимому, связанные с сегментацией миофибрилл на саркомеры. Клетки рабочего миокарда желудочков имеют большую толщину и объем по сравнению с клетками предсердий.

Клетки рабочего миокарда предсердий

Сократительные клетки предсердий по своим характеристикам напоминают клетки рабочего миокарда желудочков, но они имеют существенно меньший диаметр (см. рис. 1.5; 1.36) и часто лишены системы Т-тубул. Упаковка миоцитов в стенках предсердий и в трабекулах менее плотная, чем в миокарде желудочков. Вставочные диски развиты хуже, и в основном они представляют собой простую адгезию внешних поверхностей клеточных мембран (см. рис. 1.5; 1.36). Отличительным признаком предсердных кардиомиоцитов является наличие специфических предсердных гранул (см. рис. 1.36; 1.38) — сферических частиц с плотным ядром, обнаруживаемых в цитоплазме вблизи полюса ядра, между миофибриллами и в субсарколеммальной области.

Клетки проводящей системы

При сравнении характеристик клеток ПЖПС животных разных видов наблюдаются существенные вариации признаков, что будет подробно рассмотрено в разделе «Клетки проводящей системы миокарда». Достаточно сказать, что узловое клетки, т. е. клетки синоатриального (СА) и атриовентрикулярного (АВ) узлов, имеют малые размеры и для них характерно наличие множества взаимопереплетающихся выростов, которые объединяют

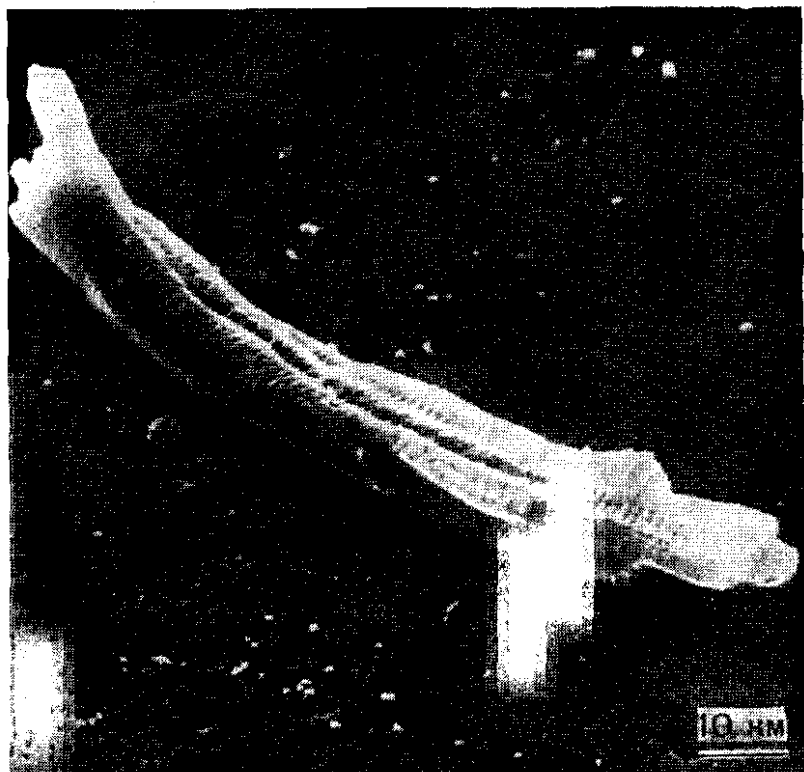


Рис. 1.3. Электронная микрофотография изолированного кардиомицита желудочка сердца крысы, полученная на сканирующем микроскопе. Видна неправильная форма концов клеток, соответствующая ступенчатой форме вставочных дисков, выявляемой на тонких срезах (см. рис. 1.1, 1.27). Поперечная исчерченность, определенная на всей боковой поверхности, по-видимому, соответствует «Z-гребням». Эта исчерченность, вероятно, усилена вследствие сморщивания сарколеммы над областью Z-дисков субсарколеммальных миофибрилл. Кривизна этой клетки позволяет предположить, что исходно она находилась в стенке желудочка.

клетки в типичные для предсердий группы (рис. 1.6). Однако довольно трудно отличить узловые клетки от окружающих предсердных клеток, основываясь лишь на наличии в первых множества специфических гранул, а во вторых — частых чередований Z-дисков. Так называемые проводящие кардиомициты, которые в основном образуют субэндокардиальную проводящую систему на внутренней поверхности желудочков, в сердце многих млекопитающих представляют собой тонкие клетки с плохо развитыми вставочными дисками, содержащие довольно большое количество миофибриллярного материала. Однако иногда можно обнаружить и бедные миофибриллами клетки, а у млекопитающих, относящихся к копытным, проводящие сердечные миоциты имеют



Рис. 1.4. Папиллярная мышца правого желудочка сердца макаки резуса. Поперечное сечение, позволяющее видеть исключительное многообразие строения миокардиальных клеток желудочка. Очертания кардиомиоцитов искривлены, что позволяет им охватывать многочисленные кровеносные сосуды. На данной микрофотографии ядра расположены приблизительно в центре клеток. На срезе виден участок вставочного диска (ВД) значительного размера. Микрофотография в проходящем электронном пучке.

исключительно большие размеры и заполнены большим количеством гликогена и промежуточных филаментов [11, 12]. Общеизвестно, что в клетках ПЖПС отсутствует Т-тубулярная система, хотя иногда в них выявляются полиморфные инвагинации сарколеммы (см. «Узловые клетки»).

КЛЕТКИ РАБОЧЕГО (СОКРАТИТЕЛЬНОГО) МИОКАРДА

Форма и размер клеток

При изучении силуэтов миокардиальных клеток на различных срезах, используемых для светового или электронного микроскопа, не всегда удается определить общий вид клеток (см. рис. 1.1). Еще большая неопределенность вносится наличием в сердце млекопитающих нескольких совершенно различных типов кардиомиоцитов. К настоящему времени основная часть исследований выполнена на клетках рабочего миокарда желудочков, классической форме кардиомиоцитов. Для этого чаще всего использовались одиночные изолированные интактные клетки, исследованные при помощи различных микроскопических методов (световая микроскопия, сканирующая электронная микроскопия и микроскопия в проходящем электронном луче) [13—15]. Форма «типичного» кардиомиоцита в основном отражает его внутреннее устройство, т. е. клетки выглядят как пучкообразные скопления миофибрилл, окруженные внешней оболочкой (сарколеммой). Покрытые сарколеммой миофибриллы могут иметь разную длину, поэтому часто концы клеток бывают зигзагообразной формы, что является причиной образования ступенчатых профилей вставочных дисков (см. «Межмембранные контакты» и рис. 1.1; 1.3). Форма кардиомиоцита *in situ* до некоторой степени определяется также и его окружением, в частности, очертания клеток желудочков отражают контуры многочисленных кровеносных сосудов сердца (рис. 1.6). Следует отметить, что форма клеток желудочков не соответствует простому цилиндру, как до сих пор описывалось в гистологической литературе, в действительности они могут иметь уплощенную или лентообразную форму, а также существенные ветвления [16, 17]. Для воспроизведения формы клеток сердца все больше используются компьютерные методы обработки изображения [18, 19]; недавно этот метод был успешно применен для описания формы как предсердных клеток, так и клеток АВ-узла [18].

Длина «среднего» кардиомиоцита млекопитающих обычно считается равной 100 мкм, а диаметр составляет около 15—20 мкм. Однако, например, клетки ткани желудочков сердца хорька имеют уплощенную форму, а наибольший и наименьший «диаметры» клеток равны 26,8 мкм и 8,3 мкм соответственно [17]. И хотя невозможно утверждать со всей определенностью, что одиночные изолированные кардиомиоциты сохраняют свою естественную форму после того, как они выделены из ткани, большая часть



Рис. 1.5. Микрофотография в проходящем электронном пучке. Трабекула левого предсердия макаки резуса. Клетки в ткани расположены свободно. Размер клеток сильно варьирует, но в общем они значительно меньше, чем клетки желудочков (сравните с рис. 1.4). Прикрепления предсердных клеток друг к другу преимущественно сводятся просто к тесному прилеганию внешних сторон мембран клеток на некотором ограниченном участке (показано стрелками).

современных данных о размерах клеток получена на препаратах одиночных изолированных кардиомиоцитов (см. рис. 1.2; 1.3). Результаты, полученные разными авторами для аналогичных препаратов, могут существенно отличаться. Nag и соавт. [20] для изолированных кардиомиоцитов желудочков сердца крысы привели следующие цифры: 80 мкм в длину и 12 мкм в диаметре. Bischof, Drummond [21] зарегистрировали средние величины — 94 и 18 мкм соответственно, но при этом отметили, что в миокарде желудочков сердца взрослой крысы существуют клетки двух явно различных типов: одноядерные и двуядерные. Последние составляют 85% всех кардиомиоцитов, причем каждая имеет двойной объем по сравнению с типичной одноядерной клеткой, будучи на треть длиннее и на одну пятую шире. Полиплоидия действительно очень часто выявляется в кардиомиоцитах желудочков (см. «Ядро») и, по-видимому, является причиной образования различных популяций (по размеру) клеток млекопитающих некоторых видов.



Рис. 1.6. Синоатриальный (СА) узел, выделенный из сердца макаки резуса. Такие небольшие клетки характерным образом объединяются вместе, образуя группы, связанные взаимопереплетением выростов сложной формы (см. рис. 1.39).

Фибриллярные компоненты

Миофибриллы и миофибриллоподобные массы. Основная часть клетки в тонической, «быстрой» скелетной мышце заполнена отдельными пучками белковых волокон (миофибрилл). Так как при исследовании структуры миокарда в основном использовали терминологию, разработанную при изучении скелетных мышц, термин «миофибриллы» был автоматически перенесен на структуры, образованные сократительным материалом в клетках сердца (рис. 1.7). В поперечном сечении кардиомиоцита расположено небольшое количество миофибрилл, характерных для миокарда, а образующие правильные структуры, небольшие по диаметру миофибриллы, характерные для скелетных мышц, формируют более массивные образования, которые частично или полностью окружают находящиеся рядом митохондрии (рис. 1.8). Поэтому MacNutt и Fawcett [4] предложили термин «миофибриллоподобная масса», который, по их мнению, наиболее подходит для описания пучков миокардиальных миофибрилл. В этом отношении кардиомиоциты крупных млекопитающих напоминают фазические или «медленные» тонические клетки скелетных мышц, миофибриллы которых образуют самые разнообразные переплетения, в отличие от волокнистого строения типичных быстро сокращающихся мышц, как портняжная мышца лягушки. Кроме того, миофибриллы, образующие волокнистые структуры, можно обнаружить в мышце сердца, имеющего небольшие размеры и сокращающегося с высокой частотой, как, например, сердце мыши или землеройки (такой

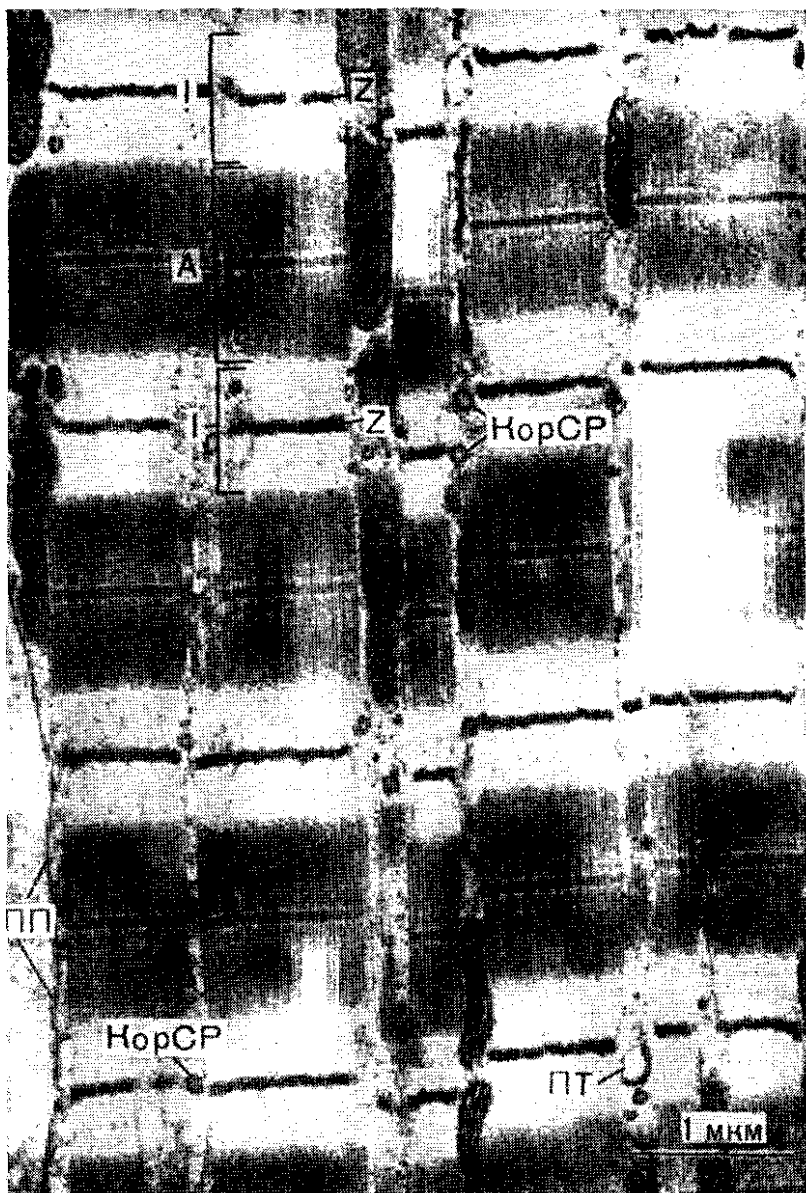


Рис. 1.7. Папиллярная мышца правого желудочка сердца макаки резуса. На этом продольном срезе клетки четко наблюдается классическая картина поперечной исчерченности расслабленных миофибрилл. Каждый саркомер ограничен Z-полосами (Z) и состоит из двух «половинок» I-полос (целая I-полоса обозначена буквой I) и непрозрачной A-полосы (A), которая занимает большую часть длины саркомера. В центре саркомера находится «псевдо-N-зона» (НСН), состоящая из M-полосы и L-линии, которая более подробно показана на рис. 1.11. Известно, что ряд структур преимущест-

тии расположения миофибрилл, по-видимому, позволяет существенно увеличить площадь поверхности, на которой может формироваться тубулярная система саркоплазматического ретикулула) (см. рис. 1.22). Однако до сих пор большинство исследователей предпочитают придерживаться термина «миофибриллы» для обозначения всех внутриклеточных структур, состоящих из актина, миозина и α -актинина (вместе с различными сопутствующими белками типа тропомиозина и пр.).

Для сердечных миофибрилл характерна картина продольного расположения и поперечной исчерченности (см. рис. 1.1; 1.7; 1.19). Детали этой картины практически одинаковы для тканей сердца всех обследованных млекопитающих, которые состоят из I-полос, А-полос и Z-полос (или Z-линий, Z-дисков). Эти обозначения соответствуют терминам, сформулированным при изучении мышцы с помощью поляризованного света (I — изотропный, А — анизотропный) и в исследованиях Немецкой школы гистологии (Z, Zwischenscheibe — «разделительная линия»; H, Helle Zone — «светлая зона»; M, Mittellinie — «средняя линия»). Классической единицей продольного деления каждой миофибриллы является саркомер, который содержит две половинки I-полосы и одну А-полосу (см. рис. 1.7). Строго говоря, каждый саркомер включает в себя также две половины рассеченных поперек Z-полос, однако с практической точки зрения более удобно считать саркомером область, ограниченную соседними Z-полосами. Строение сердечных миофибрилл активно исследовалось [4], но мелкие детали структуры, особенно архитектура Z-полос и «псевдо-H-зон» в середине саркомера, все еще неясны.

В поперечном сечении Z-полосы сердечных миофибрилл образуют ряд структур, каждая из которых характеризуется описательным термином: «плетеная корзина», «большой квадрат» и «малый квадрат». Комбинацию этих структур можно наблюдать в одном и том же сечении на уровне Z-полосы (см. рис. 1.8; 1.9). Различия внешнего вида могут зависеть, например, от скручивания плоскости сечения (см. рис. 1.9) и уровня, на котором рассечена Z-полоса [22, 23]. Определенную роль в образовании конкретной структуры Z-полосы мышцы может также играть используемый способ фиксации [24]. Система, содержащая как большие

венно располагается на уровне Z-полос миофибрилл [28]. К ним относятся поперечные тубулы (ПТ) и сферидальные расширения саркоплазматического ретикулула (корбулярный СР, или КорСР), которые на данном снимке наблюдаются как отдельные профили (сравните с рис. 1.19; 1.26). Расположение центрального (на снимке) пучка миофибрилл не совпадает с расположением остальных миофибрилл, что часто наблюдается в миокардиальных клетках (см. рис. 1.1; 1.8 1.19). Слева на фотографии видна клеточная поверхность (сарколема), на которой с внешней стороны располагается покрытие: ПП. Электронопрозрачные структуры вблизи поверхностного покрытия образованы отрицательно окрашенными волокнами коллагена. Электронная микрофотография.

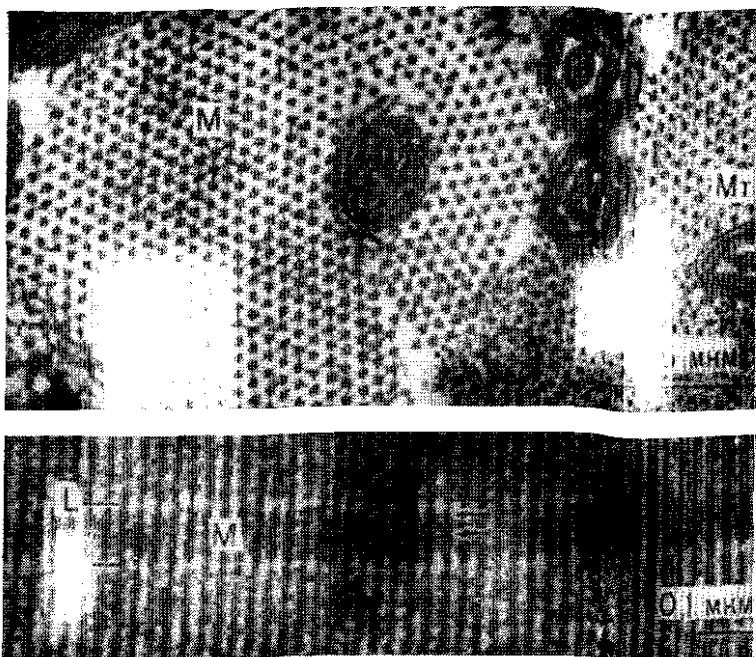


Рис. 1.10. Фрагмент рис. 1.8. Плоскость сечения проходит через А-полосу миофибрилл. Справа внизу видно типичное расположение нити миозина, окруженной шестью нитями актина (в кружке), т. е. эта область располагается с одной стороны от среднего уровня саркомера. Слева выявляется внутренняя структура «псевдо-Н-зоны». На краю миофибрилл видны оголенные, имеющие грубо треугольную форму нити миозина, проходящие на уровне L-линии (L), ближе к центру пучка — большое количество поперечных мостиков между нитями миозина, указывающие на то, что в этом участке срез проходит через М-полосу (M) (сравните с рис. 1.11). Обратите внимание на кристы митохондрий, имеющие форму зубцов, и поперечно рассеченные микротрубочки (Mt), расположенные в межмиофибрилярном пространстве.

Рис. 1.11. Продольный срез «псевдо-Н-зоны» миофибрилл миокардиальной клетки. L-линии образованы короткими толстыми выступами нитей миозина, в то время как для участков миозиновых питей в широкой центральной М-полосе (M) характерны тонкие поперечные мостики (показаны стрелками).

крысы поперечные мостики в М-полосах образуются только после рождения [25]. В миокарде морской свинки, который бывает практически полностью развит к моменту рождения [26, 27], М-полосы выявляются уже к 8-й неделе внутриутробного развития (неопубликованные данные).

Характерная длина саркомера клеток желудочков сердца млекопитающих в покое равна примерно 2,2 мкм. Приблизительные величины размеров различных сегментов саркомера составляют: Z-полоса 80—160 нм; I-полоса (каждая половина)

0,35 мкм; А-полоса 1,45—1,65 мкм; М-полоса 70—90 нм; L-линия 10—20 нм. Вклад каждого актинового волокна в длину отдельного саркомера составляет 1,25 мкм и меньше (большая часть актиновых волокон плохо видна в расслабленном саркомере, так как они перекрываются миеозиновыми волокнами в А-полосе). Все еще остается неясным, пересекают ли актиновые волокна Z-полосу, образуют переход (или сливаются) с другими более толстыми волоконными сегментами или же каким-либо образом закапчиваются внутри решетки Z-полосы [5].

Саркомеры соседних миофибрилл в миокарде редко точно прилегают друг к другу (см. рис. 1.1; 1.7; 1.36), и поэтому можно получить тонкие поперечные срезы клеток, которые содержат примеры всех основных сегментов саркомера (см. рис. 1.8). Неправильное прилегание миофибрилл связано с неровными контурами вставочных дисков на концах кардиомиоцитов (см. рис. 1.1; 1.27; 1.37). Если предположить, что точка вхождения саркомера во вставочный диск находится на уровне, на котором должна быть сформирована Z-полоса (см. рис. 1.1; 1.27), и учитывать разную длину извилистых вставочных дисков, то это естественно обуславливает сдвиг расположения соседних миофибрилл (хотя, несомненно, некоторый вклад вносит разная длина отдельных миофибрилл).

Начало образования миофибрилл во время эмбрионального развития влияет, как оказалось, на образование сегментированной части саркоплазматического ретикулума, а также на ориентацию поперечно расположенных компонентов продольно-поперечной тубулярной системы (ППТС) (см. «Продольно-поперечная тубулярная система»). Расположение Z-полос саркомера, по-видимому, определяет расположение некоторых компонентов кардиомиоцитов, к которым относятся Т-тубулы, концевые цистерны СР, «Z-тубулы» СР и промежуточные волокна. Эти структуры преимущественно располагаются в клетке так, как будто они направлены параллельно Z-полосам (рис. 1.12; 1.13; см. рис. 1.20—1.22; 1.26). Несмотря на такую ориентацию большинства внутриклеточных структур, имеется ряд исключений. Например, митохондрии (см. рис. 1.1; 1.7; 1.17) редко выявляются в «миоплазме на Z-уровне» [28].

Микротрубочки. Микротрубочки в большинстве клеток являются основным элементом цитоскелета. В высокоорганизованных кардиомиоцитах система миофибрилл, элементы которой плотно упакованы, ориентированы преимущественно в продольном направлении и надежно закреплены в веществе вставочных дисков, по-видимому, в наименьшей степени нуждается в организованном внутриклеточном каркасе. Несмотря на этот довольно логичный вывод, было неоднократно продемонстрировано наличие в клетках сердца большого количества микротрубочек [8, 29, 30]. Микротрубочки в сердце, проходя преимущественно вдоль продольной оси клетки, сильнее концентрируются вокруг ядра (рис. 1.14) и выявляются также между миофибриллами, особенно вблизи митохондрий и по периферии клетки (см. рис. 1.13). Goldstein, Entman

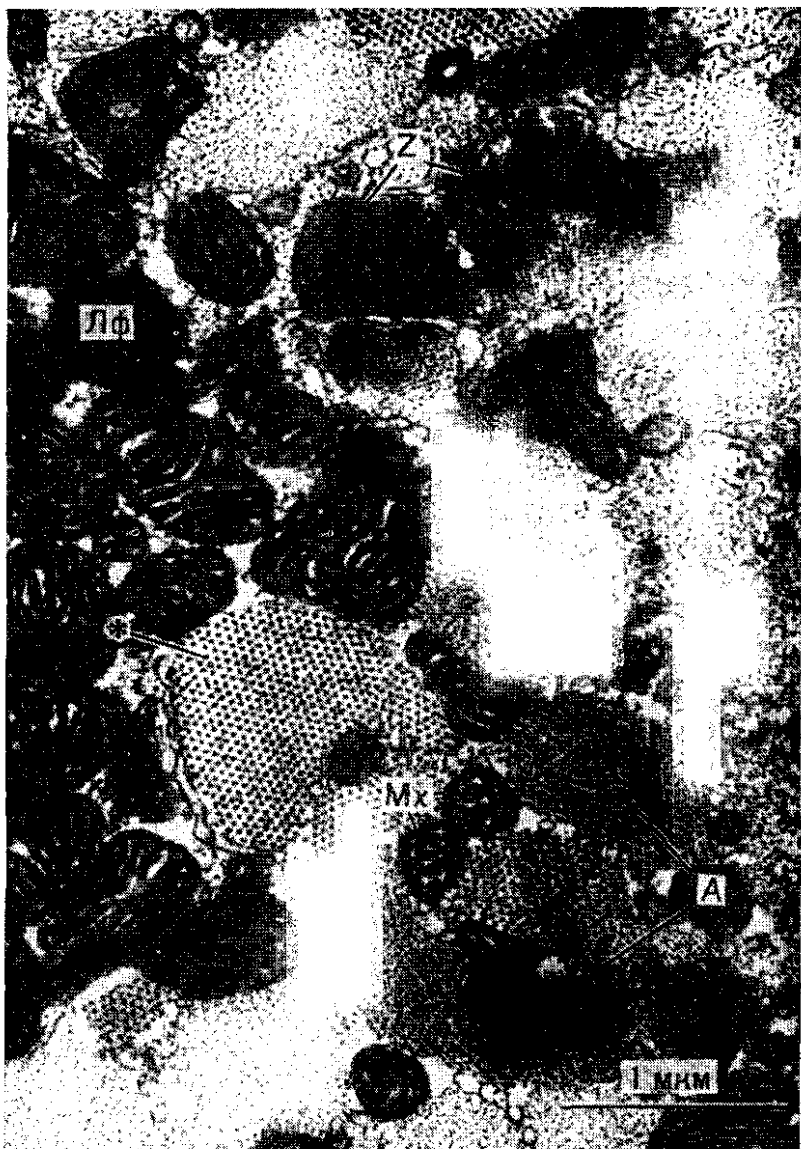


Рис. 1.8. Поперечный срез папиллярной мышцы макаки резуса. Хорошо представлены все сегменты саркомера (см. рис. 1.7). В верхней части фотографии видны несколько участков (Z), заполненных веществом Z-полос («Z-диски»). Другие участки содержат элементы I-полос (I) и A-полос (A). Один из пучков миофибрилл разрезан по среднему уровню (отмечен звездочкой), детали которого показаны на рис. 1.10. Обратите внимание на многообразие форм пучков миофибрилл, образующих Felderstruktur, аналогичную выявляемой в скелетной мышце. Между пучками миофибрилл расположено большое количество митохондрий, а некоторые митохондрии (Mx) со всех сторон окружены миофибриллами. Лф — частицы липофусцина.

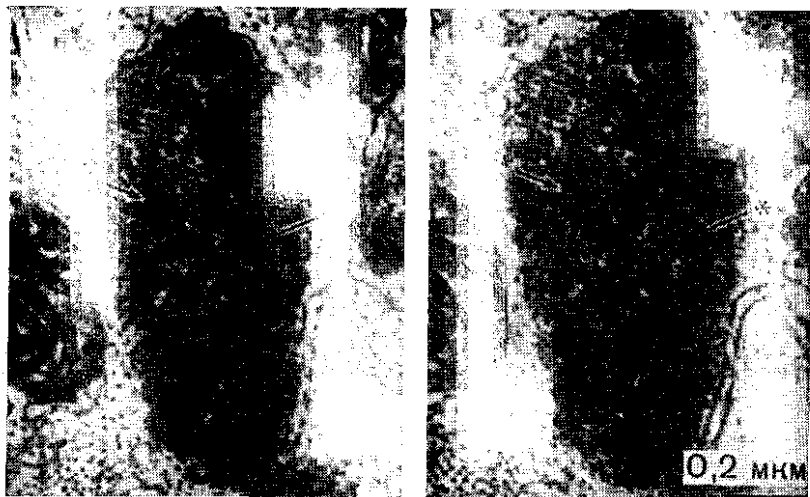


Рис. 1.9. Папиллярная мышца сердца макаки резуса. Стереоскопическая пара микрофотографий (угол схождения 20°), полученная при поперечном сечении Z-диска. Внутренняя структура диска возникает вследствие взаимопроникновения продольных и поперечных волоконных компонентов. Доминирующей структурой (показана на снимке стрелкой), образуемой в Z-диске, является так называемый малый квадрат. В других участках обнаруживается структура «плетеной корзины» (показана звездочкой), которая в действительности является результатом негативного изображения, образуемого включенными в нее миофибриллами. Если сравнить изображение этого участка Z-диска на фотографиях для «правого глаза» и «левого глаза», то можно увидеть, что «плетеная корзина», несомненно определяемая на левой фотографии, на правой превращается в структуру, похожую на «малый квадрат».

аксиальные, так и более тонкие «соединительные» филаменты, образует решетку Z-полосы, которая, по-видимому, подвержена определенным изменениям, судя по выявляемым одновременно вариантам субструктуры [23]. Z-полосы рабочих кардиомиоцитов желудочков (см. рис. 1.7) и предсердий (см. рис. 1.37) сильно отличаются по внешнему виду. Полные исследования Z-полос предсердий по описанному выше методу еще не проведены.

В расслабленных миофибриллах актиновые волокна не входят в центральную зону саркомера: комплекс M-полосы и L-линии («псевдо-N-зона») [4]. Эта область образуется тремя чередующимися полосами: L-линия/M-полоса/L-линия (см. рис. 1.7; 1.11). Две L-линии состоят из тех сегментов миозиновых волокон, в которых не образованы актин-миозиновые поперечные связи (эти связи и перекрывание волокон актина и миозина представляют собой структурную основу A-полосы) или миозин-миозиновые поперечные связи (наличие которых определяет прозрачность M-полосы) (рис. 1.10; 1.11). Образование M-полосы является последним этапом взросления саркомера; например, в миокарде

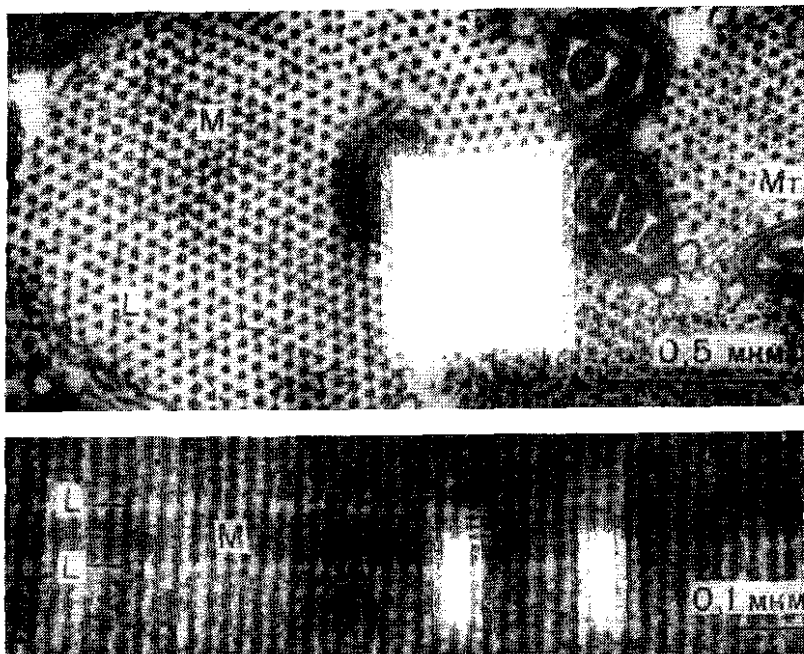


Рис. 1.10. Фрагмент рис. 1.8. Плоскость сечения проходит через А-полосу миофибрилл. Справа внизу видно типичное расположение нити миозина, окруженной шестью нитями актина (в кружке), т. е. эта область располагается с одной стороны от среднего уровня саркомера. Слева выявляется внутренняя структура «псевдо-Н-зоны». На краю миофибрилл видны оголенные, имеющие грубо треугольную форму нити миозина, проходящие на уровне L-линии (L), ближе к центру пучка — большое количество поперечных мостиков между нитями миозина, указывающие на то, что в этом участке срез проходит через М-полосу (M) (сравните с рис. 1.11). Обратите внимание на крысы митохондрий, имеющие форму зубцов, и поперечно рассеянные микротрубочки (Mt), расположенные в межмиофибрилярном пространстве.

Рис. 1.11. Продольный срез «псевдо-Н-зоны» миофибрилл миокардиальной клетки. L-линии образованы короткими толстыми выступами нитей миозина, в то время как для участков миозиновых нитей в широкой центральной М-полосе (M) характерны тонкие поперечные мостики (показаны стрелками).

крысы поперечные мостики в М-полосах образуются только после рождения [25]. В миокарде морской свинки, который бывает практически полностью развит к моменту рождения [26, 27], М-полосы выявляются уже к 8-й неделе внутриутробного развития (неопубликованные данные).

Характерная длина саркомера клеток желудочков сердца млекопитающих в покое равна примерно 2,2 мкм. Приблизительные величины размеров различных сегментов саркомера составляют: Z-полоса 80—160 нм; I-полоса (каждая половина)

0,35 мкм; А-полоса 1,45—1,65 мкм; М-полоса 70—90 нм; L-линия 10—20 нм. Вклад каждого актинового волокна в длину отдельного саркомера составляет 1,25 мкм и меньше (большая часть актиновых волокон плохо видна в расслабленном саркомере, так как они перекрываются миозиновыми волокнами в А-полосе). Все еще остается неясным, пересекают ли актиновые волокна Z-полосу, образуют переход (или сливаются) с другими более толстыми волоконными сегментами или же каким-либо образом заканчиваются внутри решетки Z-полосы [5].

Саркомеры соседних миофибрилл в миокарде редко точно прилегают друг к другу (см. рис. 1.1; 1.7; 1.36), и поэтому можно получить тонкие поперечные срезы клеток, которые содержат примеры всех основных сегментов саркомера (см. рис. 1.8). Неправильное прилегание миофибрилл связано с неровными контурами вставочных дисков на концах кардиомиоцитов (см. рис. 1.1; 1.27; 1.37). Если предположить, что точка вхождения саркомера во вставочный диск находится на уровне, на котором должна быть сформирована Z-полоса (см. рис. 1.1; 1.27), и учитывать разную длину извилистых вставочных дисков, то это естественно обуславливает сдвиг расположения соседних миофибрилл (хотя, несомненно, некоторый вклад вносит разная длина отдельных миофибрилл).

Начало образования миофибрилл во время эмбрионального развития влияет, как оказалось, на образование сегментированной части саркоплазматического ретикулума, а также на ориентацию поперечно расположенных компонентов продольно-поперечной тубулярной системы (ППТС) (см. «Продольно-поперечная тубулярная система»). Расположение Z-полос саркомера, по-видимому, определяет расположение некоторых компонентов кардиомиоцитов, к которым относятся Т-тубулы, концевые цистерны СР; «Z-тубулы» СР и промежуточные волокна. Эти структуры преимущественно располагаются в клетке так, как будто они направлены параллельно Z-полосам (рис. 1.12; 1.13; см. рис. 1.20—1.22; 1.26). Несмотря на такую ориентацию большинства внутриклеточных структур, имеется ряд исключений. Например, митохондрии (см. рис. 1.1; 1.7; 1.17) редко выявляются в «миоплазме на Z-уровне» [28].

Микротрубочки. Микротрубочки в большинстве клеток являются основным элементом цитоскелета. В высокоорганизованных кардиомиоцитах система миофибрилл, элементы которой плотно упакованы, ориентированы преимущественно в продольном направлении и надежно закреплены в веществе вставочных дисков, по-видимому, в наименьшей степени нуждается в организованном внутриклеточном каркасе. Несмотря на этот довольно логичный вывод, было неоднократно продемонстрировано наличие в клетках сердца большого количества микротрубочек [8, 29, 30]. Микротрубочки в сердце, проходя преимущественно вдоль продольной оси клетки, сильнее концентрируются вокруг ядра (рис. 1.14) и выявляются также между миофибриллами, особенно вблизи митохондрий и по периферии клетки (см. рис. 1.13). Goldstein, Entman

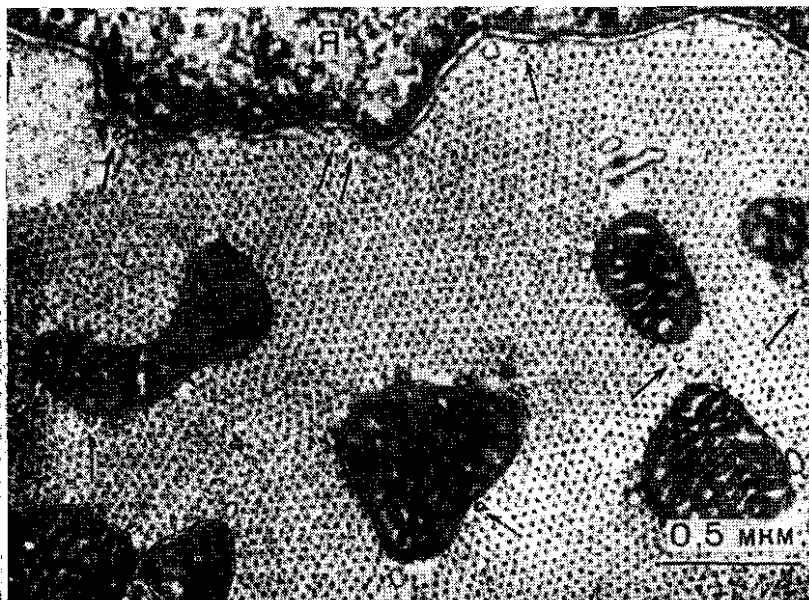
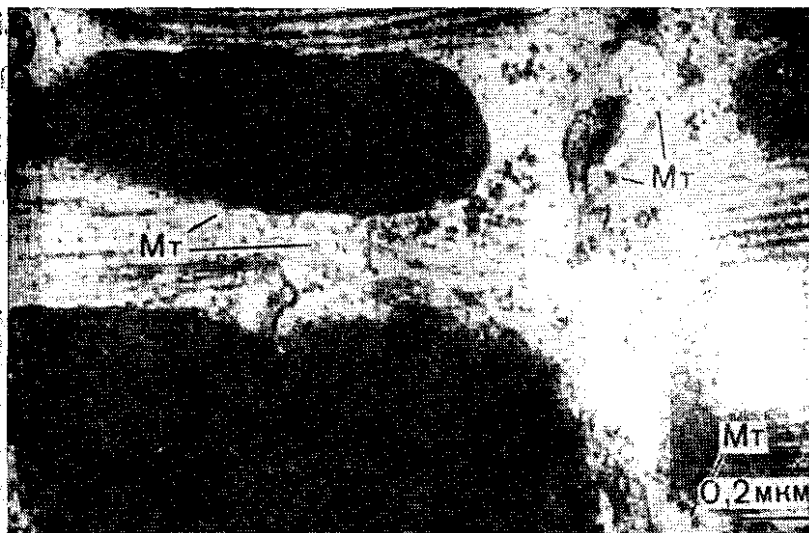


Рис. 1.12. Миокардиальная клетка желудочка сердца мыши. В поле зрения продольно и наклонно располагаются микротрубочки (Мт). Некоторые трубочки загибаются на уровне I-полосы. Электронная микрофотография.

Рис. 1.13. Папиллярная мышца сердца макаки резуса. Вблизи границы ядра (Я) можно обнаружить поперечные срезы микротрубочек, наблюдаемые также в микоплазме между миофибриллами и поэтому часто проходящие около митохондрий. Электронная микрофотография.

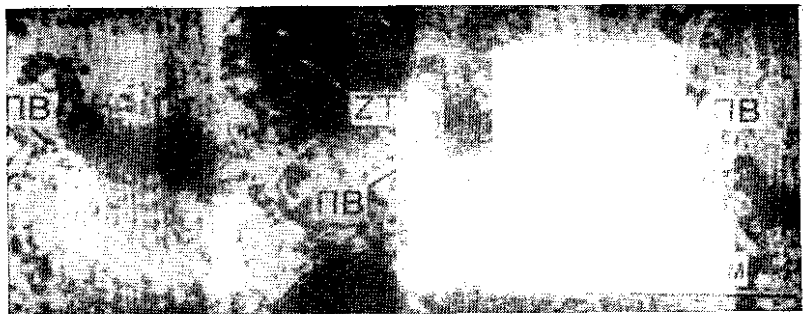


Рис. 1.14. Продольный срез миоцита стенки желудочка сердца мыши. Около Z-полос миофибрилл выявляются промежуточные волокна (ПВ), образующие группы. В миоплазме на Z-уровне видно поперечное сечение «Z-тубулы» (ЗТ) саркоплазматического ретикулума. Электронная микрофотография.

[30] сообщили, что микротрубочки в миокарде собаки образуют спиральную структуру, закрученную вокруг ядра и миофибрилл; этим можно объяснить отдельные случаи расположения микротрубочек практически поперек оси клетки вблизи уровней I- и Z-полос (рис. 1.12; см. рис. 1.24) [8—12].

Микротрубочки в ткани миокарда имеют диаметр в пределах 24—30 нм и могут достигать нескольких микрометров в длину (см. рис. 1—12).

Промежуточные (10 нм) волокна. Эти волокна получили название из-за своего диаметра (диапазон 7—11 нм, в среднем 10 нм), который находится в пределах значений диаметра волокон актина и миозина и являются вторым основным компонентом цитоскелета большинства клеток. Их вклад в цитоскелет миокарда лучше всего выявляется в поперечном плане клеток, особенно на уровне Z-полосы (см. рис. 1.14; 1.15) [8, 28, 29, 31]. Эти волокна могут быть прикреплены к внутренней поверхности сарколеммы и к ядерной мембране [29], внося, таким образом, существенный вклад в серию параллельных пластов, которые, по-видимому, создают жесткость в поперечном сечении кардиомиоцитов [8, 28]. Пучки промежуточных волокон, в частности у грызунов, располагаются по окружности миофибрилл (см. рис. 1.15) и могут содержать до 50 волокон. Промежуточные волокна значительно реже встречаются в ткани сердца хищников и приматов, чем в сердечной ткани грызунов. В тонком сечении вдоль длинной оси кардиомиоцита промежуточные волокна наблюдаются редко, причем эти выводы подтверждаются иммунологическими исследованиями [32, 33]. Небольшое количество продольных промежуточных волокон преимущественно выявляется на периферии клеток и в межмиофибрилярном пространстве (см. рис. 1.35), если их вообще удастся обнаружить. Промежуточные волокна выявляются вблизи вставочного диска, где они специфически прикрепляются к внутриклеточным бляшкам десмосом (рис. 1.16; 1.29).

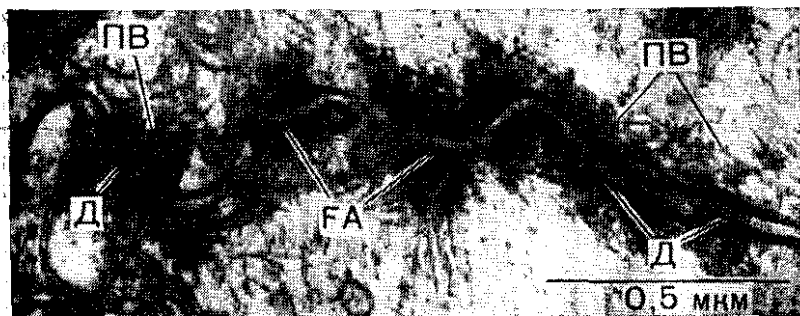


Рис. 1.15. Поперечное сечение миокардиальной клетки желудочка сердца мыши. Z-диск частично окружен пучками промежуточных волокон (ПВ). Z-тубулы (ZТ) плотно прилегают к поверхности пучка миофибрилл. Электронная микрофотография.

Рис. 1.16. Желудочек сердца мыши. Вставочный диск, образованный торцами двух соседних клеток. Тканевая структура, образованная промежуточными волокнами (ПВ), тесно связана с внутриклеточными бляшками десмосом (Д). Обратите внимание, что нити актина оканчиваются в непрозрачном веществе fascial adherentes (FA). Электронная микрофотография.

Митохондрии

В количественном отношении среди внутриклеточных компонентов кардиомиоцитов желудочков митохондрии занимают второе место (основную часть клетки формируют миофибриллы [5]). Они обычно располагаются в миоплазматическом пространстве между миофибриллами, где образуют продольные столбики (см. рис. 1.1; 1.2; 1.7; 1.8; рис. 1.19; 1.22; 1.27), в субсарколеммальном пространстве и в миоплазме вокруг ядра клетки (см. рис. 1.17; 1.32). Предполагают, что межмиофибриллярные мито-

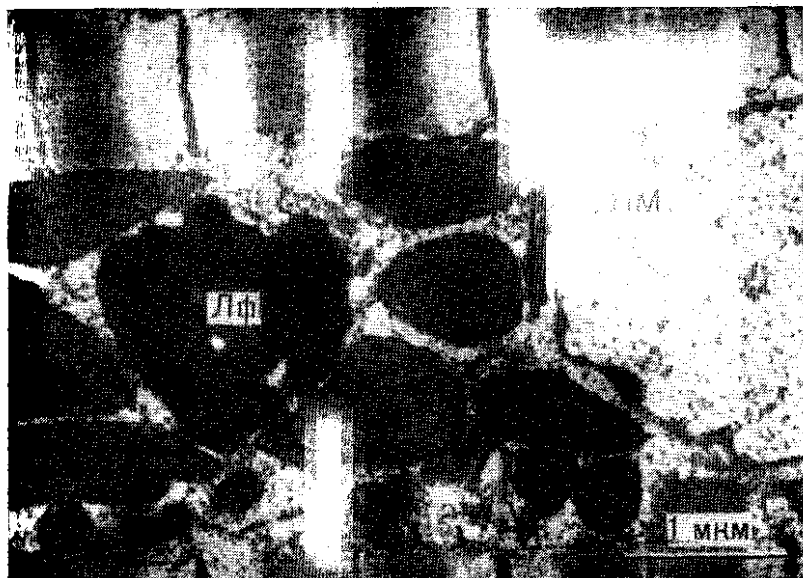


Рис. 1.17. Стенка правого желудочка сердца собаки. На этом продольном срезе миокардиальной клетки виден типичный состав «миоплазмы полюса ядра», располагающейся в продольном направлении от концов ядра. В поле зрения преобладают крупные гранулы липофусцина (ЛФ). В этих участках миоплазмы плотно упаковано большое количество митохондрий, внутри которых видны плотные гранулы и кристы разнообразной формы. В этой клетке пластинчатый комплекс (ПК) (аппарат Гольджи) представлен в виде простой груды мешочков, тесно прилегающих к ядерной мембране (ЯМ). Электронная микрофотография.

хондрии составляют популяцию, которая по своему функциональному назначению отличается от субсарколеммальной популяции митохондрий [34—36]. Субсарколеммальные митохондрии в большинстве клеток расположены цепочками вблизи зоны межклеточных контактов [37]. Такие комплексы часто содержат соединительные тяжи, образующие, по-видимому, связи между расположенными рядом структурами. Такое специфическое расположение митохондрий может быть связано с регуляцией внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} в непосредственной близости от межклеточного контакта, что в свою очередь оказывает влияние на электрохимическое функционирование таких контактов [38, 39].

В выделенных из клеток митохондриях, даже если они содержались в обычных условиях, что подразумевает общепринятые (метаболически неактивные) условия, тем не менее выявляется ряд изменений внутренней структуры, например, увеличение плотности упаковки крист, как это наблюдается в клетках ткани желудочков сердца мыши (см. рис. 1.14; 1.27), или гребнеобразные кристы в кардиомиоцитах кошки [40], собаки (см. рис. 1.19) и обезьяны (см. рис. 1.7; 1.13). Митохондрии клеток рабочего

миокарда редко имеют небольшие размеры со слабо развитыми внутренними мембранами. В действительности в явно нормальных клетках митохондрии могут достигать поистине гигантских размеров, хотя наличие таких митохондрий также может быть симптомом патологии [41].

Размеры митохондрий в клетках ПЖПС млекопитающих могут сильно варьировать даже в одной клетке. Изредка обнаруживают митохондрии небольших размеров с малым количеством крист (см. рис. 1.39; 1.42; 1.43; 1.46).

Ядро

Как уже было сказано в разделе «Форма и размер клеток», многоядерность является скорее правилом, чем исключением, в клетках тканей желудочков сердца млекопитающих. К концу первой недели жизни после рождения мыши клетки ткани сердца в основной массе имеют два ядра (70%), а у взрослых крыс 85% кардиомиоцитов являются двуядерными [21]. В ткани сердца свиньи [43] и человека [44] наблюдается высокая степень двуядерности и многоядерности, причем в отдельных кардиомиоцитах свиньи число ядер может достигать 22 [43]. Наличие множества ядер, по-видимому, является результатом сохранения кариокинеза и после рождения без сопровождающего цитокинеза. Этот вывод подтверждается открытием одиночных тетраплоидных ядер в клетках ткани новорожденной мыши [42]. Полный цикл митоза прекращается сразу после рождения млекопитающего [45], и у взрослых особей только предсердные клетки сохраняют способность к делению [46]. Кажется вероятным, что угнетение цитокинеза в кардиомиоцитах желудочков является следствием развитой слоистой внутренней архитектуры клеток со специфической ориентацией органелл [47], хотя свое влияние могут оказывать и другие структурные особенности миокардиальных клеток (см. «Центриоли»).

Ядра кардиомиоцитов обычно имеют веретенообразную форму (см. рис. 1.1; рис. 1.18) и расположены в клетке продольно, как и другие основные клеточные органеллы (например, миофибриллы и митохондрии). Ядерная мембрана имеет складчатую поверхность с многочисленными выступами и впячиваниями (см. рис. 1.18). Вытянутая форма ядра может быть обусловлена не только пальцием вокруг него миофибрилл, но также и окружающими его микротрубочками [29, 30]. Прикрепление и (или) вхождение в боковую поверхность ядра промежуточных волокон [29] может обуславливать появление складок на поверхности ядра, происходящее при сокращении кардиомиоцита [48].

Ядра кардиомиоцитов могут быть расположены как в периферической миоплазме, так и в глубине клетки (см. рис. 1.1; 1.7; 1.8; 1.13; 1.19). С каждым полюсом ядра связана некоторая конусообразная область миоплазмы, в которой выявляются пузырьки пластинчатого комплекса (аппарата Гольджи), центриоли (когда они есть), митохондрии, шероховатый и гладкий эндоплазм-

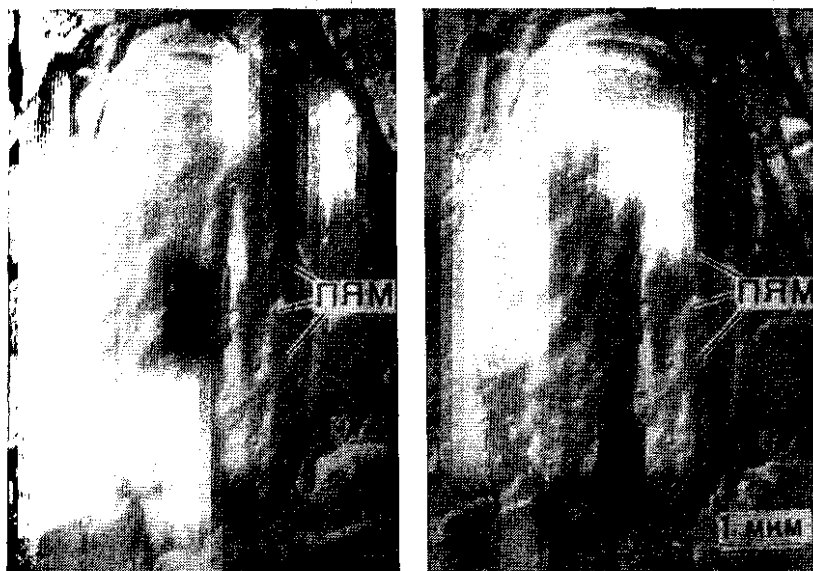


Рис. 1.18. Стереомикрофотографии поверхности ядра миокардиальной клетки желудочка сердца мыши (стереоугол 20°). На поверхности видны многочисленные хаотично расположенные поры ядерной мембраны (ПЯМ). Для поверхности ядра характерны также складки.

матический (саркоплазматический) ретикулум и множество лизосом (включая лизосомы с гранулами липофусцина) (рис. 1.19). В отдельных клетках, исследованных в одном и том же образце, области «ядерной полярной миоплазмы» могут варьировать по размерам от очень небольших до значительных (см. рис. 1.32).

Поверхность ядер кардиомиоцитов имеет множество круглых углублений или «пор» (см. рис. 1.18), по периферии которых происходит слияние внешней и внутренней мембран ядра и которые перегорожены аморфной «диафрагмой».

Мембранные системы

Поверхностная мембрана и кавеолы. Элементарная мембрана, окружающая миокардиальную клетку, обычно называется сарколеммой. Наличие на ней множества складок, впячиваний и карманов требует терминологического разделения участков сарколеммы на: а — поверхностную или периферическую сарколемму, состоящую из больших плоских участков поверхности миокардиальной клетки; б — внутреннюю сарколемму, обычно называемую поперечными (Т) тубулами или поперечно-продольной тубулярной системой (ППТС) [8] (см. следующий раздел); с — кавеолы, т. е. окруженные мембраной везикулярные структуры, вдающиеся внутрь клетки, но сохраняющие непрерывность с внекле-



Рис. 1.19. Миокардиальные клетки стенки правого желудочка сердца собаки. Сарколемма расположенная справа клетки образует три Т-тубулы (ТТ), ориентированные в точном соответствии с Z-линиями ближайших миофибрилл. Как на поверхности сарколеммы, так и внутри Т-тубул выявляется связанное с мембраной вещество поверхностного покрытия (ПП). Можно различить три категории структур саркоплазматического ретикулума: сеть СР (ССР) на поверхности одного из пучков миофибрилл, контактный СР (КСР), уплощенные цистерны которого прилегают к Т-тубулам, и корбулярный СР (КорСР) (сравните рис. 1.7; 1.26). Обратите внимание, что митохондрии либо образуют цепочки в пространстве между пучками миофибрилл, либо располагаются под поверхностью сарколеммы. Электронная микрофотография.

точной жидкостью. Вставочные диски, включающие в себя области, содержащие специальные контакты, и расположенные на концах клеток или вблизи них, будут рассмотрены отдельно (см. «Межмембранные контакты»).

Большая часть поверхности сарколеммы покрыта гликопротеиновой оболочкой, обозначаемой термином «поверхностное покрытие» (ее также называют «гликокаликс» и «базальный слой»). Поверхностное покрытие в большинстве электронно-микроскопических препаратов не имеет четких очертаний и какой-либо внутренней структуры (см. рис. 1.7; 1.19; 1.33; 1.35). Оно не прерывается около входных отверстий кавеол, но, по-видимому, не заполняет их полостей (см. рис. 1.35). В областях близкого расположения соседних клеток (например, во вставочных дисках) поверхностное покрытие утолщается или исчезает. Считают, что поверхностное покрытие служит для захвата и удержания определенных ионов, в основном Ca^{2+} [49], однако вклад этого конкретного пула внеклеточного Ca^{2+} в процесс электромеханического сопряжения не может быть особенно значительным [50].

Кавеолы занимают значительную часть поверхности кардиомиоцитов [51, 52], особенно в клетках, лишенных ППТС [53, 54]. В настоящее время получены несомненные доказательства того, что формирование ППТС в процессе развития миокарда является результатом роста кавеол от поверхности клетки внутрь [8, 26, 55, 56].

Поперечно-продольная тубулярная система (ППТС). Кардиомиоциты млекопитающих обладают уникальным свойством, отличающим их от кардиомиоцитов других позвоночных животных, проявляющимся сильным развитием глубоких впячиваний сарколеммы, обычно называемых поперечными тубулами (Т). Но даже у млекопитающих не во всех кардиомиоцитах формируются Т-тубулы. Например, их лишены некоторые предсердные клетки ткани сердца крысы [53], все предсердные клетки морской свинки [57] и многие компоненты предсердно-желудочковой проводящей системы. В участках обнаружения Т-тубул они часто сопровождаются продольно ориентированными (аксиальными) тубулами [8, 57, 58]. Система поперечно и продольно ориентированных тубул в кардиомиоцитах описывается концепцией «поперечно-продольной тубулярной системы», или ППТС [6, 8, 57]. В зависимости от вида млекопитающего могут наблюдаться существенные вариации структурных компонентов ППТС. Для тубул ткани сердца мыши характерны малый диаметр и неправильная форма (рис. 1.20), а, например, ППТС клеток ткани желудочков сердца морской свинки и обезьяны представляет собой набор тубул большого диаметра, часто образующих соединения в виде относительно правильных пространственных решеток (см. рис. 1.21), охватывающих практически весь кардиомиоцит [6, 8, 57].

Отверстия вхождения поперечных компонентов ППТС обычно образуются около ближайших Z-линий миофибрилл, расположенных рядом с сарколеммой, поэтому часто на сарколемме могут

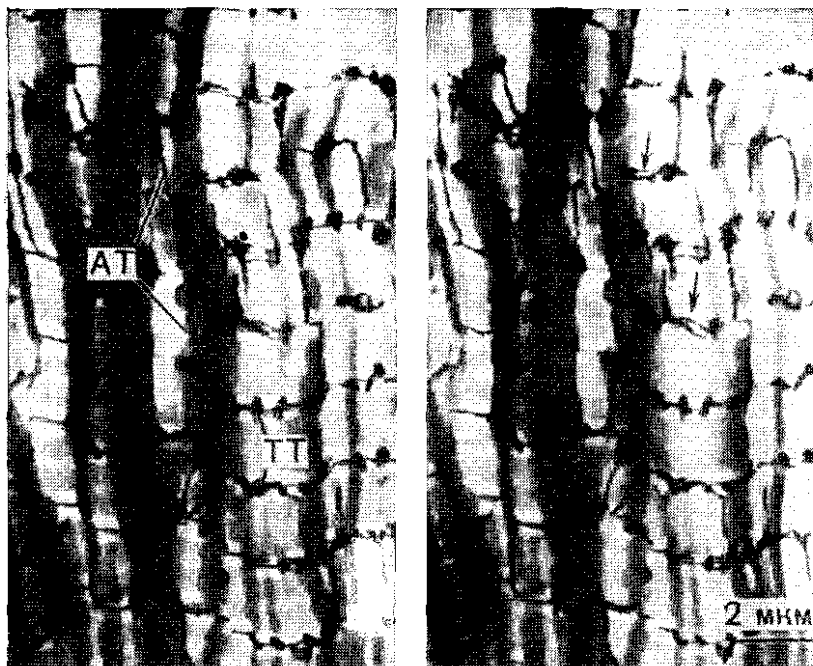


Рис. 1.20. Желудочек сердца мыши. Полутонкий (≈ 1 мкм) продольный срез ткани (стереоразделение 12°), в которой все межклеточное пространство заполнено непрозрачным составом, с помощью постфиксации тетрааксидом осмия, окисленной ферроцианидом (OsFeCN). Несмотря на наличие большого количества поперечно ориентированных тубулярных структур (ТТ), можно видеть также многочисленные продольные и наклонно проходящие трубочки (называемые «аксиальными» тубулами; АТ), которые часто соединяются с поперечными трубочками. Можно различить структуры в виде «буса» (показаны стрелками), наличие которых говорит о начале формирования тубул в результате роста кавеол. Для поперечно-продольной тубулярной системы (ПТТС) мыши типичны контуры неправильной формы, расширения и ветвления. Электронная микрофотография.

быть обнаружены довольно правильные массивы отверстий Т-тубул (см. рис. 1.19; 1.20; 1.21). Даже если входное отверстие Т-тубулы не находится непосредственно напротив Z-линии, то внутри клетки Т-тубула располагается таким образом, чтобы в конце концов оказаться вблизи Z-линии [8, 28] (см. рис. 1.20; рис. 1.21). Как уже было сказано в предыдущем разделе, рост элементов кавеол от поверхности сарколеммы или самих цепей кавеол к центру кардиомиоцита, по-видимому, является тем механизмом, с помощью которого образуется ПТТС. Форма элементов ПТТС в ткани сердца мыши часто отражает их происхождение из кавеол (см. рис. 1.20) [8, 59]; кроме того, кавеолы нередко образуются на уже сформировавшихся тубулах (см. рис. 1.21). Значение этого последнего наблюдения неясно, но оно может указывать на то, что процесс образования кавеол до не-



Рис. 1.21. Поперечно-продольная тубулярная система (ППТС) миокардиальной клетки папиллярной мышцы сердца макаки резуса, выявляемая на срезе толщиной 2 мкм с помощью инфльтрации $OsFeCN$. Ясно видна непрерывность некоторых Т-тубул с поверхностной сарколеммой (показано стрелками). В глубине клетки образуются анастомозы поперечных тубул с истинными аксиальными тубулами (слева). В правой части микрофотографии наклонно ориентированные «аксиальные» сегменты (показаны звездочкой) образуют контакты с Т-тубулами, ориентированными вдоль Z-линий пучков миофибрилл, расположенных со сдвигом относительно основной массы миофибрилл. Маленькие непрозрачные точки, расположенные практически по всей поверхности ППТС, представляют собой кальвеолы (К).
Электронная микрофотография.

которой стени продолжается во взрослых кардиомиоцитах, и он может быть активирован в таких условиях, как гипертрофия сердца, при которой необходим дополнительный рост ППТС. В тканях сердца и новорожденных, и взрослых особей кавеолы, непосредственно соединенные с поверхностной сарколеммой, очень редко обнаруживаются отдельно, а чаще образуют массивы из 3—5 слившихся кавеол; иногда наблюдаются контакты кавеола с дистернами периферического контактного CP [59].

В большинстве образцов элементы ППТС выстилаются веществом, покрывающим поверхность (см. рис. 1.19), и вероятно, что многие из небольших более «примитивных» поперечных и продольных тубул, которые встречаются в ткани сердца мышцы, также покрыты этим веществом [8]. При сравнении ППТС различных видов млекопитающих выявляется высокая степень полиморфизма; средний диаметр тубул может находиться в пределах 50—500 нм [8], причем меньшие величины встречаются в различных кардиомиоцитах мышцы, крысы и землеройки, а большие — у морской свинки [57], тюленя [60] и сирийского хомячка [61]. Использование таких электронно-непрозрачных «меток», как гидроксид коллоидного лантана, продукты реакций с участием перок-

сидазы хрена и осадок, образуемый постфиксацией в тетраокси осмия, окисленной ферроцианидом, способствовало выявлению формы и степени развития ППТС у млекопитающих [8].

Значение ППТС для кардиомиоцита значительно больше, чем значение Т-системы для миоцита скелетной мышцы. Если функция ППТС в сердце в основном сводится к созданию оптимального отношения площади к объему в каждом кардиомиоците, то, казалось бы, имеется некоторая физиологическая несоразмерность, так как миоцит скелетной мышцы имеет значительно больший объем (хотя состав элементов ППТС сильно различается в этих двух типах мышц) [5]. Большую дополнительную площадь поверхности создают в кардиомиоците кавеолы, присоединенные либо к поверхности сарколеммы, либо к ППТС или образующие обширные трехмерные тубовезикулярные массивы («лабиринты»), обнаруженные в сердце мышцы [8, 55, 56, 58, 62] и землеройки [8]. Развитие ППТС не связано непосредственно с размером клетки; показано, что большие (30—50 мкм в диаметре) мышечные клетки проводящей системы не имеют ППТС [5] и что развитие Т-тубул в ткани сердца собак начинается в клетках левого желудочка, средний диаметр которых меньше такового в клетках правого желудочка [63]. Было высказано предположение, что ППТС является признаком приспособления этих миокардиальных клеток, способных к гипертрофии, в то время как клетки ПЖПС не имеют ППТС и не подвержены увеличению. Фактически в кардиомиоцитах, имеющих ППТС, возбудимые мембраны и внеклеточную жидкость можно найти всюду внутри клетки [6], что, таким образом, оптимизирует условия и процессы, составляющие электромеханическое сопряжение.

ППТС является последней системой, развивающейся в кардиомиоцитах, и в условиях культуры клеток она может вообще не развиваться [64]. У большинства млекопитающих ППТС не развивается вплоть до момента рождения, однако у некоторых видов зафиксировано ее преждевременное развитие (например, у морской свинки) [26, 27]. Однако отмечалось, что у разных видов млекопитающих стадии начала развития ППТС одни и те же, т. е. сердца морской свинки и крысы эквивалентны в своем структурном развитии, когда образуются Т-тубулы, несмотря на то что у этих двух видов описываемые стадии наступают через 8 нед зародышевого развития и через 1—2 нед после рождения соответственно [27].

Саркоплазматический ретикулум (СР). Эквивалентом эндоплазматического ретикулума клеток скелетной мышцы, в кардиомиоцитах является саркоплазматический ретикулум, имеющий множество конфигураций, которые различны по структуре, однако являются непрерывными. Основную часть СР составляет «сеть» СР (ССР), которая имеет вид мелкоячеистой сетки, тесно прилегающей к миофибриллярному пространству (рис. 1.22; 1.23). Обычно наблюдается специализация и сегментация ССР в соответствии с формой соседнего саркомера (см. рис. 1.22; 1.23); в частности плотно упакованные тубулы могут анастомозировать

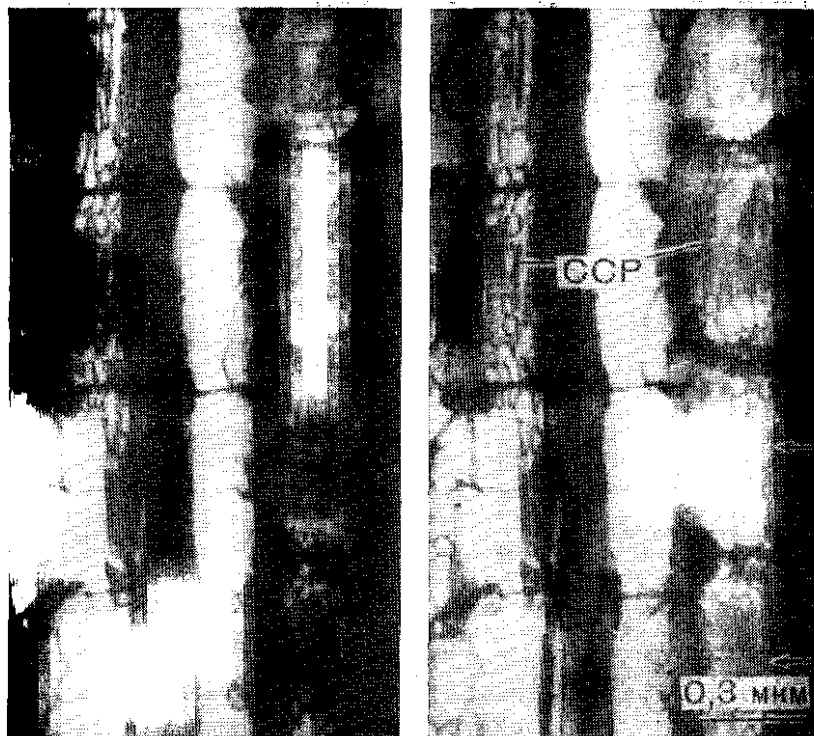


Рис. 1.22. Стереоскопические микрофотографии (стереоугол 12°) миокардиальной ткани желудочка сердца мыши, обработанной $OsFeCN$ с целью повышения электронно-оптической плотности саркоплазматического ретикулула (СР). В этом полутонком срезе ($\approx 0,3$ мкм) развитая система тубул СР складывается на внешнюю поверхность миофибрилл. СР не прерывается на уровне Z-линий, но тем не менее видна его сегментация, соответствующая сегментации миофибрилл на саркомере. На уровне А-полос большинство элементов сети СР (ССР) образуют систему плотно упакованных, параллельных длинной оси клетки трубочек, которые на уровне М-полосы группируются в перфорированные сетки («фенестрированные кольца», показано стрелками). На уровне I-полосы выявляется более крупноячеистая сеть тубул СР. Такая картина является типичной для глубоких областей миокардиальной клетки мыши (сравните с рис. 1.23). Электронная микрофотография.

вблизи центральной области А-полосы и образовывать структуру, похожую на ожерелье с отверстиями [65], и «Z-тубулы» СР, окружающие миофибриллы на уровне Z-линий у мыши и других млекопитающих [8, 28] (см. рис. 1.14; 1.15). Недавно в литературе были описаны удаленные участки ССР [8, 66, 67]. Выявление такого «цистернообразного» СР не ограничивается каким-либо определенным уровнем саркомера, и поэтому он может быть легко отдифференцирован от «удаленного контактного» СР (см. ниже), формирующегося в основном на уровне Z-линий.



Рис. 1.23. Та же ткань, что и на рис. 1.22. Сечение проходит близко к поверхности клетки с прокрашенным СР [обратите внимание на кавеолы (K)], где доминирует структура ССР с крупными ячейками. Тубулы анастомозируют с расширенными участками, соответствующими контактному СР (в данном случае «периферическому» КСР, ПКСР). На уровне Z-линии виден также КорСР. Электронная микрофотография.

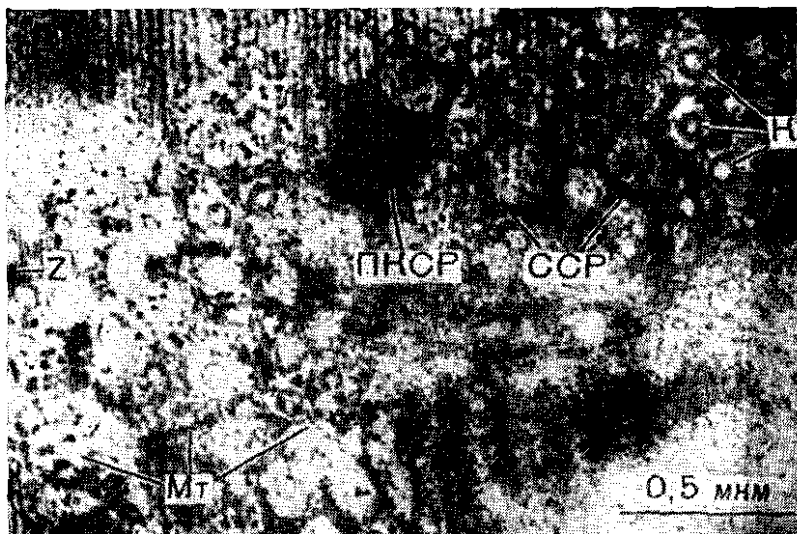


Рис. 1.24. Тонкий срез, захватывающий поверхность миокардиальной клетки из стенки правого желудочка сердца южноафриканской мартышки. Обратите внимание на кавеолы (K), расположенные в ячейках сети СР (ССР) (сравните с рис. 1.23). В этой ткани, окрашенной обычным методом, четко наблюдается большая плотность содержимого цистерны периферического контактного СР (ПКСР) по сравнению с ССР. Частично это является следствием наличия контактных гранул и выростов. Слева внизу видна изогнутая микротрубочка (Мт), расположенная перпендикулярно миофибриллам (Z-полоса). Электронная микрофотография.

Второе основное подразделение СР кардиомиоцитов включает в себя различные категории «контактного» СР (КСР), наиболее характерные из которых образуют контакты (см. рис. 1.19; 1.23—1.25). Контакты в миокарде часто называются «триадами» (два элемента КСР в комплексе с одной Т-тубулой). Этот термин получен в результате исследований ультраструктуры скелетной мышцы. Хотя производный от него термин «диада», используемый для описания контакта одного элемента КСР с сарколеммой (см. рис. 1.25), является, по-видимому, адекватным, использование термина «триада» было отвергнуто вследствие обнаружения множества контактов (например, у мышцы) [8, 58], отличающихся значительно варьирующими конфигурациями, включая кольца КСР вокруг элементов ППТС, «обратные триады», когда два элемента ППТС расположены по бокам одного пузырька КСР, S-образные переплетения КСР и ППТС и др.

При наблюдении вдоль длинной оси СР цистерны контактного СР выглядят как дисковидные или вытянутые расширения, к которым подходят тубулы ССР (см. рис. 1.23; 1.24). В сагиттальном сечении (так называемый вид сбоку) КСР уплощен в вертикальной плоскости по сравнению со связанной с ним тубулой ССР, в отличие от ситуации в скелетной мышце, в которой все формы КСР («терминальные цистерны») сильно расширены. На вертикальных срезах выявляются два характерных признака КСР. К ним относятся: а — междупузырьковые контактные гранулы, образующие нечто вроде линейного массива по длине КСР (см. рис. 1.25); б — контактные выросты, представленные множеством аморфных и мембраноподобных структур (см. рис. 1.25). Проблема строения контактных выростов в мышце (включая клетки скелетной, сердечной и гладкой мышц) в последнее время привлекла пристальное внимание исследователей, в результате чего была описана контактная щель с «колошами» [59, 68—70], причем последние представляются как бы непрерывными с элементарной мембраной КСР и сарколеммы (или, кроме того, с мембраной Т-тубул в случае поперечнополосатых и сердечных миоцитов). Выделению этих колонн из всех других форм контактных выростов способствовало применение таких методов исследования, как контрастирование мембраны с помощью травления таниновой кислотой [68, 71] или окрашивание блока раствором уранилацетата с последующим стереоскопическим анализом [59]. В последнем случае достаточно повернуть плоскость сечения по отношению к падающему электронному пучку даже на небольшой угол, чтобы получить возможность для пространственного наблюдения мембраноподобных тел на тех участках, где обычными методами в контактной щели выявляли только аморфное вещество [59].

Пространственная конфигурация контактных выростов в миокарде остается невыясненной. Модификацию методики замораживания со сколом, позволяющую выявить контактные выросты в КСР скелетной мышцы [72], пока не удалось столь же успешно применить для изучения миокарда. Кроме того, анализ тонких срезов трудно проводить вследствие наложения различных слоев

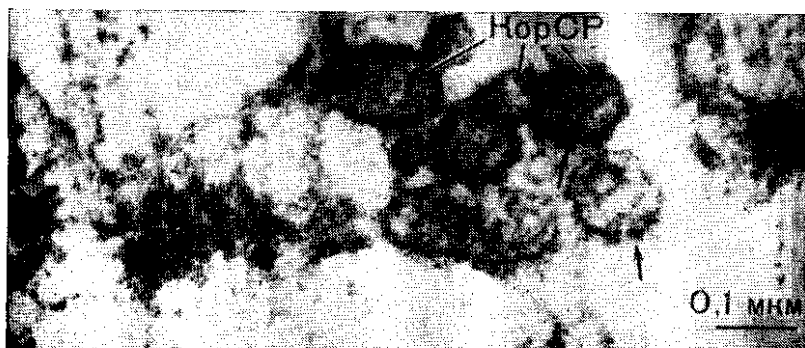
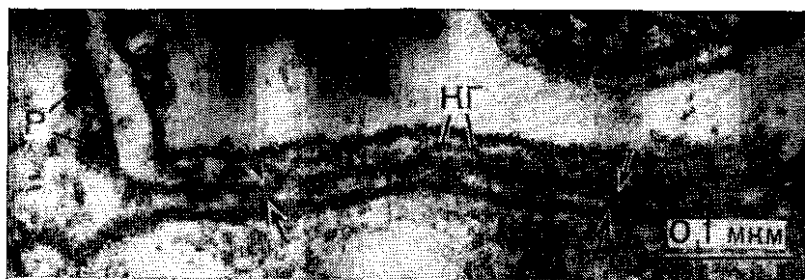


Рис. 1.25. Желудочек сердца мыши. Цистерна ПКСР при высоком увеличении образует контакт с тубулой ССР, которая в данном случае усыпана рибосомами (Р). Наблюдаются наиболее характерные признаки КСР, включая контактные гранулы (КГ) внутри цистерн и контактные выросты в щели между КСР и поверхностной сарколеммой. Некоторые выросты («колошны») (между стрелками), по-видимому, соединяют противоположащие мембраны и сами имеют мембраноподобную структуру. Электронная микрофотография.

Рис. 1.26. Желудочек сердца мыши. На уровне Z-линии видны несколько образцов КорСР, слившихся с ССР. Для таких сферических образований «удаленного КСР» характерно наличие электронно-плотного содержимого, выступов внешней поверхности, некоторые из которых имеют мембраноподобную структуру. Электронная микрофотография.

в месте контакта [8, 73]. Тем не менее было признано вероятным, что контактные выросты в миокарде, подобно таковым в скелетной мышце, расположены рядами [5, 7].

Описаны и другие формы контактного СР миокарда, которые всегда образуют анастомозы с ССР, содержат непрозрачные для электронного пучка гранулы и имеют расположенные на внешней поверхности выступы, напоминающие контактные выросты, но не образующие контактов с сарколеммой или ППТС. По общей классификации эти тела называют удаленным контактным СР (УКСР) [5, 7, 8, 74]. Наиболее часто встречающейся разновидностью УКСР является корбулярный СР («покрытый», КорСР) [4], сферические образования размером 80—120 нм, которые выглядят «отпочковывающимися» от ССР или существуют в виде цепочек везикул, обычно около Z-линий (см. рис. 1.7; рис. 1.26; см.

рис. 1.40). Корбулярный СР выявляется с разной частотой у разных видов животных и в разных участках миокарда. Он обнаруживается как существующие изолированно небольшие группы или же в виде кластеров, содержащих 5—10 везикул.

Цистерны, или мешковидные расширения СР, в настоящее время описаны в ткани сердца мыши [8]; они расположены в глубоких миоплазматических областях над Z-линиями. По внешнему виду они больше всего напоминают компоненты внутренних контактов КСР, которые формируются в отсутствие контактов с ППТС, это явление впервые было описано в тканях сердца птиц [74].

Отмечены также и другие варианты структуры СР миокарда, включая пролиферацию КСР [75] или ССР [8], а также сегменты ССР с плотным ядром [8].

Функция ферментов и других связанных с СР миокарда белков, по-видимому, в основном связана с аккумуляцией и освобождением ионов Ca^{2+} , а колоннообразные структуры внутри зоны контакта могут быть электромеханическими устройствами, через которые потенциал действия и другие сигналы передаются в КСР, а затем и во всю мембранную систему СР, окружающую миофибриллы [59, 70].

В процессе развития миокарда контакты появляются сначала на периферии клеток, но по мере формирования ППТС увеличивается число внутренних контактов, пока не достигнет такового в сердце взрослого организма [67, 77]. Механизм(ы), обеспечивающие формирование контактов, могут быть связаны с индуктивным влиянием контакта сарколеммы с СР; однако, учитывая наличие УКСР, следует рассматривать и другие причины, как, например, присутствие Z-линий и влияние окружающей миоплазмы [28].

Межмембранные контакты: вставочные диски

Миокардиальные клетки соединены друг с другом многочисленными межмембранными контактами, большая часть которых собрана в адгезивные контакты, известные как вставочные диски. В эти комплексы включена сарколемма, ограничивающая торцевые концы клеток, а также дополнительные расширения боковой сарколеммы вблизи концов клетки, размеры которых могут сильно варьировать (рис. 1.27; см. рис. 1.1). Сарколемма вставочных дисков подразделяется на четыре структурные области: а — *fasciae adherentes* («промежуточные» контакты); б — *maculae adherentes* (десмосомы); в — *maculae communicantes* (межклеточные контакты, нексусы); г — неспециализированная, или «обычная» сарколемма [78].

Fasciae adherentes преимущественно являются областями, где оканчиваются миофибриллы, причем актиновые волокна, вероятно, прикрепляются к неизвестному непрозрачному веществу, лежащему под поверхностью сарколеммы (см. рис. 1.16; 1.27). В межклеточной щели в области *fascia adherentes* иногда обнаруживается некоторый структурированный материал [3]. Однако



Рис. 1.27. Продольный тонкий срез через вставочный диск (ВД) миокарда стенки желудочка сердца мыши. Нити актина соседних миофибрилл оканчиваются в непрозрачном внутриклеточном веществе контакта типа fascia adherens (FA). Таким образом, поперечный участок ВД заменяет на этом уровне саркомера Z-линию. Обширные продольно ориентированные участки плотного прилегания мембран соседних клеток являются типичными для ткани сердца грызунов, в частности мыши или морской свинки. Именно в этих участках сарколеммы обычно выявляются десмосомы (Д) и нексусы (Н). Электронная микрофотография.

даже в лучшем случае этот внеклеточный материал не достигает такой степени сложности, как центральный слой десмосом, являющихся, по-видимому, основным образованием, связывающим соседние кардиомиоциты [79]. Десмосомы дополнительно характеризуются дискретными наборами субсарколеммального материала — «бляшек», расположенных друг против друга относительно межклеточной щели, длина которых в противолежащих клетках в точности соответствует друг другу (рис. 1.29). Центральный слой, по-видимому, пронизывают волокна, выступающие из сарколеммы; предполагают, что между промежуточными волокнами и внутриклеточными областями десмосом имеются связывающие белки [80]. Третий тип контактов, межклеточные контакты, также могут служить для создания как механической, так и электрической связи между соседними клетками. Показано, что межклеточные контакты сохраняют механическую целостность и в патологических условиях [81], и при выделении клеток с помощью ферментативной обработки и (или) путем изменения ионного состава [82]. Такие наблюдения подтверждают у межклеточных контактов

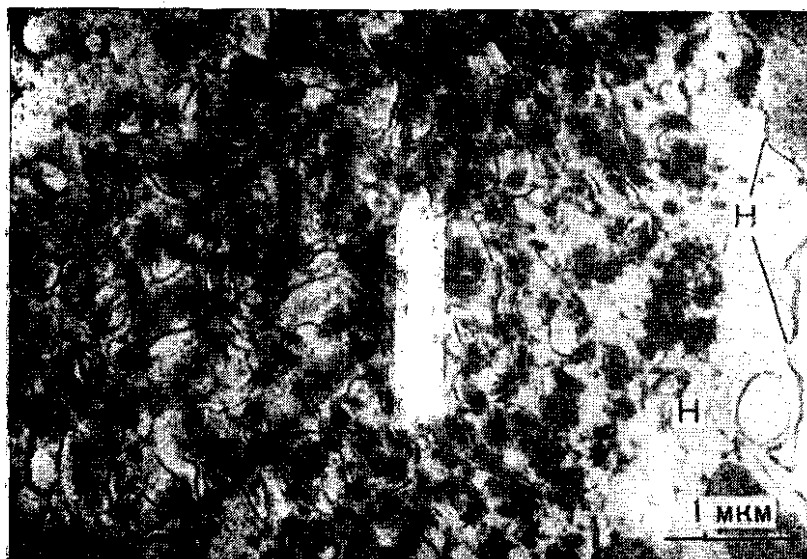


Рис. 1.28. Поперечный срез вставочного диска миокарда желудочка сердца собаки. В клетках рабочего миокарда желудочков сердца хищников и приматов структуры, соединяющие клетки, образуют правильные массивы в поперечной плоскости (сравните с рис. 1.1), которые в действительности имеют дискообразную форму. Такие крупные образования могут быть представлены на одном поперечном срезе (сравните с рис. 1.4). Как и в ткани сердца грызунов (см. рис. 1.27), продольно расположенные участки дисков являются местом преимущественной локализации десмосом и мембраны нексусов. Виден обширный нексус (Н). Электронная микрофотография.

наличие некоторых адгезивных свойств. Наиболее общепринятой функцией межклеточных контактов, особенно в миокарде, считается обеспечение электрического взаимодействия между клетками, опосредованного заполненными жидкостью каналами, которые, по-видимому, обеспечивают непрерывность миоплазмы двух соседних клеток. Вставочный диск является смесью трех типов контактов, расположенных вперемежку с областями обычной сарколеммы, не имеющими никаких специальных образований ни внутри, ни вне клетки (см. рис. 1.27—1.29; 1.31). Форма вставочных дисков может зависеть как от вида животного, так и от роли изучаемого участка миокарда в сердце. Миокард желудочков сердца грызунов отличается от миокарда всех других видов млекопитающих «волнообразной» формой вставочных дисков, обусловленной наличием обширных пальцеобразных продольных выростов и впячиваний (см. рис. 1.27). Концы клеток желудочков сердца хищников и приматов имеют, наоборот, значительно более правильную геометрическую форму; широкие выступы вставочных дисков в таких клетках отличаются истинно дискоидальной формой (см. рис. 1.1; 1.28), а отклонения в продольном направлении имеют прямоугольное сечение, обуславливая, таким образом,

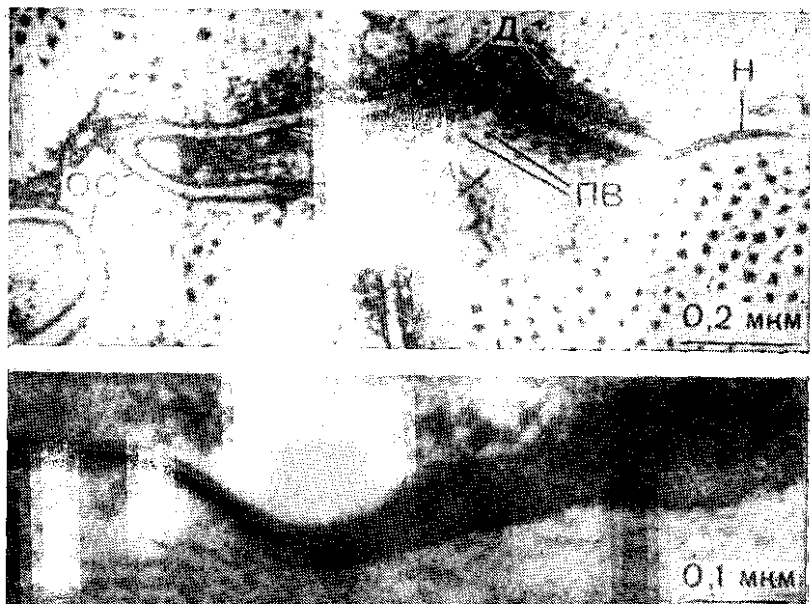


Рис. 1.29. Поперечное сечение миокарда стенки желудочка сердца мыши. Показаны примеры четырех основных типов структур, входящих во вставочные диски: нексус (Н), наиболее узкий участок диска, имеющий семь слоев; десмосома (Д), характеризующаяся линейной внеклеточной структурой (центральный слой) и исключительно непрозрачными внутриклеточными бляшками, вблизи которых видны профили промежуточных волокон (ПВ); fascia adherens (FA), в которой не обнаруживается четкая внутри- и внеклеточная организация вещества, характерная для десмосом, и обычная сарколемма (ОС), область, где формируются кавеолы и периферические контакты (см. рис. 1.35). Электронная микрофотография.

Рис. 1.30. Срез папиллярной мышцы сердца морской свинки. Нексус заполнен электронно-плотным осадком, образованным в результате окрашивания целого блока уранилацетатом. Тонкий срез захватывает область, в которой происходит поворот поверхности сарколеммы, что позволяет увидеть нексус сбоку (слева) и сверху (справа). В присутствии осадка соли урана можно наблюдать характерную гексагональную упаковку субъединиц нексуса («коннексонов»), а также непрозрачное отверстие в центре каждого коннексона. Электронная микрофотография.

классический «ступенчатый» вид вставочного диска (см. рис. 1.1). Вставочные диски в предсердных клетках и клетках проводящей системы включают в себя большое количество продольной сарколеммы (см. рис. 1.37; 1.39; 1.42), и сегменты дисков имеют значительно менее извилистую форму, чем обычно диски клеток рабочего миокарда желудочков (см. рис. 1.28).

Расположение различных форм контактов попеременно определяется преимущественно положением, занимаемым миофибриллами, которые специфически прикрепляются к fasciae adherentes (см. рис. 1.27). Поэтому основная часть поперечно ориентирован-

ной сарколеммы, а также некоторые продольные компоненты диска оказываются неизменно занятыми этим видом контактов. Вследствие этого десмосомы и нексусы в основном занимают выступы продольно ориентированной сарколеммы, и только во вторую очередь появляются в ограниченно доступной сарколемме в межмиофибриллярных пространствах поперечных компонентов вставочного диска (см. рис. 1.27—1.30). По-видимому, из-за наличия их в большом количестве на боковой сарколемме клетки ткани желудочков сердца мыши и морской свинки имеют столь обширные межклеточные контакты [83]. Такие различия суммарного вклада мембран нексусов в общую площадь сарколеммы кардиомиоцитов животных различных видов стоит изучать при помощи морфометрических методов вследствие противоречивости данных относительно электрических свойств вставочных дисков в миокарде [84].

Одновременное использование метода получения реплик с замороженных со сколом образцов и метода внеклеточных меток позволило лучше понять устройство нексусов и обнаружить гексагонально упакованные агрегаты, образованные субъединицами нексуса, «коннексаонами» (по крайней мере в тканях, обработанных в соответствии с обычными методами) [85], и центрального отверстия [86] внутри каждого коннексаона (рис. 1.31; см. рис. 1.30), полость которого может служить для обмена ионами между клетками. Нексусы, десмосомы и в меньшей степени *fasciae adherentes* выявляются на репликах замороженных образцов со сколом, дающих двумерное изображение распределения и степени выраженности таких типов контактов (см. рис. 1.31).

Как уже было сказано в разделе «Промежуточные волокна» (10 нм), промежуточные волокна в миокардиальных клетках часто оказываются связанными с десмосомами. Как утверждалось выше, миофибриллы специфически связываются внутри клетки с контактами типа *fascia adherens*. Более того, недавно мы показали [37], что субсарколеммальные митохондрии имеют тенденцию концентрироваться вблизи нексусов кардиомиоцитов (см. «Митохондрии»).

Другие органеллы

Пластинчатый комплекс и связанные с ним структуры. Основная часть пластинчатого комплекса образована грудой плоских фенестрированных мешочков. В миокардиальной клетке пластинчатый комплекс может состоять всего из нескольких таких мешочков, расположенных напротив вершин ядра (см. рис. 1.17), что особенно часто наблюдается в кардиомиоцитах желудочков, иногда же одна клетка может содержать множество таких слоистых структур, проходящих через миоплазму полюсов ядра (рис. 1.32). Последняя конфигурация особенно характерна для кардиомиоцитов предсердий. Отличительной чертой предсердного пластинчатого комплекса является секреция им специфических предсердных гранул, непрозрачных сферических тел, которые были тщательно изучены и подразделены на несколько морфологи-

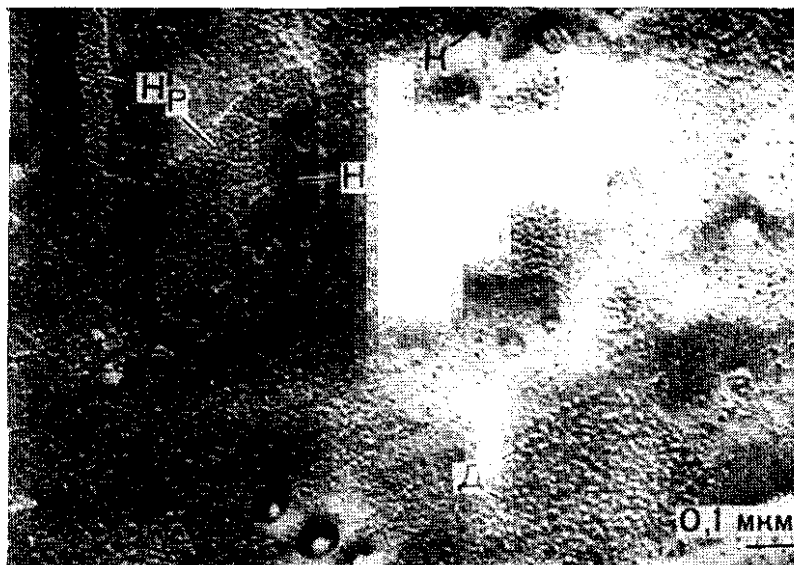


Рис. 1.31. Желудочек сердца мыши. Фрагмент участка боковой поверхности сарколеммы вставочного диска, полученный методом замораживания со сколом (сравните с рис. 1.27). Кроме внутримембранных частиц, хаотично разбросанных по Р-поверхности обычной сарколеммы, здесь же видны несколько групп более крупных, плотно упакованных частиц нексуса (H_p), кое-где на них видны участки Е-поверхности мембраны нексуса (H_n), отделившиеся от расположенной сверху клетки. Крупные частицы, образующие дискоидальный массив внизу справа в поле зрения, характерны для десмосом (Д). К — места отхождения кальвеол. Электронная микрофотография.

ческих субкатегорий. Известно, что они содержат как углеводородные, так и белковые остатки, но не являются катехоламинами [87]. Специфические гранулы той или иной категории выявлены во всех предсердных клетках (см. рис. 1.36), но они особенно сильно сконцентрированы вблизи миоплазмы полюса ядра.

В кардиомиоцитах любого типа с пластинчатым комплексом связаны многочисленные везикулы разного размера и формы, включая большие и маленькие полиморфные тела с плотным ядром (см. рис. 1.32) и небольшие покрытые оболочкой везикулы с прозрачным ядром (см. рис. 1.32). В цитоплазме полюса ядра часто встречаются короткие сегменты шероховатого эндоплазматического ретикулума и гладкого (саркоплазматического) ретикулума, и поэтому они могут казаться связанными с системой пластинчатого комплекса. Однако еще не ясно, до какой степени мембраны пластинчатого комплекса и эндоплазматического или саркоплазматического ретикулума могут сливаться [88].

Центриоли. Если при исследовании в клетках удастся выявить центриоли, то они обычно располагаются в миоплазме полюса ядра, часто вблизи пластинчатого комплекса. Опубликовано немного фотографий центриолей в клетках ткани желудочков сердца

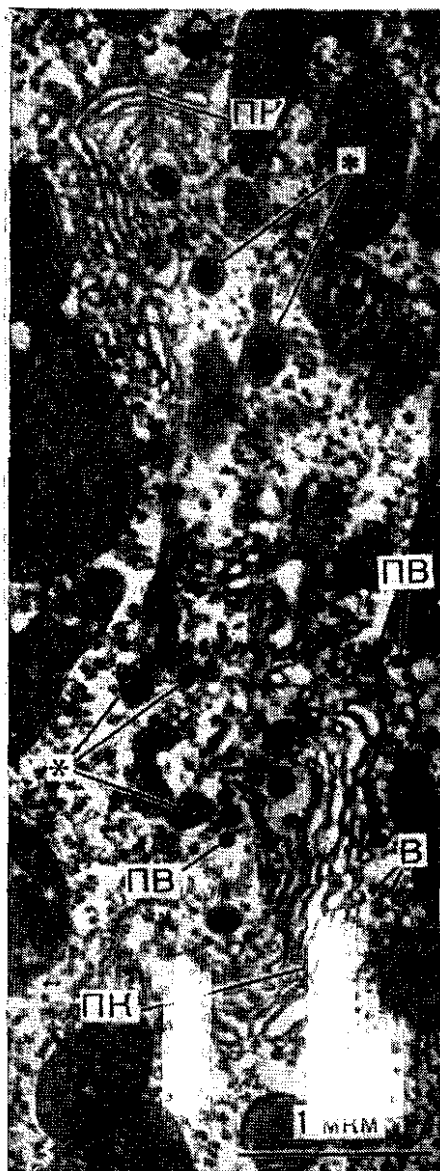
взрослых млекопитающих, однако центриоли часто выявляются в предсердных клетках. Исторически было трудно объяснить точную функцию центриолей, так как они не являются той естественной точкой, в которой собираются микротрубочки при образовании митотического веретена. Считают, что небольшое количество центриолей в кардиомиоцитах желудочков обусловлено низкой вероятностью обнаружения этих маленьких преимущественно парных образований в большом объеме миоплазмы тонких срезов [40]. Учитывая большую частоту встречаемости центриолей в кардиомиоцитах растущих желудочков сердца морской свинки и мыши (неопубликованные данные), можно предложить еще одно, хотя и чисто спекулятивное объяснение, а именно, что центриоли дегенерируют и исчезают вследствие окончания развития клеток желудочков, теряющих свои цитокинетические способности у взрослых животных (см. «Ядра»).

Покрываемые везикулы. В кардиомиоцитах выявляется множество различных везикулярных структур. Как было отмечено выше (см. «Пластинчатый комплекс и связанные с ним структуры»), характерным является наличие небольших покрытых оболочкой везикул, связанных с пластинчатым комплексом, которые в статическом тонком срезе могут существовать либо в свободном виде в миоплазме, либо слившимися с мешочками пластинчатого комплекса (см. рис. 1.32), указывая на участие этих везикул в динамических процессах. По всему объему кардиомиоцитов рассеяно небольшое число крупных везикул с оболочкой (рис. 1.33—1.35). Однако ни их происхождение, ни их функция до сих пор неясны. Такие везикулы обнаруживаются слившимися с сарколеммой (см. рис. 1.33) или ППТС либо свободными в миоплазме (см. рис. 1.34; 1.35).

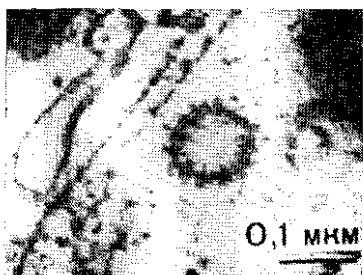
Лизосомы и другие включения. Количество самих лизосом в сердечной мышце очень невелико [5], однако с увеличением возраста животного все более обычным становится появление мембранно-связанных гранул липофусцина (см. рис. 1.17) (известных под собирательным названием «старческий пигмент») [89]. Липофусцин, по-видимому, является формой остаточных тел, продуктом лизосомального захвата и деградации других оргanelл, скорее всего митохондрий [4, 5]. Иногда обнаруживаются тела, состоящие из множества везикул и связанные с лизосомами [4].

В межмиофибрилярном и субсарколеммальном пространстве кардиомиоцитов обнаруживаются липидные образования и пероксисомы (микротела), которые можно дифференцировать друг от друга при помощи цитохимических методов. Пероксисомы, кроме способности реагировать с диаминобензидином и H_2O_2 , также характеризуются их расположением на А—I-уровне саркомеров [90].

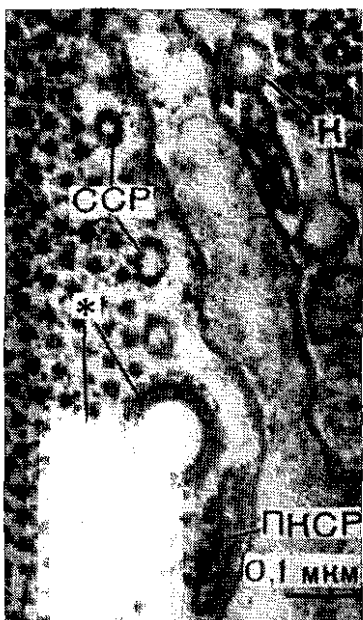
Частицы гликогена выявляются в кардиомиоцитах в разном количестве; β -частицы чаще встречаются в сердцах с низкой частотой ритма (как у кошек и собак), чем при высокой (как у мышей). Гранулы гликогена, сгруппированные вместе с образованием α -частиц, выявляются в тканях сердца эмбрионов и новорожденных и в некоторых клетках проводящей системы [91], однако они



1.33



1.34



1.35

Рис. 1.32. Миокардиальная клетка ткани желудка сердца мыши. Миоплазма полюса ядра, основную часть которой занимает пластинчатый комплекс (ПК). Хотя развитая система ПК в миокардиальных клетках выявляется редко, показанные на этом снимке структуры позволяют обобщить многочисленные особенности области пластинчатого комплекса. Кроме везикул с плотным ядром, различных размеров и формы (показаны звездочкой), которые выявляются на вогнутых участках искривленной поверхности цистерн, видно также большое количество небольших везикул (В), преимущественно связанных с растущими, вогнутыми мешочками ПК. На обеих сто-

не являются обычными для взрослых кардиомиоцитов желудочков В [4] отмечалось, что β -частицы относительно специфично располагаются между миофибриллами на уровне I-полос саркомеров, а частицы гликогена выявляются в различных местах миоплазматического пространства, например, в миоплазме около полюсов ядра, где их легко спутать с рибосомами (см. рис. 1.32).

ПРОВОДЯЩИЕ МИОКАРДИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ: ПРЕДСЕРДНО-ЖЕЛУДОЧКОВАЯ ПРОВОДЯЩАЯ СИСТЕМА

Характеристике клеток проводящей системы и путей проведения в сердце млекопитающих посвящено несколько вышедших относительно недавно обзоров [91—95]. В этих и других, более обширных, обзорах по структуре миокарда отмечалось большое число анатомических вариантов, которые могут быть обнаружены в физиологически близких клетках животных различных видов. Мы не будем пытаться суммировать все варианты структуры, а рассмотрим только некоторые наиболее яркие черты ультраструктуры клеток проводящей системы, описание которых в основном будет построено так же, как и описание клеток рабочего миокарда, представленное в предыдущих разделах.

Узловые клетки

Основными узлами ПЖПС, расположенными в области правого предсердия, являются синоатриальный (СА) и атриовентрикулярный (АВ). Часто не удается обнаружить никаких специфиче-

ронах ПК видны покрытые везикулы (ПВ). В миоплазме полюса ядра вместе с ПК выявляются рибосомы, микротрубочки и митохондрии. Электронная микрофотография.

Рис. 1.33. Покрытая везикула миокардиальной клетки ткани желудка сердца мыши, сливающаяся с поверхностной сарколеммой. Характерное покрытие частично образовано щетиноподобными выростами (показано стрелками). Электронная микрофотография.

Рис. 1.34. Покрытая везикула в глубине миокардиальной клетки ткани желудочка сердца мыши. Обратите внимание на сходство ее покрытия с покрытием везикулы, показанной на рис. 1.33. Электронная микрофотография.

Рис. 1.35. Поперечный срез участков двух соседних миокардиальных клеток ткани желудочка сердца мыши, на котором видны разнообразные везикулоподобные образования. Некоторые из них не являются истинными сферическими телами, например, поперечное сечение сети СР (ССР) на периферии миофибрилл или микротрубочки (МТ). С сарколеммой связаны кавеолы (К) прикрепленные к поверхности, и дистерны периферического контактного СР (ПКСР). Видны две аттичные везикулы (показано звездочкой), в одной из которых выявляется непрозрачное ядро. Электронная микрофотография.

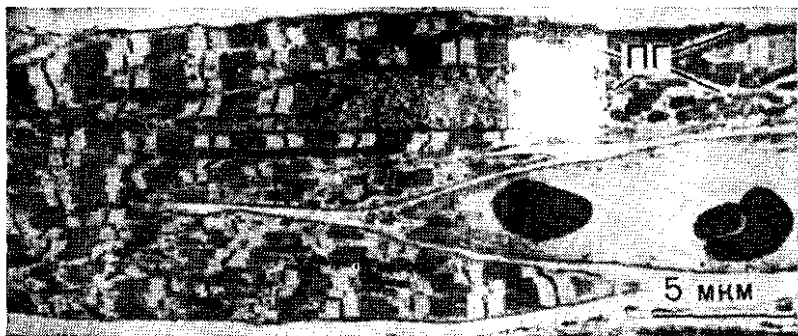


Рис. 1.36. Продольный срез миокарда стенки левого предсердия макаки ре-зуса. Видна толщина мышечных клеток предсердия (сравните с рис. 1.5). В миоплазме верхней клетки видны хаотично расположенные специфические предсердные гранулы (ШГ). Электронная микрофотография.

ческих путей проведения между этими узлами, так как на самом деле эти пути являются скорее физиологическими, чем анатомическими. В свою очередь АВ-узел дает начало пути проведения, проходящего в желудочки и разветвляющегося в них в виде проводящих сердечных миоцитов. (Однако, по-видимому, проведение из СА-узла в левое предсердие осуществляется по некоторым другим путям.) [92, 95] Узловые клетки часто подразделяют на два основных типа: клетки, относительно богатые миофибриллами, и клетки, в которых довольно мало сократительного материала. Различают также переходные формы от сократительных кардиомиоцитов к клеткам проводящей системы [91].

Достаточно надежной отличительной характеристикой узловых клеток на тонких срезах является их тенденция образовывать кластеры, содержащие несколько клеток (рис. 1.39; см. рис. 1.4); такая группировка, по-видимому, является результатом взаимопроникновения клеточных выростов вставочных дисков соседних клеток, которые в этих группах клеток имеют далеко не такую дискообразную форму, как в клетках рабочего миокарда, а, наоборот, состоят в основном из расположенных латерально контактных комплексов (см. рис. 1.39). Взаимопроникновение клеточных выростов в группе узловых клеток обычно развито настолько, что одна клетка может быть полностью окружена другой, причем в центре такой пары клеток выявляются небольшие клеточные выросты (см. рис. 1.39). Обычно в узловых клетках можно идентифицировать все три основных типа межмембранных контактов (см. «Межмембранные контакты»), но существует мнение, что в узловых клетках нексусы не занимают большую часть сарколеммы [5].

Вещество Z-дисков миофибрилл кардиомиоцитов СА- и АВ-узлов часто имеет необычное строение. В некоторых случаях в поперечном сечении Z-диска выявляются круглые отверстия



Рис. 1.37. Продольный срез миокарда стенки левого предсердия макаки ре-зуса. Вставочные диски имеют неправильную форму и преимущественно расположены в продольных складках сарколеммы. Кое-где видны нексусы (Н). Митохондрии (Mx) имеют меньшие размеры и не так многочисленны, как в клетках рабочего миокарда желудочков (сравните с рис. 1.7). Более низкая степень организации клеток предсердий заметна также потому, что даже в одном пучке миофибрилл компоненты саркомеров, включая Z-полосы (Z), могут располагаться на разных уровнях. Электронная микрофотография.

Рис. 1.38. Продольный срез миокарда стенки левого предсердия макаки ре-зуса. Область пластинчатого комплекса, где видны образующиеся и зрелые предсердные гранулы. Электронная микрофотография.

(рис. 1.40). Исследование сечений вдоль длинной оси клетки подтверждает отсутствие непрерывности Z-дисков во всей толще миофибрилл. Дополнительной особенностью миофибрилл клеток проводящей системы является то, что в них иногда удается обнаружить пролиферацию вещества Z-дисков [96], которое образует электронно-плотные сегменты миофибрилл (см. рис. 1.44; 1.45), напоминающие палочки, выявляемые при миопатии скелетных мышц.

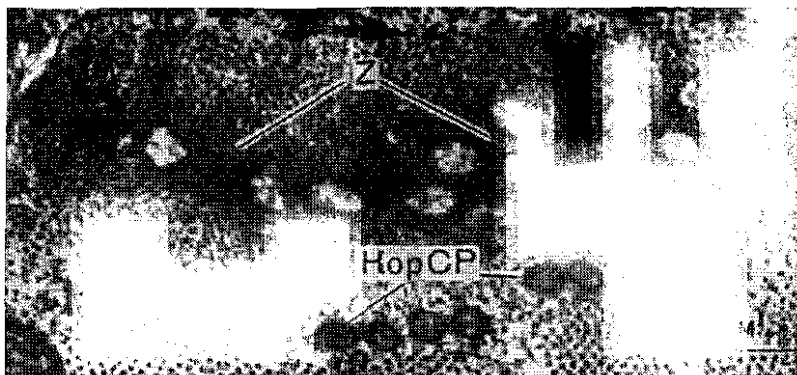


Рис. 1.39. Синоатриальный (СА) узел сердца макаки резуса. Сложное взаимопереплетение соседних клеток типично для группировки узловых клеток (см. также рис. 1.6). Вставочные диски узловых клеток характеризуются высокой степенью развития некусов (Н). Электронная микрофотография.

Рис. 1.40. Клетка СА-узла сердца макаки резуса. Z-диски этих клеток имеют множество крупных дефектов («отверстий»). Для таких клеток характерно также наличие многочисленных сферических образований «корбулярного» СР (КорСР). Электронная микрофотография.

Аналогичные образования наблюдаются в клетках рабочего миокарда, особенно у старых животных [97]. Такие «Z-палочки» [22], по-видимому, в основном (но не полностью) образованы тропмиозином. Их роль в нормальных клетках неясна, но морфологически схожие образования были предположены в качестве структуры, из которой образуются новые саркомеры [98]. Их присутствие в патологически измененной скелетной мышце, как считают, ухудшает сократимость миофибрилл, но такое препятствие, вероятно, имеет небольшое значение для клетки ПЖПС, так как их основной функцией является электрическая, а не механическая активность.

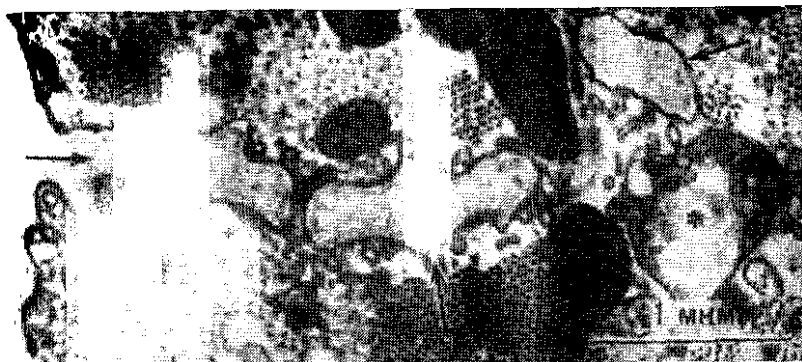


Рис. 1.41. СА-узел сердца кошки. Для некоторых узловых клеток характерны особые впячивания сарколеммы (показано стрелками), заполненные веществом поверхностной оболочки. Для таких клеток типично наличие заполненных гранулами тел (показано звездочкой), причем некоторые из них образуют контакт с поверхностной сарколеммой. Электронная микрофотография.

Саркоплазматический ретикулум узловых клеток состоит из сети СР, периферического контактного СР и многочисленных структур корбулярного (удаленный контактный) СР (см. рис. 1.40; «Саркоплазматический ретикулум»). В некоторых клетках обнаруживаются скопления ССР, локализация которых не связана специфически с миофибриллами, а, наоборот, они располагаются субсарколеммально, будучи смешанными с волокнистым материалом и частицами гликогена [99].

В настоящее время нет никаких достоверных данных о наличии в клетках ПЖПС поперечных тубул, еще меньше сведений мы имеем относительно ППТС (см. «Продольно-поперечная тубулярная система»). Тем не менее ряд наблюдений свидетельствует о том, что в этих клетках могут образовываться множество впячиваний (инвагинаций). Например [99, 100—103], были опубликованы микрофотографии, на которых видны зубцы, отходящие от поверхностной сарколеммы проводящих сердечных миоцитов. В СА-узле миокарда кошки определенные клетки (рис. 1.41) содержат большие окруженные мембраной и наполненные гранулами полости, которые, по-видимому, непрерывны с сарколеммой, учитывая наличие прикрепленных к ним иногда цистерн КСР. В некоторых случаях выявляются впячивания сарколеммы, близкие по форме к Т-тубулам (см. рис. 1.41). Приведенные выше наблюдения вызывают некоторое сомнение в правильности столь удачной гипотезы о возможности *de facto* распознать клетки ПЖПС по отсутствию ППТС. Вопрос о том, образуются ли описанные впячивания по механизму, аналогичному образованию ППТС, или нет, еще предстоит изучить. Решение этой проблемы имело бы важное значение для выявления параллелей в строении клеток сократительного миокарда и проводящей системы.

Волокна Пуркинье

Относительно проводящей сети желудочков сердца млекопитающих существует множество противоречивых мнений, начиная, по-видимому, с работ самого Purkinje [104] и кончая множеством других исследований, посвященных выяснению однозначной идентификации и региональной специфичности таких клеток [95]. Однако этот термин по-прежнему продолжает оставаться широко признанным, несмотря на то, что его точный смысл, по-видимому, еще предстоит установить. Достаточно сказать, что ПЖПС в желудочках в основном состоит из сильно ветвящейся сети клеток, расположенных субэндокардиально, которые можно отличить от соседних сократительных клеток на основании одного или нескольких структурных критериев. Проводящие сердечные миоциты, имеющие сильно вытянутую форму, отличаются от миоцитов рабочего миокарда отсутствием ППТС [105, 106]. Однако у животных некоторых других видов в клетках, относящихся к типу проводящих сердечных миоцитов, выявляются структуры, подобные Т-тубулам (см. предыдущий раздел). Копытные занимают крайнее положение в этом ряду, так как у них выявлены необычайно крупные проводящие волокна, практически полностью лишённые сократительного аппарата, без Т-тубул заполненные преимущественно гликогеном, часто резко выделяющиеся на внутренней поверхности желудочков [107, 108]. Были также предприняты попытки выделить различные категории проводящих сердечных миоцитов обезьяны [91].

Наши наблюдения, проведенные на сердце макаки резуса, подтверждают существование по крайней мере двух типов клеток в субэндокардиальной сети. Как и в случае узловых клеток, подразделение на две категории основывается на большей или меньшей встречаемости миофибриллярного материала (рис. 1.42; 1.43). Преобладают, по-видимому, клетки проводящей системы с более высоким содержанием миофибрилл; как и в случае узловых клеток, при исследовании клеток этого типа неизменно выявляется их связь с соседними при помощи вставочных дисков, глубоко внедряющихся в продольно ориентированные разрастания сарколеммы (см. рис. 1.42). Кроме того, в веществе Z-дисков таких клеток часто встречаются палочкообразные структуры (рис. 1.44; 1.45); такие структурные особенности выявлены также в клетках Пуркинье у коровы [109] и собаки [110]. Клетки с низким содержанием миофибрилл (возможно, соответствующие клеткам I типа, описанным Viragh, Challice) [91] можно обнаружить просто при просмотре микрофотографий, так как они выглядят более «прозрачными» по сравнению с другими клетками, непосредственно их окружающими (рис. 1.46; см. рис. 1.43). Сократительные элементы в таких клетках, подобно наблюдаемым в проводящих сердечных миоцитах у копытных, расположены преимущественно на периферии. Их границы загнуты, а межмиофибриллярное пространство (см. рис. 1.46) содержит небольшие митохондрии, микротрубочки и некоторое количество беспорядочно расположенного

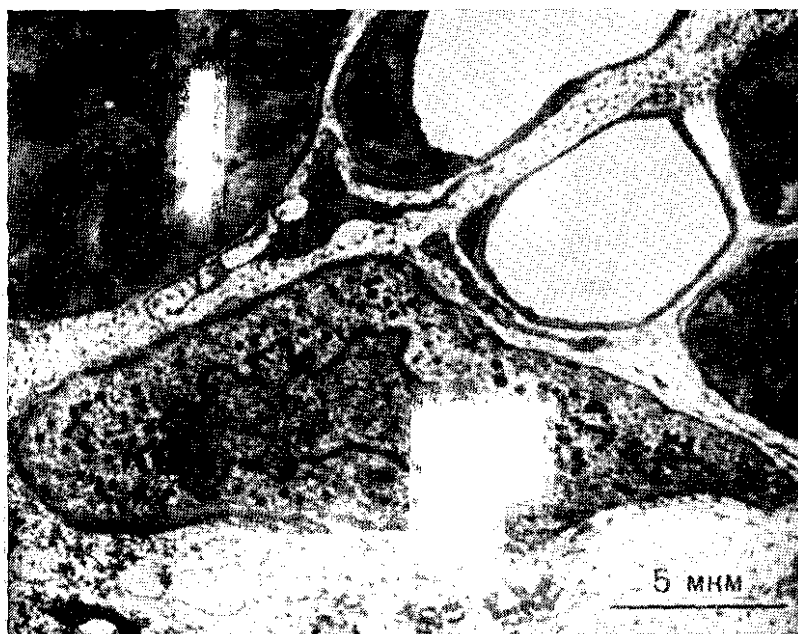
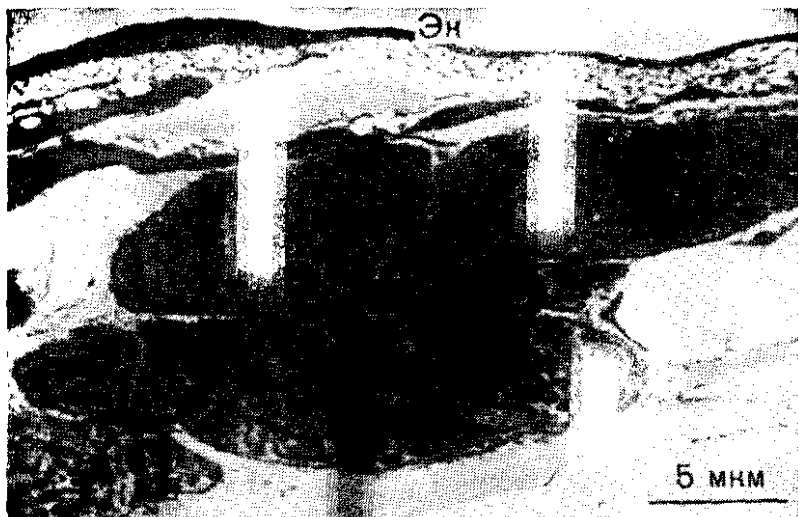


Рис. 1.42. Проводящий кардиомиоцит (клетка волокна Пуркинье) макаки резуса. Небольшие богатые миофибриллами кардиомиоциты, соединенные друг с другом посредством коротких участков слияния внешних поверхностей мембран соседних клеток (см. рис. 1.44) и образующие сеть тонких волокон сразу под эндокардом (Эк). Электронная микрофотография.

Рис. 1.43. Поперечный срез субэндокардиального проводящего кардиомиоцита типа 1 макаки резуса [91], который идентифицируется по своей более высокой прозрачности по сравнению с окружающими клетками рабочего миокарда. Более подробно показан на рис. 1.46. Электронная микрофотография.

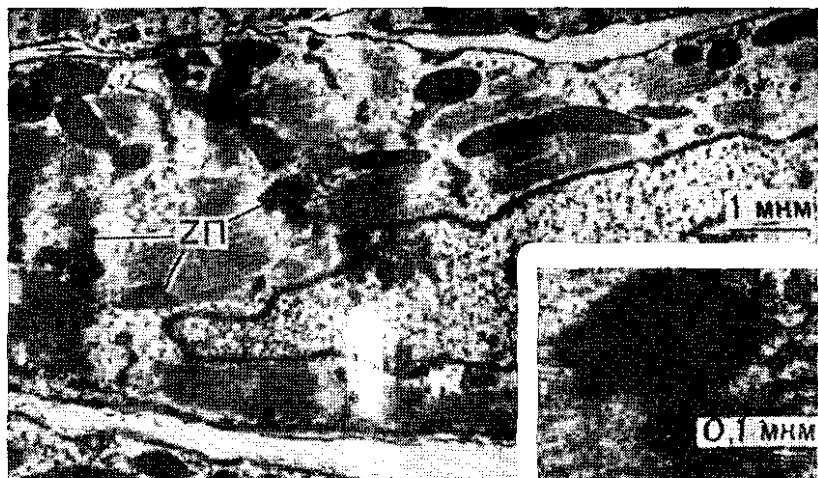


Рис. 1.44. Продольный срез субэндокардиального проводящего кардиомиоцита макаки резуса. Контакты между клетками занимают узкие участки (между стрелками). Области, заполненные веществом Z-полос, часто увеличены в размерах и образуют «Z-палочки» (ZП). Электронная микрофотография.

Рис. 1.45 Z-палочка при большом увеличении. Видна ее сложная структура. Электронная микрофотография.

волоконного материала (возможно, состоящего частично из промежуточных волокон) [111]. Короткие выпячивания сарколеммы создают волнистую поверхность вдоль растяжений границы клеток, а контактный CP отличается исключительно большой протяженностью, так что иногда он превращается в «протяженный» КСР (см. рис. 1.46), что является характерным признаком таких клеток.

З а к л ю ч е н и е

Важная роль сердечной мышцы в жизни любого организма и особенно организма человека обуславливает заслуженное внимание, уделяемое ей в научных исследованиях. Наши знания о структуре сердечной мышцы невероятно возросли за относительно короткий период времени, в течение которого проводится изучение ультраструктуры сердца [112]. Однако предостережения, высказанные Raymond Truex [94], все еще остаются необычайно актуальными. Он отмечал, что ограничения, связанные с использованием методов световой и электронной микроскопии, с одной стороны, необычайно важны, а с другой — существенно зависят от метода. С помощью световой микроскопии невозможно уверенно идентифицировать границы клетки. При использовании электронной микроскопии (особенно трансмиссионной) малые размеры образцов, связанные с применением тонких срезов, потенциально способны привести к неверным результатам, особенно относительно таких задач, как измерение максимальных размеров клетки, даже если разрешение при этом увеличено в тысячу раз. В по-

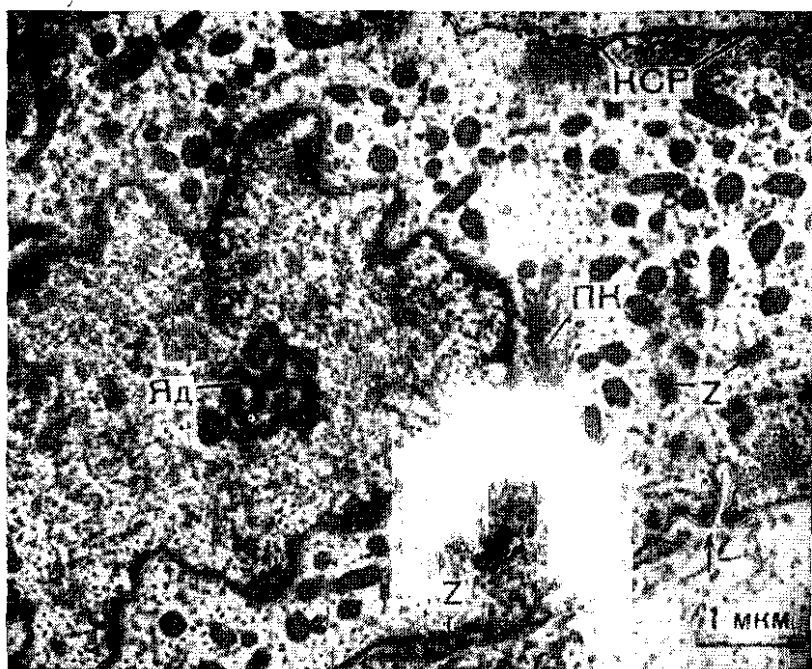


Рис. 1.46. «Светлый» проводящий кардиомиоцит при большем увеличении. Внутри ядра ясно видны ядрышко (Яд) и зазубренная оболочка. Миофибриллярное вещество встречается в небольшом количестве и имеет тенденцию локализоваться по периферии клетки. Вещество Z-полос (Z) образует маленькие плотные структуры различной формы. Небольшой по размерам пластинчатый комплекс располагается около ядра, и в прозрачной для электронного пучка миоплазме находится множество небольших митохондрий. Видные короткие участки впячивания сарколеммы (показано стрелками), заполненные веществом поверхностной оболочки. Вытянутые извилистые цистерны контактного СР (КСР) проходят около поверхностной сарколеммы, иногда образуя с ней контакты. Электронная микрофотография.

следние годы все чаще применяют одновременно несколько методов: сканирующую электронную микроскопию вместе с выделением одиночных клеток, получением реплик замороженных образцов со сколом, стереоскопическим изучением толстых срезов сердечной ткани с избирательным введением электронно-плотных красителей, а также реконструкцию формы клетки с помощью компьютера. Все это помогло заполнить пробел в наших знаниях, существовавший в 1974 г., когда практически ничего не было известно о миокарде при толщине срезов 5—50 нм. Тем не менее все еще остаются проблемы, в основном являющиеся следствием фундаментального принципа Гейзенберга: «ничто не может быть изучено без всяких изменений исследуемого объекта». Выделение одиночных миокардиальных клеток может приводить к разрушению структуры вставочных дисков, а обезвоживание в условиях критической точки, могут вызвать сильное сморщивание клеток.

- some formation, and intracellular digestion. — *J. Histochem. Cytochem.*, 1982, vol. 30, p. 717—733.
89. *Tomanek J., Karlsson U. L.* Myocardial ultrastructure of young and senescent rats. — *J. ultrastruct. Res.*, 1973, vol. 42, p. 201—220.
 90. *Herzog V., Fahimi H. D.* Identification of peroxisomes (microbodies) in mouse myocardium. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1976, vol. 8, p. 271—281.
 91. *Viragh S., Challice C. E.* The impulse generation and conduction system of the heart. — In: *Ultrastructure of the mammalian heart*/Ed. C. E. Challice, S. Viragh. New York: Academic, 1973, p. 43—90.
 92. *James T. N., Sherf L.* Specialized tissues and preferential conduction in the atria of the heart. — *Amer. J. Cardiol.*, 1971, vol. 28, p. 414—427.
 93. *James T. N., Sherf L., Urthaler F.* Fine structure of the bundle-branches. — *Brit. Heart J.*, 1974, vol. 36, p. 1—18.
 94. *Truex R. C.* Structural basis of atrial and ventricular conduction. — *Cardiovasc. Clin.*, 1974, vol. 6, p. 2—24.
 95. *Sherf L., James R. N.* Fine structure of cells and their histological organization within internodal pathways of the heart: clinical and electrocardiographic implications. — *Amer. J. Cardiol.*, vol. 44, p. 345—369.
 96. *Colborn G. L., Garsey E. Jr.* Electron microscopy of the sinoatrial node of the squirrel monkey *Saimiri sciureus*. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1972, vol. 4, p. 525—536.
 97. *Fawcett D. W.* The sporadic occurrence in cardiac muscle of anomalous Z bands exhibiting a periodic structure suggestive of tropomyosin. — *J. Cell. Biol.*, 1968, vol. 36, p. 266—270.
 98. *Legato M. J.* Sarcomerogenesis in human myocardium. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1970, vol. 1, p. 425—437.
 99. *Rybicka K.* Sarcoplasmic reticulum in the conducting fibers of the dog heart. — *Anat. Rec.*, 1977, vol. 189, p. 237—262.
 100. *Osculati F., Garibaldi E.* Particolari strutturali delle fibre del Perkinje del cuore di ratto; osservazioni al microscopio elettronico effettuate anche applicando la tecnica della perossidasi. — *Boll. Soc. Med. Chir. (Pavia)*, 1974, vol. 88, p. 403—437.
 101. *Osculati F., Garibaldi E.* Fine structural aspects of the Purkinje fibres of the dog's heart. — *J. submicr. Cytol.*, 1974, vol. 6, p. 39—53.
 102. *Osculati F., Amati S., Petrini E.* et al. Ultrastructural investigation on the Purkinje fibres of rabbit's and cat's heart. — *J. submicr. Cytol.*, 1978, vol. 10, p. 185—197.
 103. *Osculati F., Amati S., Pettini E.* et al. A study of the organization of the tubular endoplasmic reticulum in the rat heart conduction fibres. — *J. submicr. Cytol.*, 1978, vol. 10, p. 371—380.
 104. *Robb J. S.* Comparative basic cardiology. New York: Grune and Stratton, 1965.
 105. *Sommer J. R., Johnson E. A.* Cardiac muscle: a comparative study of Purkinje fibers and ventricular fibers. — *J. Cell. Biol.*, 1968, vol. 36, p. 497—526.
 106. *Kim S., Baba N.* Atrioventricular node and Purkinje fibers of the guinea pig heart. — *Amer. J. Anat.*, 1971, vol. 132, p. 339—354.
 107. *Thornell L. E.* The fine structure of Purkinje fiber glycogen: a comparative study of negatively stained and cytochemically stained particles. — *J. ultrastruct. Res.*, 1974, vol. 49, p. 157—166.
 108. *Thornell L. E.* An ultrahistochemical study on glycogen on cow Purkinje fibers. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1974, vol. 6, p. 439—448.
 109. *Thornell L. E.* Ultrastructural variations of Z bands in cow Purkinje fibers. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1973, vol. 5, p. 409—417.
 110. *Martinez-Palomo A., Alanis J., Benitez D.* Transitional cardiac cells of the conductive system of the dog heart: distinguishing morphological and electrophysiological features. — *J. Cell. Biol.*, 1970, vol. 47, p. 1—17.
 111. *Thornell L.-E., Ericksson A.* Filament systems in the Purkinje fibers of the heart. — *Amer. J. Physiol.*, 1981, vol. 241, p. H291—H305.
 112. *Weinstein H. J.* An electron microscope study of cardiac muscle. — *Exp. Cell. Res.*, 1954, vol. 7, p. 130—146.

Глава 2

ОСНОВНЫЕ ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В МИОКАРДЕ. СВЯЗЬ С МИОКАРДИОПАТИЯМИ

Л. М. БУЙА (L. M. BUJA)

ВВЕДЕНИЕ

В широком смысле слова под термином «миокардиопатия» понимают заболевания сердечной мышцы. В этой главе дан обзор некоторых основных патологических процессов, развивающихся в миокарде, и обсуждается связь таких процессов с различными миокардиопатиями. Дополнительные сведения о некоторых из этих патологических процессов приведены в других главах этой книги.

ИШЕМИЯ МИОКАРДА

Ишемия миокарда — это состояние относительного дефицита поступления кислорода с кровью по отношению к глобальным или локальным потребностям сердца в кислороде [1, 2]. Первым следствием ишемии является нарушение процесса электромеханического сопряжения, приводящее к снижению или полной потере сократительной активности. Вторым следствием ишемии является развитие в миокарде аномальной электрической активности, которая может привести к возникновению аритмий. Третьим следствием ишемии, если она достаточно глубокая и продолжительная, является постепенное повреждение структуры клеток вплоть до необратимой фазы гибели клеток (инфаркт миокарда).

Этиология и патофизиология

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) у человека обычно является следствием коронарного атеросклероза, т. е. заболевания, при котором происходит ухудшение условий коронарной перфузии вследствие роста атеросклеротической бляшки на стенке сосуда или же вследствие тромбоза [2]. Коронарные артерии подвержены также неатероматозным заболеваниям, включающим в себя врожденные аномалии, эмболию, расслаивание и аневризмы. Болезнь коронарных сосудов обычно захватывает эпикардальные артерии, однако в некоторых случаях ИБС может существенно затронуть и небольшие интрамуральные артерии.

Отсутствие строгой связи между степенью анатомического повреждения коронарных сосудов и разнообразием и тяжестью клинических проявлений ИБС указывает на ее динамическую

природу [2—5]. Ряд факторов влияет на взаимодействие миокарда с гладкой мускулатурой коронарных сосудов. Известно, что потребность миокарда в кислороде преимущественно зависит от частоты сердечного ритма, состояния сократительной системы и напряжения стенок полостей сердца (на которое влияет артериальное давление). При гипертрофии желудочков и сердечной недостаточности эти параметры изменяются, вызывая увеличение потребности миокарда в кислороде.

В случае локального стеноза коронарной артерии коронарный кровоток при нагрузке начинает снижаться при уменьшении диаметра просвета сосуда на 50% (т. е. уменьшение площади просвета на 75%), а ухудшение кровотока в покое наблюдается при уменьшении диаметра на 80% [2]. Однако тяжесть нарушения функций сердца при атеросклерозе коронарных сосудов зависит и от ряда дополнительных факторов. К ним относятся наличие множественных стенозов, степень развития коронарного коллатерального кровообращения и повышенные потребности миокарда в кислороде. На коронарный кровоток также влияют тонус коронарных сосудов, артериальное давление (в частности, диастолическое перфузионное давление) и факторы, связанные с кровью, такие, как объем крови, гематокрит, вязкость, константа диссоциации гемоглобина и кислорода, состояние свертывающей системы и тромбоцитов.

При наличии локальных повреждений стенок коронарных сосудов ИБС может проявляться рецидивирующими острыми приступами стенокардии. Последние могут быть инициированы спазмом коронарных сосудов, агрегацией тромбоцитов и тромбозом (схема 2.1) [4—7].

Внутрикоронарный тромбоз играет важную роль в развитии ИБС [2]. Тромбы состоят из гранулированных агрегатов тромбоцитов, расположенных в месте инициации тромба, а также из свернувшихся компонентов крови, локализующихся проксимальнее и дистальнее места инициации. Повторяющиеся случаи образования небольших тромбов играют определенную роль в росте осложненных атеросклеротических бляшек. Кроме того, образование стенозирующих пристеночных тромбов принимает участие в патогенезе тяжелых приступов ИБС, включая острый трансмуральный инфаркт миокарда.

Появление стенозирующих внутрикоронарных тромбов часто связано с эрозией бляшки, ее изъязвлением, разрывом и (или) кровотечением [2—5]. Эти данные позволяют предположить, что основные события, приводящие к коронарному тромбозу, происходят на стенке сосуда. Обычно при этом наблюдаются мягкие бляшки с развитым атероматозным ядром и тонкой фиброзной капсулой. К причинным факторам относятся хроническая гемодинамическая травма, воспалительное или химическое повреждение эндотелия и субэндотелиальной ткани или повышенное давление внутри бляшки вследствие инфильтрации в нее крови и спазма сосуда. В некоторых случаях коронарные тромбы образуются без идентифицируемых повреждений стенки артерии.

Схема 2.1. Патогенетические механизмы основных синдромов ИБС в острой стадии



Стенозирующие внутрикоронарные тромбы выявляются более чем в 90% случаев трансмурального инфаркта, в 30—50% случаев субэндокардиального инфаркта, реже у больных с нестабильной стенокардией (без признаков обширного инфаркта) и у умерших внезапно до госпитализации [2—5]. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что именно стенозирующий внутрикоронарный тромбоз определяет в конечном итоге степень тяжести инфаркта миокарда. Кроме того, в возникновении острых ишемических приступов участвуют дополнительные факторы, которые также могут привести к образованию тромба и дальнейшему усилению тяжести инфаркта. В некоторых случаях важным фактором может быть чрезмерное повышение потребности миокарда в кислороде. В других случаях такими факторами являются по-

вреждение стенки сосуда, агрегация тромбоцитов и спазм коронарных сосудов.

В настоящее время ясно, что между патофизиологией обычной формы внезапной смерти и патофизиологией острого инфаркта миокарда имеется существенное различие [1—6]. В большинстве случаев причиной внезапной смерти сердца является нарушение ритма желудочков, обычно их фибрилляция. Такое нарушение ритма может быть следствием острого приступа ишемии или активации эктопического фокуса, существующего в области хронического повреждения миокарда с измененной электрической активностью. У большинства больных, реанимированных после внезапной смерти, не обнаруживалось никаких признаков обширного инфаркта миокарда. Лишь в редких случаях при внезапной смерти выявляется коронарный тромбоз и (или) острый инфаркт миокарда. У таких больных аритмия скорее всего развивается вторично по отношению к повреждению коронарных сосудов и миокарда.

Спазм коронарной артерии обусловлен локальным повышением тонуса стенки сосуда, приводящим к внезапному сужению или полной окклюзии артерии [2, 5—7]. Показано, что спазм одной из основных коронарных артерий является причиной стенокардии Принцметала. Спазм крупных и мелких коронарных артерий может также играть определенную роль при других формах ИБС. Этиология спазма коронарных сосудов неясна. Одной из причин могут быть изменения активности вегетативной нервной системы. Хотя у больных со спазмом коронарных артерий не наблюдается общего расстройства деятельности вегетативной нервной системы, имеются сведения о связи спазма коронарных артерий с другими вазоспастическими расстройствами. Кроме того, активация α -адренергической системы в результате холодового теста у страдающих ИБС может приводить к сужению коронарных сосудов и снижению коронарного кровотока. Проведенные в последние годы исследования выявили сложное взаимодействие между эндотелием сосудов и тромбоцитами, обусловленное синтезом в эндотелиальных клетках простаглицлина, вещества, обладающего вазодилатирующими и антиагрегационными свойствами, в то время как тромбоциты продуцируют тромбоксан A_2 , способствующий вазоконстрикции и агрегации тромбоцитов. Были также отмечены увеличение агрегации тромбоцитов и повышенный уровень тромбоксана у больных при остром приступе ИБС. Агрегация тромбоцитов связана с освобождением тромбоксана A_2 , сильного вазоконстриктора коронарных сосудов, который может вызвать спазм или же усилить таковой, вызванный другим механизмом. Эти наблюдения позволяют предположить, что нарушение баланса простаглицлин-тромбоксановой системы может принимать участие в агрегации тромбоцитов и развитии спазма. Первопричиной развития спазма могут быть также изменения в гладкомышечных клетках меди, которые, по-видимому, связаны с нарушением обмена ионов кальция и (или) магния.

Для выяснения взаимосвязи между коронарным спазмом и

агрегацией тромбоцитов при различных клинических синдромах ИБС необходимы дальнейшие исследования. У больных с классической стенокардией Принцметала, особенно при минимальном поражении коронарных артерий, по-видимому, основной причиной является коронарospазм, агрегация же тромбоцитов играет лишь второстепенную роль. В случае нестабильной стенокардии, особенно при значительно выраженном атеросклерозе, основную роль играет агрегация тромбоцитов или рост атероматозной бляшки, которые развиваются без участия спазма сосудов и способны самостоятельно вызвать коронарospазм.

У больных, переживших один или несколько острых приступов ишемии миокарда, может развиться тяжелая хроническая ИБС. Она проявляется повторяющимися приступами стенокардии, аритмией, аномалией проведения, кардиомегалией и застойной сердечной недостаточностью. При патологоанатомических исследованиях выявляются атеросклероз коронарных артерий, часто с одним или несколькими участками окклюзии; увеличение размеров сердца с гипертрофией и дилатацией левого желудочка; сильно развитый мозаичный (точечный) фиброз миокарда и (или) один или несколько участков рубцового заживления миокарда после инфаркта. Тяжелые случаи клинических и патологических изменений объединяют под названием «ишемическая миокардиопатия».

Экспериментальное изучение ишемического повреждения

Важная информация о механизме повреждения миокардиальных клеток была получена в исследованиях ишемии миокарда, возникающей в сердце экспериментальных животных при окклюзии коронарной артерии [1]. Инфаркт миокарда развивается в области риска (bed-at-risk), кровоснабжение которой осуществлялось через поврежденный сосуд [8]. Основным следствием инфаркта является локальный коагуляционный некроз. Однако в пределах области риска наблюдаются топографические различия в степени повреждения миоцитов (рис. 2.1) [9, 10]. В центральной, преимущественно субэндокардиальной области, в клетках доминирующего типа наблюдаются перерастянутые миофибриллы, комкообразный ядерный хроматин, митохондрии с аморфными уплотнениями матрикса и дефекты плазматической мембраны. Три последних признака указывают на необратимое повреждение. В промежуточной области находят некротизированные мышечные клетки с признаками кальциевой перегрузки, выражающейся в пересокращении миофибрилл с зонами контрактуры и, иногда, в отложении фосфата кальция в митохондриях. В таких клетках также наблюдаются аморфные уплотнения матрикса, дефекты плазматической мембраны, комкообразный хроматин и различное количество липидных капель. Во внешней области зоны инфаркта в мышечных клетках выявляются выраженная аккумуляция липидных капель и другие изменения, характерные для поврежде-

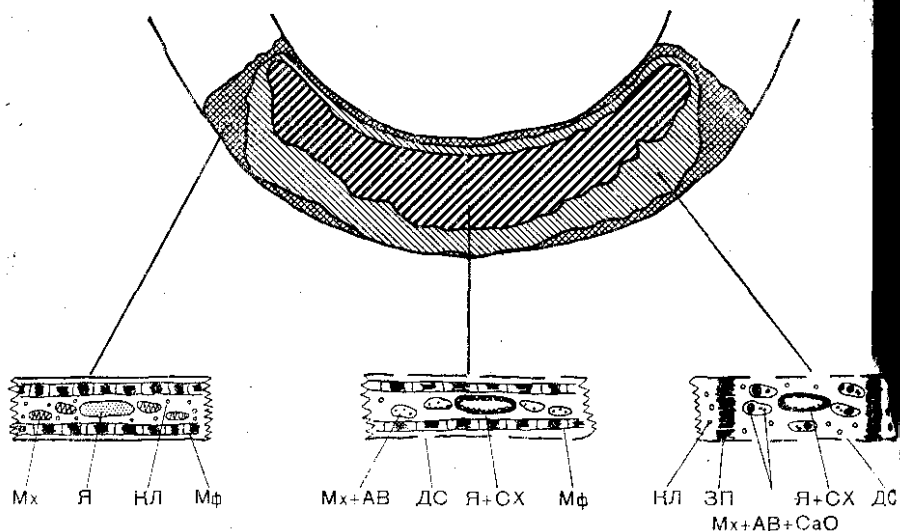


Рис. 24. Примеры повреждения кардиомиоцитов при остром инфаркте миокарда.

ЗП — зоны пересокращения миофибрилл; НЛ — капли липидов; Мф — миофибриллы; Мх — митохондрии; Мх+АВ — митохондрии с аморфными включениями в матриксе; Мх+АВ+СаО — митохондрии с аморфными включениями в матриксе и отложениями фосфата Ca^{2+} ; Я — ядро; Я+СХ — ядра со сморщившимся хроматином; ДС — дефекты сарколеммы.

ния клеток, однако в них не наблюдается нарушений, характерных для развитого некроза.

Многие исследования были посвящены вопросу развития необратимого повреждения в области риска [2, 8]. Их результаты указывают, что тяжесть и скорость развития повреждения определяются степенью и скоростью развития ишемии. Величина зоны некроза зависит от размера области риска и степени ишемии, на которую в свою очередь влияет величина коллатерального кровотока в области риска после окклюзии магистральной коронарной артерии [8]. При глубокой ишемии (сохранение менее 10—15% нормального кровотока) уже через 40—60 мин после окклюзии коронарной артерии развивается обширное необратимое нарушение. Так как для субэндокарда характерен более тонкий баланс между поступлением кислорода с кровью и потребностью миокарда в кислороде в нормальных условиях без нагрузки и именно в субэндокарде этот баланс сильнее всего нарушается при окклюзии коронарной артерии, то этот миокардиальный слой повреждается в первую очередь. Через 3—6 ч после окклюзии коронарной артерии область распространения некроза достигает субэпикарда. После этого уже не наблюдается существенного распространения зоны некроза на другие участки миокарда.

При инфаркте миокарда различные формы повреждения миокардиальных клеток связаны со скоростью распространения последнего в различных участках области риска. Кроме коагуляци-

онного некроза, ишемия может также приводить к лизису миоцитов [2, 11], проявляющемуся отеком миокарда и лизисом миофибрилл с возможным развитием полного цитолиза.

Механизм необратимого повреждения

В условиях гипоксии или ишемии происходит нарушение ряда метаболических процессов в кардиомиоцитах, лишенных поступления кислорода [1]. Кроме того, происходит повреждение плазматической мембраны [12—14]. Раньше всего нарушаются функции специфических мембранных насосов, таких как (Na^+, K^+) -АТФаза, и постепенно увеличивается проницаемость мембраны. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что наступление необратимых изменений коррелирует с появлением обширных дефектов мембраны, при которых изменяется ее проницаемость для поливалентных ионов и происходит деградация фосфолипидов [13, 14].

Нарушение функций мембраны приводит к: а) изменению потоков ионов натрия, калия, хлора и воды, что вызывает разбухание клеток; б) превышению поступления ионов кальция в клетки над их выведением, что вызывает развитие токсических эффектов этого катиона. Степень разбухания клеток и величина аккумуляции кальция определяются тем, насколько легко внеклеточная жидкость проникает внутрь клеток. Однако в участках миокарда с высокой степенью ишемии даже небольшие потоки электролитов и воды, вызванные облегчением обмена между внутриклеточным и внеклеточным пространством, вызывают значительное повреждение клеток.

Развитие необратимого ишемического повреждения зависит от ряда патофизиологических факторов. Было обнаружено, что в этом процессе могут принимать участие изменения в адренергической нервной системе. После окклюзии коронарной артерии в ишемическом миокарде наблюдается увеличение числа выявляемых β - и α -адренергических рецепторов [15, 16]. Ишемия также вызывает освобождение норадреналина из нервных окончаний [17]. Повышение в зоне ишемии концентрации катехоламинов, действующих в данном случае на кардиомиоциты с измененной регуляцией рецепторов, может играть определенную роль в развитии ишемического повреждения.

ТОКСИЧЕСКОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ МИОКАРДА

Известно, что ряд токсических воздействий вызывает повреждение миокарда независимо от снижения коронарного кровотока [18, 21]. Классическим примером острого токсического повреждения является некроз миокарда, вызванный введением слишком высоких доз изопроterenола или других биогенных аминов [22, 23]. В этом случае кардиотоксикоз характеризуется разрушением мы-

печных клеток с пересокращением миофибрилл, зонами контрактуры и отложением кальция в митохондриях. Общая картина повреждения аналогична наблюдаемой в периферической зоне инфаркта миокарда. Она, по-видимому, всегда появляется в тех случаях тяжелого повреждения миокарда, когда до некоторой степени сохраняется коронарная перфузия (либо в случае окклюзии с последующей реперфузией, либо при наличии коллатерального кровотока, либо при токсическом повреждении с ненарушенной перфузией). Аналогичные признаки острого повреждения миокарда отмечаются при многих других токсических воздействиях на сердце (схема 2.2) [18, 19].

Механизм повреждения миокарда при отравлении катехоламинами заключается в активации адренергических рецепторов, стимуляции метаболизма миокарда и увеличении потребления миокардом кислорода. Относительно высокая степень несоответствия между поступлением кислорода с кровью и потребностью миокарда в кислороде может привести к запуску явлений, возникающих при ишемическом повреждении. Необратимая фаза повреждения связана с выраженными дефектами сарколеммальной проницаемости [22, 23].

Другая форма токсического повреждения выявляется при реакции миокарда на антрациклиновые антибиотики, дауномицин и адриамицин [19, 20, 24, 25]. В дополнение к эффектам, наблюдающимся в острой стадии, эти вещества вызывают хронический кардиотоксикоз, который может привести к развитию тяжелой сердечной недостаточности. С биологической точки зрения это явление можно описать как задержанную реакцию на кумулятивное действие вещества. При таких отравлениях у больных наблюдаются расширение сердца и сильные кровотечения. Микроскопические исследования выявляют многофокусные изменения вакуолей миоцитов, связанные с расширением в различной степени саркоплазматического ретикулума и Т-тубул, лизисом миофибрилл и дегенеративными изменениями в митохондриях. Морфологически такие повреждения представляют особый тип миоцитоллиза, являющегося другой общей формой реакции на повреждение миокарда [11].

Патогенез кардиотоксикоза при отравлении адриамицином еще не до конца выяснен. К возможным механизмам его действия относятся разрушение мембраны, вероятно, вызванное образованием свободных радикалов [25, 26], нарушение синтеза белков вследствие влияния на пуклейновые кислоты [27] и изменения метаболизма катехоламинов и гистамина [28].

Токсическое повреждение сердца может быть этиологическим фактором, а также участвовать в патогенезе кардиомиопатии, однако возможность перехода острой стадии заболевания в хроническую под действием токсических соединений для многих из них еще не доказана. Кардиотоксикоз, вызванный антрациклинами, заслуживает особого внимания, так как демонстрирует развитие миокардиопатии в результате кумулятивного действия экзогенных химических веществ (см. схему 2.2).

С х е м а 2.2. Клинико-патологические признаки миокардиопатий, вызванных действием различных соединений. По [6]

	Острые токсические или аллергические миокардиопатии	Миокардиопатии, вызванные антрациклиновыми антибиотиками	Миокардиопатии, вызванные кобальтом	Лекарство или вещество
Лекарство или вещество	Большинство кардиотоксичных веществ	Даунорубин, адриамицин	Кобальт	Этиловый спирт
Токсикология	Развитие в течение курса терапии; несомненная зависимость от дозы	Реакция с задержкой при накоплении определенной дозы	Действие, возможно, зависит от дозы; не исключена многофакторная этиология	Не исключена многофакторная этиология
Клинические признаки	Ишемия, нарушения ритма, острая сердечная недостаточность, внезапная смерть	Скоротечное развитие сердечной недостаточности	Скоротечное развитие сердечной недостаточности	Прогрессирующая сердечная недостаточность
Патологические изменения	Мультифакторные повреждения миокарда без развития генерализованной кардиомегалии	Кардиомегалия с muralным тромбозом, фиброзом интерстициального пространства и дегенерацией миокарда	Кардиомегалия с muralным тромбозом, фиброзом интерстициального пространства и дегенерацией миокарда	Кардиомегалия с muralным тромбозом, фиброзом тромботических масс и интерстициального пространства и дегенерацией миокарда

Инфекция и воспаление

Некоторые вирусы, бактерии и другие микроорганизмы способны вызывать острые миокардиты [29—32]. Исходом заболевания может быть смерть или полное излечение, однако в некоторых случаях могут возникать рецидивы по общей картине течения болезни, напоминающие идиопатическую миокардиопатию [29—32]. Исследования патогенеза вирусных миокардитов позволяют предположить, что, хотя этот процесс инициируется вирусной инфекцией, болезнь может поддерживаться за счет реакции самого организма-хозяина. Одним из таких механизмов является пролиферация особой популяции кардиотоксических лимфоцитов которые могут атаковать миоциты, измененные в результате перенесенной вирусной инфекции [31].

Заболевание сердца может быть следствием аутоиммунной реакции, что доказано для случаев острого ревматизма и хронического ревматического заболевания сердца. Возможно, что аутоиммунные явления, не столь четко выявленные при некоторых других миокардиопатиях, могут играть определенную роль в их возникновении и развитии [33—37].

Гипертрофия и недостаточность

Гипертрофия является одной из основных реакций сердца на увеличение нагрузки, при которой происходит увеличение массы одного или обоих желудочков или предсердий [38—40]. Механизм этой реакции заключается в основном в увеличении массы отдельных кардиомиоцитов без увеличения их числа.

На нормальный рост и развитие сердца оказывают влияние некоторые важные процессы, происходящие до рождения. В начальной стадии эмбрионального развития при росте сердца происходит увеличение и дифференциация кардиомиоцитов. Приблизительно к моменту рождения миоциты теряют способность к митотическому делению, а значительное число миоцитов становится двуядерными, по-видимому, в результате последнего деления ядра без цитокинеза [41]. При последующем нормальном росте сердца происходит синтез миофибрилл и других органелл в уже существующих миоцитах.

Под гипертрофией понимается дальнейшее увеличение массы сердца выше нормальной величины при усилении гемодинамической нагрузки: посленагрузки (нагрузка давлением), или преднагрузки (нагрузка объемом), или и той, и другой одновременно. Гипертрофия развивается в ответ на физиологические стимулы как при физических упражнениях, так и при многих патологических состояниях. В настоящее время остается неясным, происходят ли при физиологической и патологической гипертрофии одни и те же реакции или же они различны [42, 43]. Не установлен также и механизм, инициирующий гипертрофию на клеточном уровне [38—48]. Согласно имеющейся точке зрения, повышение физической нагрузки прямо стимулирует усиление синтеза бел-

Схема 2.3. Патофизиологические механизмы гипертрофии сердца при хронической ИБС. По [6]



ков, приводящее к увеличению клеточной массы. Важным признаком, предсказывающим реакцию сердца на различные стимулы, является снижение напряжения в стенке желудочка до нормы в соответствии с законом Лапласа, в результате развития гипертрофической реакции [42, 48]. В альтернативной гипотезе подчеркивается важность других факторов, таких как кратковременная ишемия, изменение уровня макроэргических фосфатов и другие нарушения клеточного метаболизма. Утверждают, что эти факторы служат связующим звеном между гемодинамическими воздействиями и усилением синтеза белков, сопровождающимся увеличением размеров кардиомиоцитов. На схеме 2.3 показано возможное взаимодействие факторов, приводящих к гипертрофии миокарда при одном из заболеваний, а именно при ИБС [49]. Более глубокое изучение молекулярных основ гипертрофии требует дальнейших фундаментальных исследований регуляции метаболизма белков и нуклеиновых кислот в сердечной мышце.

Одним из основных патологических процессов в миокарде является также сердечная недостаточность [50, 51]. Это явление

характеризуется как патологическое состояние, при котором сердце не способно перекачивать достаточное количество крови для обеспечения метаболизма периферических тканей. Этот процесс обычно является результатом недостаточности левого или правого желудочков или их обоих. Однако сердечная недостаточность может быть также следствием заболевания перикарда, митрального стеноза, острой клапанной недостаточности и других причин. Она может развиваться как в нормальном, так и в гипертрофированном сердце. Обычно такая реакция проявляется расширением камер желудочков, однако не обнаружено тесной корреляции между таким расширением и явной сердечной недостаточностью, так как в желудочках с хронической объемной перегрузкой также наблюдается расширение камер при отсутствии каких-либо признаков сердечной недостаточности.

При описываемой патологии выявляется ряд биохимических изменений в сердце [52—55]. К основным из них относятся снижение энергетического метаболизма, ухудшение использования энергии или нарушение электромеханического сопряжения. Согласно имеющимся данным, самым ранним изменением клеточного метаболизма в некоторых случаях сердечной недостаточности является разобщение процесса электромеханического сопряжения вследствие нарушения гомеостаза Ca^{2+} . В частности, в этих исследованиях обнаружены изменения поглощения и освобождения Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулула, возможным следствием которых является уменьшение количества Ca^{2+} , участвующего в активации сердечного сокращения [52—55].

Перечисленные выше соображения указывают, что основным механизмом развития сердечной недостаточности являются диффузные повреждения внутриклеточных органелл. Другая гипотеза патогенеза сердечной недостаточности, согласно которой причиной сердечной недостаточности является мультифокальный некроз миокардиальных волокон, была предложена Sonnenblick и соавт. [56]. Сердечная недостаточность начинает проявляться, когда погибает некоторое критическое количество миоцитов, и оставшиеся миоциты, хотя и функционируют нормально, не способны больше поддерживать необходимую работоспособность желудочков. Sonnenblick и соавт. предположили, что мультифокальный (рассеянный) некроз миоцитов при некоторых типах миокардиопатий и при сердечной недостаточности инициируется спазмом коронарных сосудов.

Определенную роль в патофизиологии застойной сердечной недостаточности играют также изменения в вегетативной нервной системе [55, 57]. По мере развития недостаточности происходит увеличение освобождения катехоламинов в миокарде, и в крови больных повышается уровень циркулирующих катехоламинов. Недавно было показано, что на конечной стадии сердечной недостаточности происходит уменьшение количества β -адренергических рецепторов в миокарде [58]. Нарушение работы сердца при недостаточности, по-видимому, в какой-то мере связано с понижением реакции сердца на адренергическую стимуляцию.

Типы кардиомегалии

Форма сердца при кардиомегалии дает важную информацию относительно природы лежащих в ее основе патологических процессов (рис. 2.2) [39, 40, 59]. Расширение сердца без гипертрофии указывает на развитие острой сердечной недостаточности. Оно характеризуется нормальной массой сердца, увеличением объема желудочков и уменьшением толщины стенок. Расширение желудочков приводит к постепенному увеличению длины саркомеров в кардиомиоцитах до оптимального значения 2.2 мкм (L_{макс}) в соответствии с законом Фраанка—Старлинга [50, 60]. Однако основным признаком является изменение геометрического расположения миоцитов внутри стенки желудочков, а не их растяжение. В результате такого изменения стенка расширенного желудочка становится тоньше и число миоцитов в произвольном поперечном сечении стенки уменьшается [39, 40]. К числу заболеваний, вызывающих острую форму расширения сердца без гипертрофии, относятся острая фаза миокардита, инфекционный эндокардит, клапанная недостаточность и декомпенсация сердца, вызванная ишемией.

Концентрическая гипертрофия характеризуется относительным или абсолютным увеличением массы желудочков, уменьшенным размером камер и симметричными, чрезмерно утолщенными стенками камер [39, 40, 59]. Этот тип кардиомегалии развивается при повышении нагрузки давлением (посленагрузки) в соответствующем желудочке. Этиология концентрической гипертрофии обычно определяется стенозом клапанов и системной гипертензией.

Эксцентрическая гипертрофия характеризуется увеличенной массой желудочков и дилатацией камер сердца [39, 40, 59]. Рас-

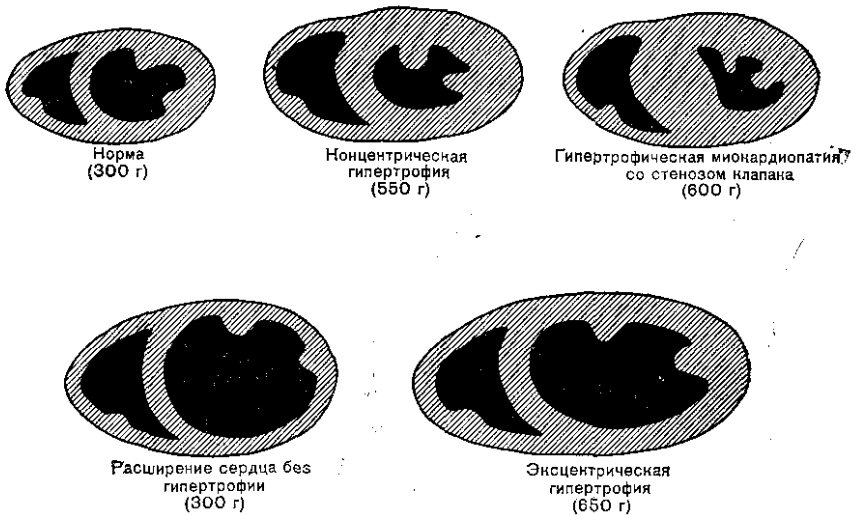


Рис. 2.2. Формы кардиомегалий. Показаны поперечные сечения желудочков сердца. Цифры в скобках обозначают массу сердца. По [59].

ширенный желудочек имеет несимметричную форму. Даже несмотря на увеличение массы, толщина стенки камеры может в зависимости от степени гипертрофии и дилатации превышать нормальную или быть меньше нее. Эксцентрическая гипертрофия является типичной реакцией сердца на хроническую нагрузку объемом (преднагрузка).

Такой тип кардиомегалии может быть обусловлен: а) дилатацией камер сердца в острой стадии с последующей компенсационной гипертрофией; б) прогрессирующей дилатацией и гипертрофией, развивающимися одновременно; в) концентрической гипертрофией с последующей дилатацией. Эксцентрическая гипертрофия может быть вызвана хронической клапанной недостаточностью любой этиологии, сердечной недостаточностью на фоне хронической ИБС или застойной миокардиопатией. В последнем случае наблюдается диффузное поражение сердца, вызывающее симметричную гипертрофию и дилатацию всех четырех камер.

При естественном ходе развития гипертрофии сердца наблюдаются ранняя стадия, при которой функция сердца остается неизменной и существует возможность регрессии гипертрофии, и поздняя стадия, характеризующаяся неуклонным развитием сердечной недостаточности и постепенным снижением возможности регрессии [38—40]. Ginzbach предположил, что критическая масса сердца, при которой происходит переход от ранней стадии гипертрофии к поздней, составляет около 550 г [39]. После того как масса сердца превысит критическую, в гипертрофированном желудочке происходят существенные структурные изменения, predisposing к сердечной недостаточности и затрудняющие регрессию. При сильной гипертрофии число кардиомиоцитов может увеличиться за счет amitotic деления продольного деления, происходящего в выросших клетках [39]. Развиваются постепенная дегенерация миоцитов и фиброз, причем эти изменения более ярко выражены в субэндокарде [61, 62]. Дегенерация и фиброз частично обусловлены тем, что потребность сильно гипертрофированных желудочков в кислороде превышает возможность поступления крови по неизменной системе коронарных сосудов [39, 49, 62]. Другой причиной может быть увеличение механического напряжения в стенке. В итоге наблюдается фиксированная структурная дилатация затронутой камеры сердца. Несомненно, что на прогрессирование гипертрофии и возможность регрессии влияют специфические процессы и механизмы, определяющие течение гипертрофии [63].

Миокардиопатии

Миокардиопатии включают в себя широкий спектр различных заболеваний сердца [64, 66]. Они могут быть классифицированы в соответствии с их этиологией и патофизиологией (клинико-патологическими признаками) (табл. 2.1). К сожалению, причины многих видов кардиомиопатии у человека неизвестны или неясны. Типичная идиопатическая миокардиопатия характеризуется

Таблица 2.1. Общая классификация миокардиопатий

А. Этиология.

1. Самостоятельные заболевания миокарда (первичные, или идиопатические, миокардиопатии)
 - а) врожденные, семейные или обусловленные генетически
 - б) приобретенные
2. Заболевания миокарда, вторичные по отношению к
 - а) заболеванию неясной этиологии
 - б) заболеванию системы кровообращения
 - в) другим сердечно-сосудистым заболеваниям

Б. Патофизиология

1. Застойная (дилатационная) миокардиопатия
2. Гипертрофическая миокардиопатия
 - а) с обструкцией (идиопатический гипертрофический субаортальный стеноз)
 - б) без обструкции
3. Рестриктивная (констриктивная) миокардиопатия

как заболевание миокарда, происходящее без каких-либо признаков гипертонии, ИБС, повреждений клапанов, врожденных пороков сердца и других известных заболеваний сердца. Такие миокардиопатии могут иметь врожденные, семейные или генетические основы либо могут быть приобретенными, вторичными по отношению к повреждению некоторым внешним воздействием. Первичные (идиопатические) миокардиопатии возникают вследствие неустановленных причин, которые в основном или даже исключительно воздействуют только на миокард. Вторичные миокардиопатии имеют известные причины или развиваются как часть хорошо изученного системного или мультиорганного заболевания. [64].

Вторичные миокардиопатии могут возникать при таких нервно-мышечных заболеваниях, как атаксия Фридрейха и различные мышечные дистрофии; при заболеваниях соединительной ткани, включая системную волчанку; при раковых заболеваниях, дающих метастазы в сердце; при нарушениях метаболизма, включая сахарный диабет, тиреотоксикоз, микседему и нарушение гликогенного обмена; при расстройстве питания, особенно при берiberи и kwashiorkor; при гематологических заболеваниях, включая различные синдромы гиперэозинофилии; при вирусных паразитических, амебных и бактериальных инфекциях; при гранулематозе, особенно при саркоидозе; при инфильтрующих заболеваниях, особенно при амилоидозе, а также при отравлении лекарствами или другими веществами [64].

Заболевание миокарда может развиваться в качестве осложнения описанных выше болезней вследствие повреждения сердца или сердечно-сосудистой системы и стать основным в клиническом течении, даже если повреждение миокарда, явившееся причиной, удается излечить. Примером такого явления может служить развитие ишемической миокардиопатии после проведения операции аортокоронарного шунтирования [2, 49] и отсутствие

изменений в течении болезни после замены клапана [63]. Это связано с влиянием некоторых общих, обсуждавшихся в предыдущей главе факторов, контролирующих естественное течение развития гипертрофии сердца.

Миокардиопатии классифицируются также в соответствии с их патофизиологическими проявлениями и сопровождающими клиническими и патологическими симптомами. Патофизиологическая классификация, предложенная Гудвином, является практической и клинически полезной [65]. Однако следует подчеркнуть, что эта классификация не является этиологической по своей сути. Тем не менее патофизиологические проявления миокардиопатии часто дают полезную информацию для отнесения ее к некоторой широкой этиологической группе.

Застойная миокардиопатия

Большинство первичных миокардиопатий протекают по застойному типу. Застойная миокардиопатия является подострым, или хроническим, нарушением функции сердца, проявляющимся клинически как *застойная сердечная недостаточность*, которая обычно проявляется периодическими приступами или прогрессирует, приводя к постепенному увеличению размеров сердца. Другим важным клиническим признаком этой патологии являются нарушения ритма сердца. Они могут либо сопутствовать заболеванию, либо доминировать в клинической картине на поздних его стадиях. При развитии хронической застойной сердечной недостаточности прогноз неутешительный. Часто наблюдаются клинические признаки системной эмболии. При вскрытии отмечаются вялость сердца, увеличение его размеров, округлая форма, признаки гипертрофии и дилатации (эксцентричная гипертрофия) всех четырех камер [66]. Часто встречаются пристеночные тромбы, особенно в левом желудочке, что объясняет частую эмболизацию системного кровообращения. В случаях, когда развитие болезни не зашло далеко, могут наблюдаться умеренные гипертрофия и дилатация. Гистологические изменения неспецифичны и выражаются в вариациях размера, формы и окраски мышечных клеток и их ядер, в различной степени дегенерации мышечных клеток и фиброзе. Застойная миокардиопатия обычно является приобретенным заболеванием. Очень редки сообщения о выявлении застойной кардиомиопатии у нескольких членов одной семьи.

Косвенные признаки указывают на то, что наиболее вероятными этиологическими факторами в большинстве случаев первичной застойной миокардиопатии являются вирусный миокардит и хронический алкоголизм [24, 29—31]. Известно, что многие вирусы, включая вирусы гриппа, полиомелита и группы Коксаки В (Coxsackie В), обладают способностью поражать миокард и вызывать острую сердечную недостаточность (острый миокардит). Установлено, что острый миокардит может перейти в подострое или хроническое нарушение с признаками, неотличимыми от при-

знаков идиопатической застойной миокардиопатии. Однако в большинстве случаев застойной миокардиопатии не удается получить подтверждения о наличии предшествующей острой вирусной инфекции. Застойная миокардиопатия чаще наблюдается у страдающих хроническим алкоголизмом, чем во всей популяции в целом. Однако только у небольшого процента лиц при хроническом алкоголизме развивается застойная миокардиопатия, и заболевание сердца чаще обнаруживается у тех из них, у которых не выявляется серьезного заболевания печени.

Термины «послеродовая миокардиопатия» и «околородовая миокардиопатия» используются для обозначения проявлений заболевания в первые 3—5 мес после рождения или в течение последних 3 мес до родов и первых 3—5 мес после рождения соответственно [64]. Предрасположенность к развитию этого заболевания отмечается у детей, рожденных женщинами старше 30 лет, имевших три и более беременности. В патогенезе послеродовой миокардиопатии играют роль такие специфические для беременности факторы, как усиление аутоиммунных процессов, однако нет никаких данных относительно точных патогенетических факторов.

Другая форма застойной миокардиопатии наблюдается у больных раком, которые прошли курс лечения адриамицином. Повышенная вероятность развития застойной миокардиопатии наблюдается у больных, получивших общую кумулятивную дозу 550 мг/м² этого лекарственного препарата [25]. Для выяснения роли химических веществ, включая лекарственные (см. схему 2), и иммунных явлений [31—37] в генезе застойной миокардиопатии необходимы дальнейшие исследования.

Гипертрофическая миокардиопатия

К гипертрофической миокардиопатии относят гипертрофическую обструктивную миокардиопатию и идиопатический гипертрофический субаортальный стеноз. У большинства больных с клинико-патологическими признаками гипертрофической кардиомиопатии выявляется генетическая обусловленность заболевания, которое наследуется как аутосомальная доминанта с неполной пенетрантностью (вероятность проявления гена) [67, 68]. К симптомам типичной гипертрофической миокардиопатии относятся шумы в сердце, ослабленный артериальный пульс, стенокардия и расстройством дыхания; часто отмечаются случаи внезапной смерти [65, 69]. При неинвазивной диагностике можно выявить асимметричную гипертрофию перегородки и (или) систолическое anteriorное смещение митрального клапана [64]. К характерным патологическим признакам относятся: гипертрофия сердца без дилатации; гипертрофия левого желудочка с чрезмерным утолщением межжелудочковой перегородки (асимметричное утолщение перегородки); аномальное расположение мышечных клеток с нарушением контактов по всему миокарду, в основном в межжелудочко-

вой перегородке; фиброзные бляшки в эндокарде выводящего тракта левого желудочка; фокальное утолщение передней створки митрального клапана и нормальный аортальный клапан [66, 70].

У страдающих гипертрофической кардиомиопатией часто развивается сужение выводящего тракта левого желудочка, напоминающее стеноз аортального клапана. Сужение выносящего тракта, возможно, является следствием искажения последовательности сокращения желудочков, приводящей к аномальному систолическому смещению передней створки митрального клапана в направлении утолщенной межжелудочковой перегородки. Аномальное смещение митрального клапана может также вызывать митральную недостаточность различной степени. Анатомическими маркерами функционального сужения выносящего тракта являются области фиброза, захватывающие переднюю створку митрального клапана и эндокард выносящего пути левого желудочка. Гипертрофированный левый желудочек часто оказывает сопротивление наполнению желудочков (сопротивление входу) даже при отсутствии явных признаков сужения выносящего тракта [65, 68]. В более поздней стадии течения болезни может развиваться прогрессирующая застойная сердечная недостаточность и дилатация желудочков. Характерные патологические признаки, включая асимметричную гипертрофию межжелудочковой перегородки и обширные нарушения взаимного расположения клеток, выявляются даже при наличии последней стадии гипертрофической миокардиопатии и дилатации желудочков.

Одним из основных этиологических факторов типичной гипертрофической миокардиопатии является наследственная предрасположенность, так как относительно часто встречаются семьи, в которых высока вероятность развития этого заболевания. Кроме того, при эхокардиографическом обследовании членов семей, в которых часто встречаются больные с клиническими проявлениями такой миокардиопатии, было обнаружено, что в 90% из них можно выявить асимметричную гипертрофию перегородки у здоровых членов без каких-либо симптомов заболевания [67]. Некоторые признаки наследственной гипертрофической миокардиопатии, включая асимметричную гипертрофию перегородки, могут изредка наблюдаться у больных с другими заболеваниями сердца, включая его гипертрофию, вызванную тяжелой гипертонией [68].

Важным отличительным признаком врожденной гипертрофической миокардиопатии от вторичной, по-видимому, является наличие обширного нарушения взаиморасположения кардиомиоцитов свидетельствующего об особой разновидности гипертрофии миокарда [70]. Предполагают, что основной причиной развития асимметричной гипертрофии левого желудочка и обширного нарушения взаиморасположения кардиомиоцитов у страдающих гипертрофической миокардиопатией является врожденная аномалия реакции миокарда на катехоламины, возникающая при эмбриональном развитии сердца [68].

Рестриктивная (констриктивная) миокардиопатия

Рестриктивная (констриктивная) миокардиопатия представляет собой редкую форму миокардиопатии, для которой характерно ухудшение диастолического наполнения желудочков вследствие снижения растяжимости миокарда [64, 65]. Клиническая картина при рестриктивной миокардиопатии часто напоминает таковую при клиническом констриктивном миокардите. У больных наблюдаются признаки повышения системного венозного давления без кардиомегалии. Рестриктивная миокардиопатия чаще всего является следствием амилоидоза сердца [71], а также может возникать при гемохроматозе (хотя в большинстве случаев гемохроматоза картина напоминает застойную кардиомиопатию) [72] и на идиопатической основе.

В некоторых случаях при миокардиопатии отмечаются заполнения полости желудочков массивными пристеночными тромбами, некроз и (или) фиброз субэндокарда и различная степень недостаточности митрального и трехстворчатого клапанов. Иногда такие случаи классифицируют как облитерирующую миокардиопатию [65]. Они наблюдаются при африканском эндомиокардиальном фиброзе и при фибропластическом эндокардите Лёффлера, сопровождающегося синдромами гиперэозинофилии.

Биопсия миокарда

Миокардиальную биопсию можно без особого риска использовать для прижизненного получения образцов ткани сердца страдающих миокардиопатией [73, 74]. Проведение биопсии полезно для дифференциальной диагностики констриктивного перикардита и рестриктивной миокардиопатии, которые отличаются по наличию или отсутствию амилоидоза, и в других случаях. Метод позволяет выявить беспорядочное расположение мышечных волокон, указывающее на гипертрофическую миокардиопатию, однако диагностическая чувствительность метода относительно низка вследствие небольших размеров образца и локальности повреждения [70]. Биопсия миокарда также помогает идентифицировать и определить стадию отторжения трансплантата или кардиотоксикоза, вызванного адриамицином [73, 74]. Однако в большинстве случаев при биопсии выявляются неспецифические изменения, характерные для гипертрофии и дегенерации миоцитов, на основе которых невозможно поставить специфический этиологический диагноз.

В настоящее время наибольший интерес представляет идентификация подгруппы больных с активным воспалением миокардиальной ткани, полученной при биопсии [74, 75]. Проводящиеся исследования находятся на пути к оценке терапевтической эффективности лечения таких больных стероидами и другими противовоспалительными веществами [74—76].

Модели на экспериментальных животных

При создании большинства моделей гипертрофии сердца у экспериментальных животных обычно используют гемодинамическую перегрузку миокарда [77]. Как уже было сказано, на основе моделей на животных получено много данных относительно острого токсического и вирусного повреждения, однако не удалось во всех случаях доказать, что эти острые воздействия могут вызывать хроническую миокардиопатию. Наиболее интенсивно проводятся исследования хронической миокардиопатии у сирийского хомяка с врожденной миокардиопатией и при кардиотоксическом действии адриамицина.

Заключение

В рассмотренной главе суммированы важнейшие патологические реакции сердца на повреждение. При развитии миокардиопатии эти реакции характеризуются сложными и часто непонятными явлениями. Для установления причин и механизмов развития различных типов миокардиопатии необходимо провести большое число исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hills L. D., Braunwald E. Myocardial ischemia. — *New Engl. J. Med.*, 1977, vol. 296, p. 971—978, p. 1034—1041, p. 1093—1096.
2. Willerson J. T., Hills L. D., Buja L. M. Pathogenesis and pathology of ischemic heart disease. — In: *Ischemic heart disease: clinical and pathophysiological aspects*. New York: Raven, 1982.
3. Willerson J. T., Buja L. M. Cause and course of acute myocardial infarction. — *Amer. J. Med.*, 1980, vol. 69, p. 903—914.
4. Buja L. M., Willerson J. T. Clinicopathologic findings in acute ischemic heart disease syndromes. — *Amer. J. Cardiol.*, 1981, vol. 47, p. 343—356.
5. Oliva P. B. Pathophysiology of acute myocardial infarction, 1981. — *Ann. intern. Med.*, 1981, vol. 94, p. 236—250.
6. Buja L. M., Hills L. D., Petty C. S., Willeson J. T. The role of coronary arterial spasm in ischemic heart disease. — *Arch. pathol. Lab. Med.*, 1981, vol. 105, p. 221—226.
7. Hirsh P. D., Campbell W. B., Willerson J. T., Hills L. D. Prostaglandins and ischemic disease. — *Amer. J. Med.*, 1981, vol. 71, p. 1009—1026.
8. Reimer K. A., Jennings R. B. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. — *Lab. Invest.*, 1979, vol. 40, p. 633—644.
9. Willerson J. I., Parkey R. W., Bonte F. J. et al. Pathophysiologic considerations and clinicopathological correlates of technetium-99m stannous pyrophosphate myocardial scintigraphy. — *Sem. Nucl. Med.*, 1980, vol. 10, p. 54—69.
10. Hagler H., Burton K., Buja L. Electron probe x-ray microanalysis of normal and injured myocardium: methods and results. — In: *Microprobe analysis of biological system/Ed. T. E. Hutchinson, A. P. Somlyo*. New York: Academic, 1981, p. 245—281.
11. Schlesinger M. J., Reiner L. Focal myocytolysis of the heart. — *Amer. Pathol.*, 1955, vol. 31, p. 443—459.
12. Buja L. M., Willerson J. T. Abnormalities of volume regulation and membrane integrity in myocardial tissue slices after early ischemic injury in the dog: effects of mannitol, polyethylene glycol and propranolol. — *Amer. J. Pathol.*, 1981, vol. 103, p. 79—95.

13. *Burton K. P., Hagler H. K., Willerson J. T., Buja L. M.* Relationship of abnormal intracellular lanthanum accumulation of progression of ischemic injury in isolated perfused myocardium: effect of chlorpromazine. — *Amer. J. Physiol.*, 1981, vol. 241, p. H714—H723.
14. *Chien K. R., Reeves J. P., Buja L. M.* et al. Phospholipid alterations in canine ischemic myocardium: temporal and topographical correlations with Tc-99m-PPi accumulation and an in vitro sarcolemmal Ca²⁺ permeability defect. — *Circulat. Res.*, 1981, vol. 48, p. 711—719.
15. *Mukherjee A., Bush L. R., McCoy K. E.* et al. Relationship between β -adrenergic receptor numbers and physiological responses during experimental canine myocardial ischemia. — *Circulat. Res.*, 1982, vol. 50, p. 735.
16. *Corr P. B., Shayman J. A., Kramer J. B., Kipnis R. J.* Increased alpha adrenergic receptors in ischemic cat myocardium: a potential mediator of electrophysiological derangements. — *J. clin. Invest.*, 1981, vol. 67, p. 1232—1236.
17. *Muntz K. H., Halger H. K., Boulos H. J.* et al. Redistribution of catecholamines in the ischemic zone of the dog heart. — *Amer. J. Pathol.*, 1984, vol. 114, p. 64—78.
18. *Reichenbach D. D., Benditt E. P.* Catecholamines and cardiomyopathy: the pathogenesis and potential importance of myofibrillar degeneration. — *Hum. Pathol.*, 1970, vol. 1, p. 125—150.
19. *Buja L. M., Ferrans V. J., Robetts W. C.* Drug-induced cardiomyopathies. — In: *Comparative pathology of the heart*/Ed. F. Homburger. *Advances in cardiology*. Basel: Karger, 1974, vol. 13, p. 330—348.
20. *Buja Lm., Ferrans V. J.* Myocardial injury produced by antineoplastic drugs. — In: *Pathophysiology and morphology of myocardial cell alteration. Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism*/Ed. A. Fleckenstein, G. Rona. Baltimore: University Park, 1975, vol. 6, p. 487.
21. *Rubin E.* Alcohol: toxic or tonic? — *Cardiovasc. Rev. Rep.*, 1981, vol. 2, p. 23—29.
22. *Csapo Z., Dusek J., Rona G.* Early alterations of the cardiac muscle cells in isoproterenol-induced necrosis. — *Arch. Pathol.*, 1972, vol. 93, p. 356.
23. *Rona G., Boutet M., Hurtner I., Peters H.* Pathogenesis of isoproterenol-induced myocardial alterations: functional and morphological correlates. — In: *Myocardial metabolism*/Ed. N. S. Dhalla. *Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism*. Baltimore: University Park, 1973, vol. 3, p. 507—525.
24. *Ferrans V. J.* Overview of cardiac pathology in relation to anthracycline cardiotoxicity. — *Cancer Treat. Resp.*, 1978, vol. 62, p. 995—961.
25. *Young R. C., Ozols R. F., Myers C. E.* The anthracycline antineoplastic drugs. — *New Engl. J. Med.*, 1981, vol. 305, p. 139—153.
26. *Olson R. D., Boerth R. C., Gerber J. C., Nies A. S.* Mechanisms of adriamycin cardiotoxicity: evidence for oxidative stress. — *Life Sci.*, 1981, vol. 29, p. 1333—1401.
27. *Dalbow D. G., Jaenke R. S.* In vivo RNA synthesis in the hearts of adriamycin-treated rats. — *Cancer Res.*, 1982, vol. 42, p. 79—83.
28. *Bristow M. R., Minobe W. A., Billingham M. E.* et al. Anthracycline-associated cardiac and renal damage in rabbits: evidence for mediation by vasoactive substances. — *Lab. Invest.*, 1981, vol. 45, p. 157—168.
29. *Lerner A. M., Wilson Fm.* Virus myocardopathy. — *Progr. med. Virol.*, 1973, vol. 15, p. 63—91.
30. *Abelman W. H.* Viral myocarditis and its sequelae. — *Ann. Rev.*, 1973, vol. 22, p. 145—152.
31. *Woodruff J. E.* Viral myocarditis: a review. — *Amer. J. Pathol.*, 1980, vol. 101, p. 425—484.
32. *Cambridge G., MacArthur C. G. C., Waterson A. P.* et al. Antibodies to Coxsackie B viruses in congestive cardiomyopathy. — *Brit. Heart. J.*, 1979, vol. 41, p. 692—696.
33. *Kirsner A. B., Hess E. V., Fowler N. O.* Immunologic findings in idiopathic cardiomyopathy: a prospective serial study. — *Amer. Heart. J.*, 1973, vol. 86, p. 625—630.
34. *Bolte H. D., Schultheiss P.* Immunological results in myocardial diseases. — *Postgrad Med.*, 1978, vol. 54, p. 500—503.

Глава 3

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОК В ПОКОЕ И ПОДДЕРЖАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ИОНОВ

Н. СПЕРЕЛАКИС (N. SPERELAKIS)

ВВЕДЕНИЕ

Сердечная мышца представляет собой возбудимую ткань с уникальными свойствами, которые являются основой своеобразных механических характеристик сердца, позволяющих ему эффективно перекачивать кровь и заставлять ее циркулировать по сосудистой системе. Благодаря быстро проводящей (2—3 м/с) специализированной системе волокон Пуркинье и быстрому распространению (0,3—0,4 м/с) по миокарду возбуждение быстро, за несколько сотых секунды, охватывает каждый желудочек. Миокард желудочков в норме сокращается по принципу «все или ничего» вследствие быстрого распространения возбуждения по всей мышце. В норме сердечная мышца не способна к тетаническому сокращению из-за продолжительного функционального рефрактерного периода, обусловленного большой длительностью потенциала действия. Развитие максимальной механической активности сердца и поддержание его в течение достаточно продолжительного времени обеспечивается наличием фазы плато потенциала действия с большой длительностью.

Различные механизмы позволяют усилить при необходимости насосную функцию сердца или ослабить ее в случае, когда позволяют условия. К таким механизмам относятся освобождение нейромедиаторов, норадреналина и ацетилхолина из нервных окончаний вегетативной нервной системы или действие циркулирующих гормонов (например, ангиотензин-2, гистамин). Минутный объем крови может быть увеличен путем повышения частоты сердечных сокращений (при усилении частоты возбуждения СА-узла — нормального водителя ритма сердца) и путем увеличения силы сокращения желудочков. Кроме закона Старлинга, одним из основных механизмов повышения силы сокращения является увеличение числа медленных кальциевых каналов в клеточной мембране, способных активироваться при деполяризации, повышая, таким образом, вход ионов Ca^{2+} за один сердечный цикл. Увеличение поступления Ca^{2+} вызывает усиление активации сократительного механизма.

Таким образом, клеточная мембрана осуществляет строгий контроль над сократительным механизмом в процессе сопряже-

Таблица 3.1. Сравнение потенциалов покоя и параметров потенциала действия миоцитов из различных участков сердечной мышцы млекопитающих

Параметры	Клетки желудочков	Предсердные клетки	Клетки СА-узла	Клетки АВ-узла	Проводящие сердечные миоциты
Потенциал покоя (мВ)	-80-90	-80-90	-50-60	-60-70	-90-95
Потенциал действия					
Амплитуда (мВ)	110-120	110-120	60-70	70-80	120
Овершут (мВ)	30	30	0-10	5-15	30
Длительность (мс)	200-300	100-300	100-300	100-300	300-500
\dot{V}_{\max} (В/с)	100-200	100-200	1-10	5-15	500-700
Скорость проведения (м/с)	0,3-0,4	0,3-0,4	<0,05	0,1	2-3
Диаметр волокон (мкм)	10-16	10-15	5-10	5-10	100

Длительность потенциала действия миоцитов в сердце птиц составляет около 120 мс, земноводных — 400-500 мс. Длительность потенциала действия миокарда всех животных зависит от температуры и частоты сердечного ритма. Скорость проведения во входном участке АВ-узла значительно меньше, чем в самом АВ-узле. Длина любой миокардиальной клетки находится в диапазоне 100-200 мкм. По [3].

ния возбуждения с сокращением (или электромеханического сопряжения). Кроме того, многие лекарственные вещества и токсины прямо или косвенно изменяют электрические свойства клеточной мембраны и таким образом воздействуют на автоматизм, нарушения ритма сердца и силу сокращения. Поэтому для понимания механизма действия кардиоактивных и кардиотоксических веществ, нейромедиаторов, гормонов и электролитов плазмы крови на электрическую и механическую активность сердца необходимо выяснить электрические свойства и поведение мембраны миокардиальных клеток в покое и во время возбуждения. Первым шагом в этом направлении будет изучение электрических свойств миокардиальных клеток в покое, включая возникновение мембранного потенциала покоя. Потенциал покоя и потенциал действия определяется особыми свойствами клеточной мембраны. Некоторые электрические характеристики клеток различных тканей сердца суммированы в табл. 3.1.

ПАССИВНЫЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ И КАБЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

Состав и структура мембраны

Клеточная мембрана представляет собой биомолекулярный слой молекул фосфолипидов (например, фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина и др.), заключенный между двумя слоями

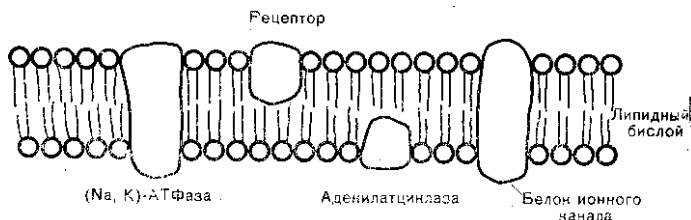


Рис. 3.1. Схема внутренней структуры клеточной мембраны, образованной липидным бислоем. Незаряженные гидрофобные концы молекул фосфолипидов направлены к середине мембраны, а полярные гидрофильные головки отделяют мембрану от водной фазы по обе стороны. Толщина липидного бислоя около 5—10 нм. С целью упрощения не показаны молекулы холестерина. Крупные молекулы белков проходят через всю толщину мембраны или встраиваются только в один слой бислоевой мембраны. К таким белкам относятся различные ферменты, связанные с клеточной мембраной, а также мембранные порные каналы. Мембрана обладает текучестью, вследствие чего молекулы белков и липидов могут передвигаться в ее плоскости, а молекулы флюоресцентных зондов, встроенные в ее гидрофобную область, способны вращаться. По [42].

адсорбированных белков. Неполярные гидрофобные концы молекул фосфолипидов направлены к середине мембраны, а полярные гидрофильные концы — к ее краям, отделяющим ее от водной фазы (рис. 3.1). Такая ориентация термодинамически выгодна. Толщина клеточной мембраны составляет 7—10 нм, а длина молекулы фосфолипидов (3—4 нм) достаточна для того, чтобы они могли занять половину толщины мембраны. Поверхностная мембрана клеток животных содержит также большое количество молекул холестерина, так что отношение фосфолипиды/холестерин равно 1,0, и холестерин встроен между молекулами фосфолипидов. В липидный бислоевой матрикс также включены большие белковые молекулы. Некоторые белки проходят через всю толщину мембраны, как, например, $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-АТФаза}$ и белки различных ионных каналов, в то время как другие белки встраиваются только в один из слоев мембраны (внешний или внутренний), например, рецепторы нейромедиаторов или такой фермент, как аденилатциклаза. Так как мембрана обладает некоторой текучестью (величина, обратная микровязкости), то белки и липидные молекулы могут передвигаться вдоль в ее плоскости.

Внешняя поверхность клеточной мембраны покрыта мукополисахаридами, образующими клеточную оболочку, ответственную за иммунологические свойства клетки. Она имеет высокий отрицательный заряд, вследствие чего может связывать такие катионы, как ионы Ca^{2+} . Оболочка разрушается при обработке клеток пептидазой, удаляющей остатки слаловой кислоты.

Сопротивление и емкость мембраны

Удельная емкость искусственных липидных бислоевых мембран типа Мюллера—Рудина (C_m) составляет около 0,4—1 мкФ/см². Эта величина близка к получаемой для биологических

мембран, поэтому емкость мембран миокардиальных клеток, по-видимому, обусловлена исключительно липидным бислоемым матриксом. Если принять C_m равной $0,7 \text{ мкФ/см}^2$ и предположить, что диэлектрическая проницаемость (ϵ мембранных липидов равна 5, тогда из формулы, определяющей емкость тонкого слоя, получаем, что толщина мембраны (δ) должна быть равна 65 \AA .

$$C_m = \frac{\epsilon A_m}{s4\pi k},$$

где A_m — площадь мембраны (см^2); k — константа ($9,0 \times 10^{11} \text{ см/Ф}$). Большинство жиров имеет диэлектрическую проницаемость около 3–5. Чем больше дипольный момент вещества, тем больше его диэлектрическая проницаемость (например, для воды она составляет 81).

Вместе с тем искусственная липидная бислоенная мембрана обладает исключительно высоким сопротивлением (R_m) в диапазоне 10^6 – $10^9 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$, что на несколько порядков выше сопротивления биологической клеточной мембраны (около $10^3 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$). Однако если к бислою добавить определенные вещества, такие как макроциклические полипептидные антибиотики (известные как ионофоры), R_m сильно снижается. Ионофоры могут быть двух типов: ионофоры — переносчики ионов (валиномицин) и ионофоры, образующие ионные каналы (грамидин). Поэтому наличие белков, проходящих через всю толщину клеточной мембраны, способно обусловить относительно низкое сопротивление биологической клеточной мембраны. К ним относятся белки, обеспечивающие работу ионных каналов с потенциалозависимым воротным механизмом в возбужденной мембране и ионных каналов в покоем мембране с воротным механизмом, не зависящим от потенциала. Итак, емкостный компонент C_m обусловлен липидным бислоемым матриксом, а резистивный компонент R_m — белками, встроенными в липидный бислой.

Текучесть мембраны

Электрические свойства клеточной мембраны и ее способность к переносу ионов определяются ее молекулярным составом. Липидный бислоенный матрикс влияет также на работу мембранных белков, например на активность (Na^+ , K^+)-АТФазы, зависящую от окружающих ее молекул фосфолипидов. Текучесть мембраны снижается при увеличении содержания холестерина, а при повышении содержания ненасыщенных или ветвящихся гидрофобных хвостов фосфолипидных молекул она повышается; длина гидрофобной цепи также влияет на текучесть. Полярный участок холестерина размещается в гидрофильной части мембраны, а неполярный участок плоской холестериновой молекулы заклинен между цепями жирных кислот, что ограничивает их подвижность и снижает текучесть. Фосфолипиды с ненасыщенными и ветвящимися жирно-кислотными хвостами не могут быть плотно упакованы вследствие стерических препятствий, возникающих в резуль-

тате их большой жесткости; поэтому такие фосфолипиды увеличивают текучесть мембраны. Снижение температуры уменьшает текучесть мембраны. Ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} могут уменьшить электростатическое отталкивание заряженных головок фосфолипидов, что позволяет достичь более плотной упаковки молекул в бислое, вследствие чего ограничивается подвижность хвостов и снижается текучесть мембраны. Размер участка, занимаемого хвостом фосфолипида, составляет 20—30 Å², а головками — в среднем около 60 Å² [1]. Текучесть мембраны изменяется при росте и развитии мышцы и при определенных заболеваниях, таких как рак, мышечная дистрофия (типа Дюшенна) и миотическая дистрофия.

Гидрофобный участок молекул местных анестетиков способен внедряться между молекулами липидов; это приводит к увеличению расстояния между ацильными цепями гидрофобных хвостов молекул фосфолипидов, снижая ван-дер-ваальсовы силы взаимодействия между соседними хвостами и увеличивая, таким образом, подвижность мембраны. Известно, что местные анестетики уменьшают проводимость мембраны для ионов K^+ и Na^+ в покое и угнетают потенциалозависимые изменения g_{Na} и g_{K} ; кроме того, они также угнетают потенциалозависимые медленные катионные каналы. Таким образом, местные анестетики вызывают неселективное угнетение большинства типов проводимости в покое и возбужденной мембране. Такое угнетение может быть опосредовано влиянием анестетиков на текучесть липидного матрикса. Если концентрация местных анестетиков во внеклеточной жидкости достаточна для полного блокирования возбуждения, тогда их концентрация в липидном бислое, согласно оценкам, составляет более 100 000/мкм². Угнетение активности (Na^+ , K^+)-АТФазы местными анестетиками [2] также может быть объяснено их влиянием на текучесть липидного матрикса, хотя не исключено также прямое действие на этот фермент.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИОНОВ И ЕГО ПОДДЕРЖАНИЕ

Распределение ионов

Трансмембранный потенциал покоя в миоцитах предсердий и желудочков составляет около —80 мВ. Потенциал покоя (ПП) или максимальный диастолический потенциал (МДП) в проводящих сердечных миоцитах несколько выше (около —90 мВ), в то время как в узловых клетках он ниже (около —60 мВ). Ионный состав внеклеточной жидкости, окружающей клетки сердца, близок к составу плазмы крови. Для нее характерно высокое содержание ионов Na^+ (около 145 мМ) и Cl^- (около 120 мМ) и низкое содержание ионов K^+ (около 4 мМ). Концентрация свободных ионов Ca^{2+} составляет около 2 мМ. Внутриклеточная жидкость, напротив, имеет низкую концентрацию ионов Na^+ (около 15 мМ или меньше) и Cl^- (около 6 мМ), но высокую концентрацию K^+ (около 150 мМ). Внутриклеточная концентрация свободных ионов

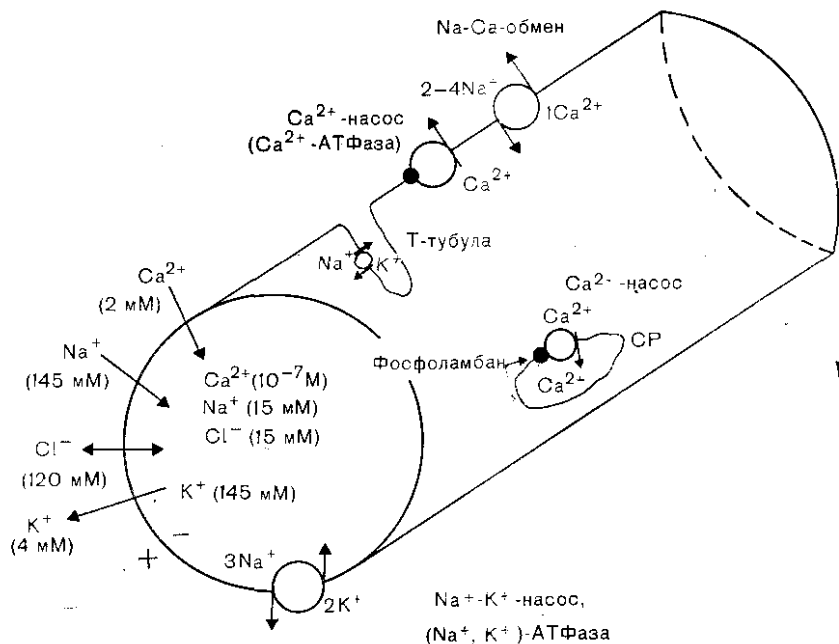


Рис. 3.2. Распределение ионов внутри и снаружи миокардиальной клетки позвоночных. Приводятся также величина и полярность потенциала покоя. Стрелками показаны направления градиентов концентрации. Поперечные Т-тубулы, обнаруженные в кардиомиоцитах желудочков млекопитающих, представляют собой втягивания клеточной мембраны внутрь клетки. $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -насосы располагаются на поверхности клетки и в мембране Т-тубул. В клеточную мембрану может быть также встроена Ca^{2+} -АТФаза (Ca^{2+} -насос, аналогичный Ca^{2+} -насосу СР). В клеточной мембране находится переносчик, ответственный за $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен. По [3].

Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) составляет около 10^{-7} М или меньше, но во время сокращения она может возрастать до 10^{-5} или даже до 10^{-4} М. Общее внутриклеточное содержание Ca^{2+} значительно выше (около 2 ммоль/кг), однако большая часть его связана с молекулами белков или поглощена митохондриями и саркоплазматическим ретикулулом (СР). Большая часть внутриклеточных ионов K^+ находится в свободном состоянии, и его коэффициент диффузии лишь слегка меньше, чем у ионов K^+ во внеклеточном растворе. Таким образом, в нормальных условиях в миокардиальной клетке поддерживаются концентрации ионов, значительно отличающиеся от характерных для среды, окружающей кардиомиоциты. Именно это различие в концентрациях ионов определяет потенциал покоя и возбудимость. Распределение ионов и соответствующие насосы показаны на рис. 3.2.

Na^+/K^+ -Насос

Отличие внутриклеточных концентраций ионов от их концентраций во внеклеточной жидкости создается и поддерживается с помощью механизмов активного транспорта ионов, который

затрачивает метаболическую энергию для выведения некоторых ионов против их градиентов концентраций или электрохимических градиентов. Такие ионные насосы расположены в клеточной мембране на поверхности клетки и, возможно, также в поперечных Т-тубулах. Основным ионным насосом является насос, сопрягающий транспорт Na и K, который выкачивает ионы Na^+ из клетки против его электрохимического градиента, одновременно вводя в клетку ионы K^+ против его электрохимического градиента (см. рис. 3.2). Сопряжение переноса Na^+ и K^+ является обязательным условием, так как при нулевой концентрации ионов K^+ во внеклеточной жидкости ($[\text{K}^+]_o = 0$) невозможно удаление из клетки ионов Na^+ . Коэффициент сопряжения удаляемых ионов Na^+ и поступающих ионов K^+ может варьировать (по разным источникам) от 3:3 до 3:2 и 3:1, причем наиболее обычно соотношение 3:2. При соотношении 3:3 насос электрически нейтрален или неэлектрогенен: непосредственно при работе насоса не возникает разности потенциалов, так как насос на один поступающий положительный заряд (K^+) выводит один отрицательный заряд (Na^+). При коэффициенте сопряжения 3:2 насос является электрогенным, и его работа непосредственно вызывает возникновение некоторой трансмембранной разности потенциалов, причем потенциал внутри клетки или мембранный потенциал, (E_m) становится ниже (более отрицательным), чем он был бы без учета работы насоса, исходя только из градиентов концентраций ионов и относительных проницаемостей мембраны или только диффузионного потенциала ($E_{\text{дифф}}$). В нормальных установившихся условиях вклад потенциала ($V_{\text{эн}}$) электрогенного натриевого насоса в E_m микрокардиальной клетки составляет только несколько милливольт.

Движущим механизмом Na^+/K^+ -насоса является мембранная АТФаза, (Na^+ , K^+)-АТФаза, для активации которой необходимы как ионы Na^+ , так и ионы K^+ , а также ионы Mg^{2+} ; он угнетается ионами Ca^{2+} . Таким образом, с внутренней поверхности мембраны ферменту необходимы АТФ, Mg^{2+} и Na^+ , а с внешней — ионы K^+ . В цикле транспорта ионов возникает промежуточное фосфорилированное состояние фермента, причем фосфорилирование зависит от Na^+ , а дефосфорилирование — от K^+ [3]. Фермент насоса обычно выводит 3 иона Na^+ на одну гидролизованную молекулу АТФ. Na^+/K^+ -АТФаза специфически ингибируется сердечными гликозидами, действующими с внешней стороны мембраны. Фермент насоса также ингибируется сульфгидрильными реагентами (такими как N-этилмалеимид, диуретиками на основе ртути и этакриновой кислотой), указывая на то, что наличие SH-групп является критическим фактором для проявления активности.

Блокада Na^+/K^+ -насоса в первое время лишь незначительно влияет на потенциал покоя E_m : возникает небольшая деполяризация на 2—6 мВ, представляющая собой вклад $V_{\text{эн}}$ в E_m . В течение некоторого короткого времени после блокады влияние ее на возбудимость и потенциал действия (ПД) выражено еще очень слабо, так как возбудимость не зависит от активного транспорта

ионов. Однако через несколько минут после блокады в зависимости от отношения площади поверхности клетки к ее объему потенциал покоя E_m медленно снижается вследствие постепенного уменьшения градиентов концентраций ионов. В результате увеличения деполяризации уменьшается скорость нарастания потенциала действия, а следовательно, скорость распространения возбуждения, и в конце концов происходит полная потеря возбудимости. Таким образом, высокая абсолютная величина потенциала покоя и возбудимость мембраны в конечном счете зависят от работы Na^+/K^+ -насоса, хотя непосредственного влияния на эти параметры насос не оказывает.

Скорость работы Na^+/K^+ -насоса в миокардиальных клетках должна зависеть от частоты сердечного ритма, чтобы внутриклеточные концентрации ионов поддерживались на относительно постоянном уровне, так как при более высокой частоте следования потенциалов действия происходит увеличение перемещения ионов в направлении их электрохимических градиентов (например, клетки начинают накапливать ионы Na^+ , Cl^- и Ca^{2+} и терять K^+), и их концентрации должны быть восстановлены при работе насосов. Факторами, определяющими скорость работы Na^+/K^+ -насоса, являются $[Na]_i$ и $[K]_o$. В клетках, имеющих большое отношение площади поверхности к объему (к ним относятся сердечные клетки с малым диаметром), $[Na]_i$ может относительно сильно возрастать во время серии ПД, и это должно стимулировать увеличение скорости работы насоса. Аналогично накопление ионов K^+ вне клеток будет стимулировать насос (K_m для K^+ — около 2 мМ).

Распределение ионов Cl^-

В нервных и мышечных клетках многих беспозвоночных и позвоночных, по-видимому, отсутствует система активного транспорта ионов Cl^- , т. е. в них нет ионного насоса для Cl^- . Поэтому ионы Cl^- распределяются пассивно (без использования энергии) в соответствии с E_m : E_{Cl} становится равным E_m , если клетка находится в покое. В миокардиальных клетках млекопитающих ионы Cl^- также, по-видимому, распределяются пассивно, так как $[Cl]_i$ приблизительно равна (или лишь немного превышает) величине, предполагаемой на основании уравнения Нернста исходя из E_m [3]. При пассивном распределении Cl^- его внутриклеточная концентрация оказывается очень низкой вследствие наличия отрицательного потенциала внутри клетки (потенциал покоя), который выталкивает отрицательно заряженные ионы Cl^- до тех пор, пока их распределение не придет в равновесие с потенциалом покоя E_m . Следовательно, для потенциала покоя, составляющего -80 мВ, и принимая $[Cl]_o$ равным 120 мМ, $[Cl]_i$ будет равна 5,9 мМ [$E_m = +61$ мВ $\times \lg ([Cl]_i/[Cl]_o)$]. Однако во время ПД потенциал внутри клетки изменяется в положительную сторону, вызывая поступление Cl^- (выходящий Cl^- -ток, I_{Cl}), и таким образом увеличивается $[Cl]_i$. Величина входа Cl^- зависит от проводимости мембраны для Cl^- (g_{Cl}) [$I_{Cl} = g_{Cl} (E_m - E_{Cl})$]. Таким образом, сред-

ний уровень $[Ca]$ в миокардиальных клетках сокращающегося сердца должен зависеть от частоты и длительности ПД, т. е. от величины E_m , усредненной за много циклов ПД.

Распределение ионов Ca^{2+}

Необходимость кальциевых насосов. В кардиомиоцитах должен существовать некоторый механизм удаления Ca^{2+} из миоплазмы, в противном случае они накапливали бы ионы Ca^{2+} до тех пор, пока электрохимический градиент этих ионов не исчез бы полностью. Такое накопление продолжалось бы до тех пор, пока концентрация свободных ионов Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) в миоплазме не стала больше, чем снаружи (2 мМ), так как потенциал внутри клетки имеет отрицательную величину. Поэтому должен работать один или несколько механизмов для удаления Ca^{2+} из кардиомиоцитов. Мембрана СР содержит Ca^{2+} -активируемую АТФазу (для работы которой необходимы также ионы Mg^{2+}), которая активно откачивает ионы Ca^{2+} из миоплазмы внутрь полости СР за счет энергии АТФ и способна уменьшить концентрацию Ca^{2+} ниже 10^{-7} М. Такое поглощение ионов Ca^{2+} в СР играет существенную роль в расслаблении мышцы. Митохондрии также способны активно поглощать Ca^{2+} (приблизительно до такой же степени, что и СР), но этот пул Ca^{2+} , по-видимому, не принимает участия в процессе нормального электромеханического сопряжения. Однако поступающие ионы Ca^{2+} в покое и дополнительные ионы Ca^{2+} , входящие с каждым ПД, должны быть выведены из кардиомиоцитов и возвращены в межклеточную жидкость. Было постулировано существование нескольких механизмов выведения ионов Ca^{2+} из кардиомиоцитов через сарколемму [3]: а — при работе Ca^{2+} -АТФазы аналогичной имеющейся в СР; б — по механизму Na^+ — Ca^{2+} -обмена на клеточной мембране.

Получены убедительные данные о том, что в сарколемме миокардиальных клеток действительно имеет место Ca^{2+} -АТФаза, активно выводящая ионы Ca^{2+} наружу против его электрохимического градиента, используя в этом процессе энергию АТФ [4, 5]. Аналогичный результат получен и для гладкой мышцы [6]. Обсуждается предположение о том, что находящиеся в СР кардиомиоцитов ионы Ca^{2+} могут переноситься через особые структурные образования, расположенные между контактным СР и сарколеммой. Такой механизм позволяет непосредственно уравнивать концентрацию ионов Ca^{2+} внутри СР с их концентрацией в межклеточном пространстве.

Реакция Na^+ — Ca^{2+} -обмена. В процессе реакции Na^+ — Ca^{2+} -обмена с помощью мембранного переносчика происходит обмен одного внутриклеточного иона Ca^{2+} на 2, 3 или 4 иона Na^+ , находящихся вне клетки [3] (см. рис. 3.2). Эта реакция ускоряется в присутствии АТФ, но последний при этом не гидролизует. Источником энергии для выведения ионов Ca^{2+} против большого их электрического градиента является электрохимический градиент ионов Na^+ , т. е. транспорт ионов Ca^{2+} против градиента спси-

люи с движением ионов Na^+ по градиенту. Таким образом, энергия, необходимая для такого движения Ca^{2+} , запасается в действительности под влиянием $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATФазы}$, т. е. Na^+/K^+ -насос, использующий энергию АТФ для поддержания электрохимического градиента ионов Na^+ , косвенно способствует поддержанию электрохимического градиента ионов Ca^{2+} . Этот механизм создает дополнительный вход ионов Na^+ в кардиомиоциты. Затрата энергии (ΔG , Дж/моль) на выведение ионов Ca^{2+} прямо пропорциональна его электрохимическому градиенту, а именно $\Delta G_{\text{Ca}} = zF(E_m - E_{\text{Ca}})$. Энергия, которая может быть получена из распределения ионов Na^+ , прямо пропорциональна их электрохимическому градиенту $[\Delta G_{\text{Na}} = zF(E_m - E_{\text{Na}})]$. В зависимости от конкретных величин $[\text{Na}^+]_i$ и $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в данный момент сердечного цикла энергии будет достаточно для обеспечения отношения обмена $2 \text{Na}^+ : 1 \text{Ca}^{2+}$ или $3 \text{Na}^+ : 1 \text{Ca}^{2+}$. При отношении 2:1 обмен будет электронейтральным, в то время как при отношении 3:1 в процессе обмена будет создаваться небольшая деполяризация (если только транспорт этих 3 ионов Na^+ не сопровождается одновременным переносом одного противоиона, например, Cl^-). Скорость реакции обмена зависит от относительных концентраций ионов Ca^{2+} и Na^+ с каждой стороны мембраны и от относительного сродства мест связывания к ионам Ca^{2+} и Na^+ . Благодаря такой реакции $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена при поступлении в клетку дополнительного количества ионов Na^+ в нее также поступит и некоторое количество ионов Ca^{2+} вследствие замедления реакции обмена (например, в результате снижения электромеханического градиента для ионов Na^+). Кроме того, при повышении $[\text{Na}^+]_i$ часть переносчиков начнет переносить ионы в противоположном направлении (внутриклеточные ионы Na^+ будут обмениваться на внеклеточные ионы Ca^{2+}), увеличивая таким образом поступление ионов Ca^{2+} . В итоге это приведет к повышению $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Гипотеза $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена была предложена для объяснения механизма положительного инотропного действия сердечных гликозидов. Механизм $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена более детально обсуждается в главе 10.

Равновесные потенциалы

Для каждого вида ионов, концентрация которых по разные стороны мембраны не неодинакова, с помощью уравнения Нернста можно рассчитать равновесный потенциал (E_i) (для 37°C): $E_i = -61 \text{ мВ}/z \lg(C_i/C_o)$ (где C_i — внутриклеточная концентрация иона, C_o — его внеклеточная концентрация, а z — валентность со знаком). С помощью уравнения Нернста рассчитывается разность потенциалов (электродвижущая сила), которая в точности компенсирует влияние градиента концентрации (диффузионную силу). Даже при перемещении очень маленького заряда (Q , кулоны) может быть получена большая разность потенциалов ($E_m = Q/C_m$, где C_m — емкость мембраны). Для упоминавшихся выше ионов равновесные потенциалы составляют приблизительно-

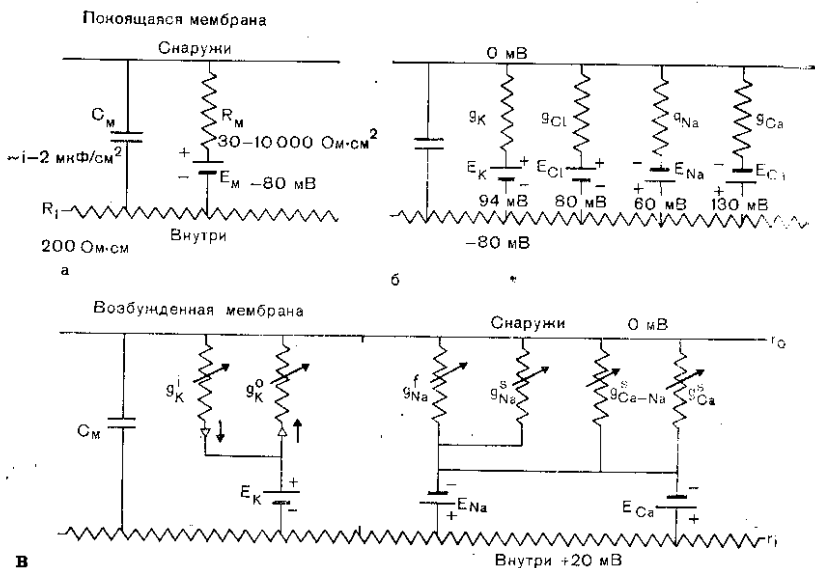


Рис. 3.3. Эквивалентные электрические цепи мембраны миокардиальной клетки в состоянии покоя (а, б) и во время возбуждения (в). Мембрана представлена в виде резистивноемкостной цепи, причем сопротивление мембраны (R_M) включено параллельно емкости мембраны (C_M). Потенциал покоя задается батареей с напряжением -80 мВ, включенной последовательно с сопротивлением мембраны R_M , причем отрицательная клемма направлена внутрь клетки; б — сопротивление мембраны подразделено на 4 компонента, каждый из которых определяется проводимостью мембраны для одного из 4 основных ионов: K^+ , Cl^- , Na^+ и Ca^{2+} . Сопротивления, соответствующие этим проводимостям (R_K , R_{Cl} , R_{Na} , R_{Ca}), включены параллельно друг другу и представляют собой полностью независимые пути проникновения этих ионов через покоящуюся мембрану. Эти сопротивления обозначены на рисунке обратными им величинами, а именно ионными проводимостями (g_K , g_{Cl} , g_{Na} и g_{Ca}). Равновесный потенциал для каждого вида ионов (например, E_K) определяется исключительно установившимся на основании уравнения Нернста. Равновесные потенциалы для каждого вида иона подключены последовательно соответствующей проводимости. Потенциал покоя, равный -80 мВ, определяется этими равновесными потенциалами и относительными проницаемостями; в — более полная эквивалентная цепь, указывающая зависимость проводимостей от потенциала. Кроме того, цепь включает в себя по крайней мере два разных типа калиевой проводимости (обозначенных здесь как g_K^o и g_K^i). Треугольники, включенные в цепь последовательно с этими видами калиевой проводимости, обозначают выпрямительные устройства, причем вершина треугольника показывает направление наименьшего сопротивления ионному току. Таким образом, проводимость g_K^o позволяет K^+ легче проходить в выходящем направлении (так называемое направленное наружу выпрямление), в то время как по цепи с проводимостью g_K^i ионы K^+ легче проникают внутрь клетки (направленное внутрь выпрямление). Существуют также два различных типа натриевой проводимости. Одним из них является проводимость по быстрым натриевым каналам (g_{Na}^s), другим — по более медленным каналам (g_{Na}^i). Кроме того, существует также путь медленной неспецифической проводимости, определяемой током как ионов Na^+ , так и ионов Ca^{2+} , которые, возможно, конкурируют друг с другом. Избирательная кальциевая проницаемость (g_{Ca}^s) также медленная. Стрелки, перечеркивающие линии сопротивления указывают, что эти сопротивления являются переменными, зависящими от мембранного потенциала и времени. В клетке такого типа обязательно должны иметь место все три типа медленных каналов. По [3].

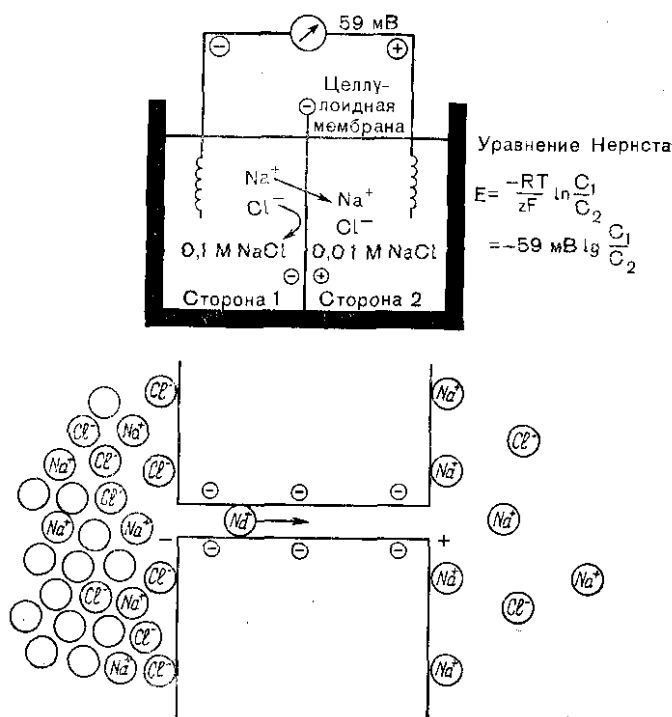


Рис. 3.4. Диффузионный потенциал в концентрационной ячейке, создаваемый мембраной с отрицательно заряженными порами. Мембрана непроницаема для ионов Cl^- , но проницаема для катионов, например, ионов Na^+ . Градиент концентрации ионов Na^+ приводит к созданию разности потенциалов по обе стороны мембраны, причем отрицательной будет та из них, около которой концентрация ионов Na^+ выше (верхний рисунок). Увеличившаяся схема мембранной поры, заполненной водой, на которой показано прохождение ионов Na^+ , но ионы Cl^- через пору проникать не могут. Разность потенциалов возникает вследствие разделения зарядов, причем вблизи правой поверхности мембраны образуется некоторый избыток ионов Na^+ , а вблизи левой — избыток ионов Cl^- (нижний рисунок) [3].

но: $E_{\text{Na}} = +60 \text{ мВ}$, $E_{\text{Ca}} = +129 \text{ мВ}$, $E_{\text{K}} = -94 \text{ мВ}$ и $E_{\text{Cl}} = -80 \text{ мВ}$ (рис. 3.3). Знак равновесного потенциала отражает направление концентрационного градиента, причем сторона, где концентрация выше, будет иметь отрицательный потенциал в случае положительного иона (катиона) и положительный — в случае отрицательного иона (аниона). Любой ион, равновесный потенциал которого отличается от потенциала покоя (-80 мВ), находится в неравновесном состоянии, и поэтому его необходимо откачивать насосом с потреблением энергии. По-видимому, в миокарде только ионы Cl^- находятся в состоянии, близком к равновесию, в то время как ионы Na^+ , Ca^{2+} и K^+ активно транспортируются. Вопросы, связанные с концентрационными ячейками и диффузией, детально обсуждаются в [3]; механизм возникновения равновесного потенциала представлен на рис. 3.4 и обсуждается в подписи к этому рисунку.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ДВИЖУЩИЕ СИЛЫ И МЕМБРАННЫЕ ИОННЫЕ ТОКИ

Электрохимическая движущая сила для каждого вида ионов представляет собой алгебраическую разность между его равновесным потенциалом E_i и мембранным потенциалом E_m . Полная движущая сила равна сумме электродвижущей силы (например, отрицательный потенциал в клетке стремится вытолкнуть положительно заряженные ионы) и диффузионной силы (зависящей от градиента концентраций) (рис. 3.5). Таким образом, в покое движущая сила для ионов Na^+ составляет $(E_m - E_{\text{Na}}) = (-80 \text{ мВ}) - (+60 \text{ мВ}) = -140 \text{ мВ}$. Знак минус означает, что движущая сила способствует движению ионов Na^+ внутрь клетки. Движущая сила для ионов Ca^{2+} составляет $(E_m - E_{\text{Ca}}) = (-80 \text{ мВ}) - (+129 \text{ мВ}) = -209 \text{ мВ}$. Для ионов K^+ она составляет $(E_m - E_{\text{K}}) = (-80 \text{ мВ}) - (-94 \text{ мВ}) = +14 \text{ мВ}$, следовательно, движущая сила для ионов K^+ мала и направлена наружу. В покоейся клетке движущая сила для ионов Cl^- равна нулю: $(E_m - E_{\text{Cl}}) = (-80 \text{ мВ}) - (-80 \text{ мВ}) = 0$. Однако во время потенциала действия E_m изменяется, и движущая сила для ионов Cl^- становится отличной от нуля, заставляя их перемещаться внутрь клетки. Аналогично этому движущая сила для перемещения ионов K^+ наружу увеличивается во время ПД, в то время как для ионов Na^+ и Ca^{2+} она уменьшается.

Значение суммарного тока для каждого вида ионов (I_i) равно величине его движущей силы, умноженной на проводимость мембраны для этого иона (g_i — величина, обратная сопротивлению), что представляет собой модификацию закона Ома, $I = V/R = g \cdot V$, с учетом того, что в электролите сила, определяющая перемещение заряженной частицы, состоит из электродвижущей силы и концентрационной (или химической) силы. Таким образом, для указанных выше четырех ионов суммарный ток может быть выражен следующим образом: $I_{\text{Na}} = g_{\text{Na}} (E_m - E_{\text{Na}})$; $I_{\text{Ca}} = g_{\text{Ca}} (E_m - E_{\text{Ca}})$; $I_{\text{K}} = g_{\text{K}} (E_m - E_{\text{K}})$ и $I_{\text{Cl}} = g_{\text{Cl}} (E_m - E_{\text{Cl}})$. В клетке в состоянии покоя токами Cl^- и Ca^{2+} можно пренебречь, а Na^+ -ток (входящий) должен быть равен K^+ -току (выходящему), но направлен в противоположную сторону для поддержания постоянного потенциала покоя: $I_{\text{K}} = I_{\text{Na}}$. Таким образом, несмотря на то что в состоянии покоя клетки движущая сила для ионов Na^+ значительно больше, чем для ионов K^+ , токи, переносимые этими ионами, равны, так как g_{K} значительно больше, чем g_{Na} . Значит, даже в покое существует постоянная утечка ионов Na^+ внутрь клетки и ионов K^+ наружу, поэтому, если заблокировать активные насосы, то градиенты концентраций быстро исчезнут. Так как отношение движущих сил для Na^+ и K^+ равно 10 (140 мВ/14 мВ), то отношение проводимостей ($g_{\text{Na}}/g_{\text{K}}$) также должно быть около 1:10. Так как g_{K} значительно выше, чем g_{Na} , то понятно, почему величина потенциала покоя ближе к E_{K} , чем к E_{Na} .

В мембране миокардиальных клеток найдено по крайней мере 2 различных вида потенциалозависимых K^+ -каналов (см.

Рис. 3.5. Электрохимические движущие силы для ионов Na^+ , Ca^{2+} , K^+ и Cl^- . Равновесные потенциалы для каждого вида ионов (например, E_{Na}) расположены по вертикали в соответствии с их величиной и знаком. Они рассчитаны на основании уравнения Нернста для некоторого заданного соотношения внутриклеточных и внеклеточных концентраций ионов. Предполагается, что потенциал покоя, измеренный в типичной клетке, составляет -80 мВ. Электрохимическая движущая сила для данного вида ионов является разностью между равновесным потенциалом (E_p) и мембранным потенциалом E_m , т. е. $(E_p - E_m)$. Таким образом, в покое движущая сила для ионов Na^+ равна разности между E_{Na} и потенциалом покоя E_m , если $E_{\text{Na}} = +60$ мВ, а $E_m = -80$ мВ, то движущая сила составляет 140 мВ. Итак, движущая сила является алгебраической суммой диффузионной и электродвижущей силы, и на схеме ее величина отмечена длиной стрелки. Движущая сила для ионов Ca^{2+} (около 210 мВ) больше, чем для ионов Na^+ , а для ионов K^+ значительно меньше (около 14 мВ). Направление стрелок указывает направление электродвижущих сил для ионов каждого вида. Например, для ионов K^+ она направлена наружу, а для ионов Na^+ и Ca^{2+} — внутрь. Ионы Cl^- распределяются пассивно относительно мембраны, поэтому их расположение зависит только от мембранного потенциала; для клетки, находящейся в состоянии покоя длительное время, $E_{\text{Cl}} = E_m$ и электродвижущая сила для Cl^- равна 0 . По [3].

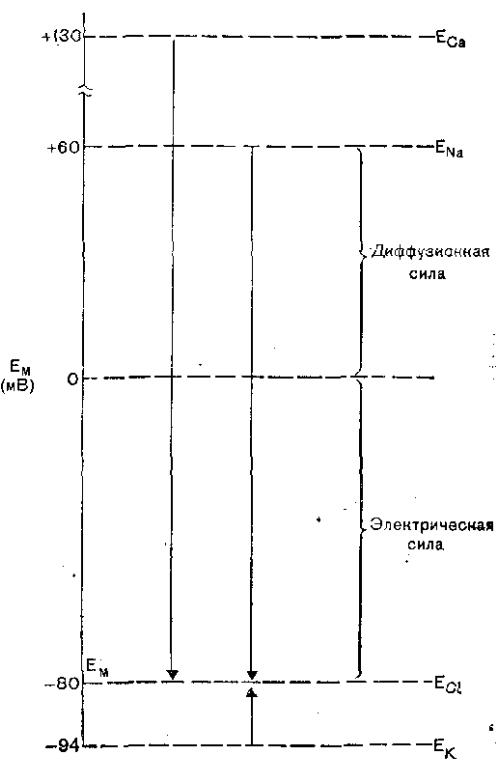


рис. 3.3, В). Один из них пропускает ионы K^+ внутрь (против обычного электрохимического градиента для ионов K^+) легче, чем наружу. Это так называемый эффект внутрь направленного выпрямления. Такие каналы, не имеющие воротного механизма, ответственны за аномальное выпрямление. При деполяризации мгновенно уменьшается проводимость этих каналов, а при реполяризации она снова возрастет. Потенциалзависимые K^+ -каналы второго типа похожи на обычные K^+ -каналы, обнаруженные в других возбудимых мембранах. Они медленно открываются (увеличивая общую величину g_{K}) при деполяризации, создавая так называемый эффект задержанного выпрямления. Эти каналы легче пропускают ионы K^+ наружу (по направлению обычного электрохимического градиента для ионов K^+), чем внутрь, и поэтому называются каналами с наружу направленным выпрямлением. В миокарде каналы с задержанным выпрямлением открываются

значительно медленнее, чем в нерве или скелетной мышце. Их активация обуславливает сильное увеличение g_K , которое вызывает окончание ПД в миокарде.

РАСЧЕТ ПОТЕНЦИАЛА ПОКОЯ И ДИФфуЗИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА

Для заданного распределения ионов, которое в нормальных установившихся условиях остается практически постоянным, потенциал покоя зависит от относительной проводимости мембраны (g), или точнее проницаемости (P), для ионов Na^+ и K^+ . Потенциал покоя (около -80 мВ) очень близок к E_K (около -94 мВ), так как $g_K \gg g_{Na}$, или $P_K \gg P_{Na}$. Доказательство этого можно получить при анализе этой простой цепи (используя закон Ома и законы Кирхгофа). Поэтому мембранный потенциал всегда будет ближе к той батарее (равновесному потенциалу иона) из включенных параллельно, сопротивление которой меньше (или проводимость больше) (см. рис. 3.3, 3.5). В мембране в состоянии покоя такой батареей является E_K , в то время как в возбужденной мембране ею становится E_{Na} (или E_{Ca}) вследствие значительного повышения g_{Na} (и g_{Ca}) во время ПД. Ни один из видов ионов, распределенных пассивно относительно мембраны, не может влиять на потенциал покоя; наоборот, последний определяет распределение этого вида ионов. Следовательно, распределение Cl^- в миокарде можно не учитывать, потому что ионы этого вида, по-видимому, расположены пассивно относительно мембраны. Однако кратковременное движение ионов Cl^- через мембрану может оказывать влияние на E_m . Например, вымывание Cl^- из клетки (когда перфузионный раствор не содержит этих ионов) вызывает кратковременную деполяризацию, а восстановление их концентрации приводит к гиперполяризации, однако значение этих эффектов для потенциала покоя миокардиальных клеток очень незначительно. Ионы Ca^{2+} также относительно мало влияют на потенциал покоя E_m вследствие невысокой концентрации этих ионов во внеклеточной среде и низкой проницаемости для них мембраны кардиомиоцитов в состоянии покоя, поэтому ионами Ca^{2+} также можно пренебречь. Следовательно, в упрощенном виде уравнение постоянного поля Гольдмана—Ходжкина—Катца может быть записано в следующем виде (для $37^\circ C$):

$$E_m = -61 \text{ мВ} \lg \frac{[K]_i + P_{Na}/P_K [Na]_i}{[K]_o + P_{Na}/P_K [Na]_o}$$

Это уравнение показывает, что для данного распределения ионов потенциал покоя E_m определяется отношением P_{Na}/P_K , т. е. относительной проницаемостью мембраны для ионов Na^+ и K^+ . При постоянной величине E_m и неизменных концентрациях ионов между P_K и g_K и между P_{Na} и g_{Na} имеется прямая пропорцио-

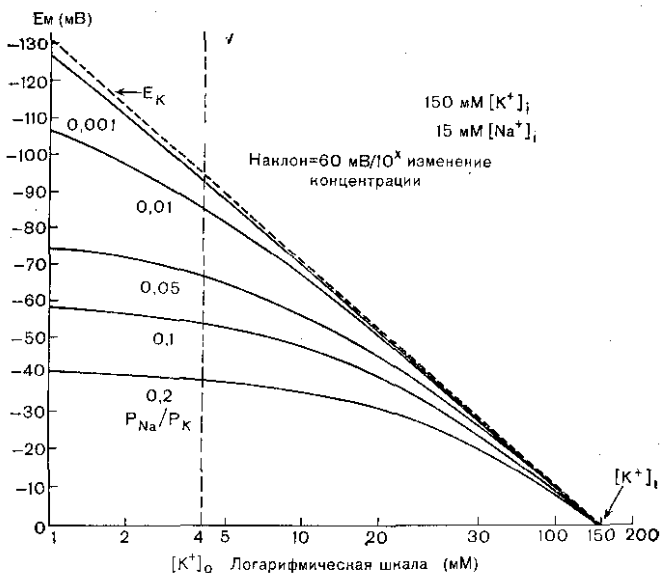


Рис. 3.6. Кривые, полученные в результате теоретического расчета зависимости потенциала покоя от $[K^+]_o$ на основании уравнения Гольдмана для постоянного поля. Представлено семейство кривых для разных величин отношений P_{Na}/P_K (0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2). Калиевый равновесный потенциал (E_K) рассчитан с помощью уравнения Нернста (пунктирная прямая). Кривые рассчитаны для $[K^+]_i = 150$ мМ и $[Na^+]_i = 15$ мМ. Расчеты проводились при условии постоянства суммы $[K^+]_o + [Na^+]_o = 154$ мМ, т. е. при повышении $[K^+]_o$ на ту же величину снижали $[Na^+]_o$. При расчетах не учитывали изменение P_K в зависимости от $[K^+]_o$. Кривые пересекают абсциссу ($E_m = 0$) в точке, равной $[K^+]_i$. Если $[K^+]_o$ больше $[K^+]_i$, то потенциал меняет знак. По [3].

нальная зависимость. Для миокардиальных клеток отношение P_{Na}/P_K составляет около 0,05.

Если внимательно посмотреть на уравнение постоянного поля, то можно увидеть, что числитель в основном определяется величиной $[K^+]_i$ (так как $(P_{Na}/P_K)[Na^+]_i$ очень мала), в то время как на знаменатель в равной степени влияют оба слагаемых $[K^+]_o$ и $(P_{Na}/P_K)[Na^+]_o$. Это объясняет, почему в нормальном растворе Рингера зависимость E_m от логарифма $[K^+]_o$ не является прямой линией (имеющей наклон 61 мВ на 10-кратное изменение концентрации) (рис. 3.6). Если увеличить $[K^+]_o$, а $[Na^+]_o$ уменьшить в эквимолярном соотношении, то в знаменателе все больший вес будет приобретать величина $[K^+]_o$ и все меньший — $(P_{Na}/P_K)[Na^+]_o$. Поэтому в перфузионных растворах с высокой концентрацией ионов K^+ уравнение постоянного поля приближается к простому уравнению Нернста для ионов K^+ , а E_m — к E_K . При повышении $[K^+]_o$ величина E_K соответственно уменьшается, так как $[K^+]_i$ остается относительно постоянной; поэтому мембрана все больше и больше деполяризуется (см. рис. 3.6).

Другой метод оценки потенциала покоя основан на уравнении для хордовой проводимости:

$$E_m = \frac{g_K}{g_K + g_{Na}} E_K + \frac{g_{Na}}{g_K + g_{Na}} E_{Na}.$$

Это уравнение достаточно просто выводится на основании закона Ома и анализа проводящей цепи при условии, что суммарный ток равен нулю. Уравнение хордовой проводимости еще раз показывает важность того факта, что потенциал покоя определяется отношением g_K/g_{Na} . При $g_K \gg g_{Na}$ E_m приближается к E_K ; и, наоборот, когда $g_{Na} \gg g_K$ (как во время фазы быстрой деполяризации ПД сердца), E_m сдвигается в сторону E_{Na} .

При повышении $[K^+]_o$ до 10 мМ иногда в некоторых клетках развивается гиперполяризация, достигающая почти 10 мВ. Такое явление часто наблюдается в клетках с высоким отношением P_{Na}/P_K (из-за низкой величины P_K), и потенциал покоя E_m в таких клетках по абсолютной величине меньше, чем в норме; этот эффект зарегистрирован в сердце на ранней стадии эмбрионального развития. Гиперполяризация может быть объяснена несколькими причинами: а) стимуляцией электрогенного Na^+ -насоса ($V_{эн}$); б — увеличением P_K (и, следовательно, g_K); в — увеличением g_K (но не P_K) под влиянием концентрации ионов на воротный механизм.

Угнетение Na^+/K^+ -насоса приводит к постепенному уменьшению градиентов концентраций. Клетки теряют ионы K^+ и накапливают ионы Na^+ , следовательно, потенциалы E_K и E_{Na} становятся меньше. Таким образом, клетки деполяризуются (даже если относительные проницаемости не изменились), что приводит к поглощению ими ионов Cl^- , а также воды (клетка разбухает). Т. е. в присутствии оубаина (при кратковременном воздействии, устраняющем только $V_{эн}$) потенциал покоя или диффузионный потенциал $E_{дифф}$ определяется градиентами концентраций ионов K^+ и Na^+ и относительной проницаемостью мембраны для K^+ и Na^+ . В норме при работе Na^+/K^+ -насоса к потенциалу покоя E_m добавляется еще величина $V_{эн}$, составляющая 3—6 мВ в миокардиальных клетках.

ПОТЕНЦИАЛ ЭЛЕКТРОГЕННОГО НАТРИЕВОГО НАСОСА

Na^+/K^+ -насос ответствен за поддержание градиентов концентраций катионов. Диффузионные потенциалы для ионов K^+ (E_K) и Na^+ (E_{Na}) составляют приблизительно -94 мВ и $+60$ мВ соответственно. Величина потенциала покоя обычно лежит около E_K , потому что проницаемость мембраны в состоянии покоя для ионов K^+ (P_K) намного больше, чем для Na^+ (P_{Na}). Точное значение потенциала покоя (E_m) зависит от отношения P_{Na}/P_K , причем в миокардиальных клетках оно находится в пределах 0,01—0,05, в то время как в гладкомышечных клетках и в узловых клетках сердца это отношение близко к 0,15. В различных типах клеток

сердца величина потенциала покоя E_m меньше (т. е. менее отрицательна), чем E_K , на 10—30 мВ. Можно показать, что непосредственный вклад в потенциал покоя вносит потенциал электрогенного насоса, т. е. Na^+/K^+ -насос влияет на потенциал покоя не только путем создания и поддержания градиентов концентраций ионов. Например, при блокировании Na^+/K^+ -насоса оубаином обычно развивается быстрая деполяризация на 3—8 мВ в зависимости от типа миокардиальных клеток. Другими словами, влияние потенциала электрогенного насоса на потенциал покоя E_m в нормальных физиологических условиях очень мало.

Однако в случаях, когда насос вынужден откачивать ионы с высокой скоростью, например при аномально высокой $[Na^+]_i$, непосредственная роль электрогенного насоса для потенциала покоя значительно повышается, и E_m может превысить E_K более чем на 30 мВ или больше. Например, если создать условия для уменьшения градиентов концентраций ионов (что происходит, например, при содержании миокардиальной ткани при низкой температуре в течение нескольких часов), а затем восстановить условия, стимулирующие активный транспорт ионов, то регистрируемая величина E_m может в течение длительного времени превышать теоретически рассчитанный потенциал E_K на 10—20 мВ (рис. 3.7). Загрузку ионов Na^+ в кардиомиоциты можно ускорить, если поместить клетки в холодный раствор Рингера с низкой концентрацией ионов K^+ или совсем без них, так как для работы Na^+/K^+ -насоса необходимо присутствие ионов калия во внеклеточной среде. Величина K_m (Na^+ , K^+)-АТФазы для ионов K^+ составляет приблизительно 2 мМ. После нескольких часов пребывания ткани в таком растворе внутриклеточные концентрации ионов Na^+ , K^+ и Cl^- приближаются к их концентрациям в окружающем растворе Рингера, и потенциал покоя становится очень маленьким (< -20 мВ). После этого ткань переносит в «откачивающий» раствор, представляющий собой тот же раствор Рингера, но содержащий ионы K^+ в нормальной концентрации и имеющий нормальную температуру. В этих условиях насос начинает работать с максимальной скоростью, так как ее величина в основном зависит от $[Na^+]_i$. Низкое начальное значение E_m также может активировать работу насоса, так как в этом случае требуется меньше энергии для выкачивания ионов Na^+ наружу. В таких предварительно нагруженных ионами Na^+ миокардиальных клетках абсолютная величина E_m начинает быстро увеличиваться, даже быстрее, чем E_K , как показано на рис. 3.7. Однако вскоре E_K снова становится больше E_m , как и в нормальных физиологических условиях. Любое воздействие, повышающее сопротивление мембраны (R_m), увеличивает электрогенность насоса (рис. 3.8). Сердечные гликозиды не вызывают кратковременной гиперполяризации, если потенциал мембраны ниже E_K [7].

Если предварительно охлажденный миокард нагреть, то нормальный потенциал покоя восстанавливается очень быстро (в течение 10 мин), в то время как восстановление внутриклеточных концентраций ионов Na^+ и K^+ происходит значительно медленнее

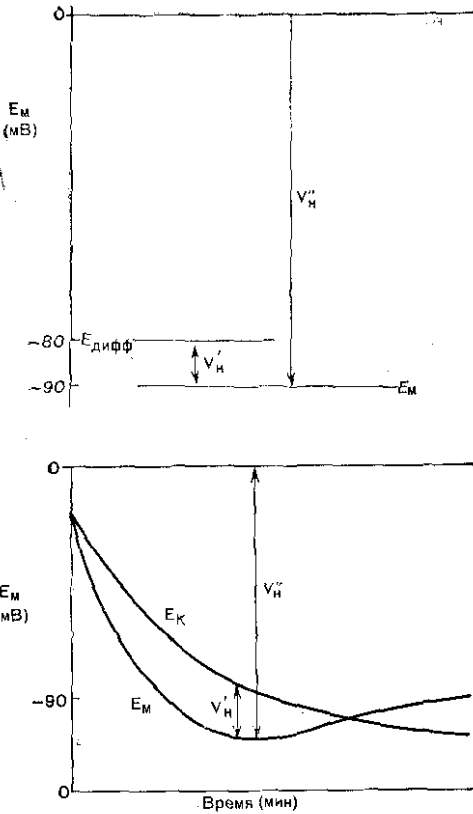


Рис. 3.7. Потенциал электрогенного натриевого насоса и его соотношение с мембранным потенциалом (верхний рисунок). Потенциал, определяемый диффузией ионов ($E_{\text{дифф}}$), в этой миокардиальной клетке равен -80 мВ ($E_{\text{дифф}}$ зависит от равновесных потенциалов ионов всех видов и их относительной проницаемости), тем не менее потенциал покоя в этой клетке, полученный при измерении E_m , оказывается больше по абсолютной величине. Разность между E_m и $E_{\text{дифф}}$ соответствует вкладу электрогенного насоса в потенциал покоя. Обычно непосредственный вклад насоса составляет лишь несколько милливольт, и его можно измерить, регистрируя величину деполяризации, возникающую сразу после полного ингибирования (Na^+ , K^+)-АТФазы сердечными гликозидами. Так как цепь, образованная насосом, не зависит от цепей, образованных ионными каналами, и включена параллельно им, полный потенциал, создаваемый при работе электрогенного насоса, должен быть равен V_n ".

Вклад электрогенного насоса в потенциал покоя ($E_m - E_{\text{дифф}}$) равен V_n ". На нижнем рисунке длительное угнетение работы $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -насоса (несколько часов) привело к повышению $[\text{Na}^+]_i$ и уменьшению $[\text{K}^+]_i$, так что потенциал покоя в клетке стал низким. Возвращение клетки в раствор с нормальным содержанием ионов Na^+ и K^+ вызывает стимуляцию работы насоса, и потенциал покоя E_m со временем возвращается к норме. Восстановление E_m происходит быстрее, чем восстановление E_K , как показано на графике. Каждый раз, когда E_m больше (более отрицателен), чем калиевый равновесный потенциал, разность (V_n) между ними должна отражать вклад потенциала натриевого насоса в E_m . Реальный потенциал, создаваемый при работе насоса, можно представить величиной V_n ". По [3].

[8]. Во время длительной гипоксии потенциал покоя становится значительно меньше, чем E_K (разница около 25 мВ) [9]. В такой ситуации электрогенный насос стремится поддерживать потенциал покоя на неизменном уровне, несмотря на постепенное исчезновение градиентов концентраций; т. е. степень электрогенности насоса (коэффициент сопряжения Na^+/K^+) может возрасти, чтобы скомпенсировать уменьшение скорости работы насоса.

Электрогенность Na^+/K^+ -насоса можно продемонстрировать другим способом, с помощью инъекции ионов Na^+ внутрь клетки через микроэлектрод, вызывающий небольшую кратковременную

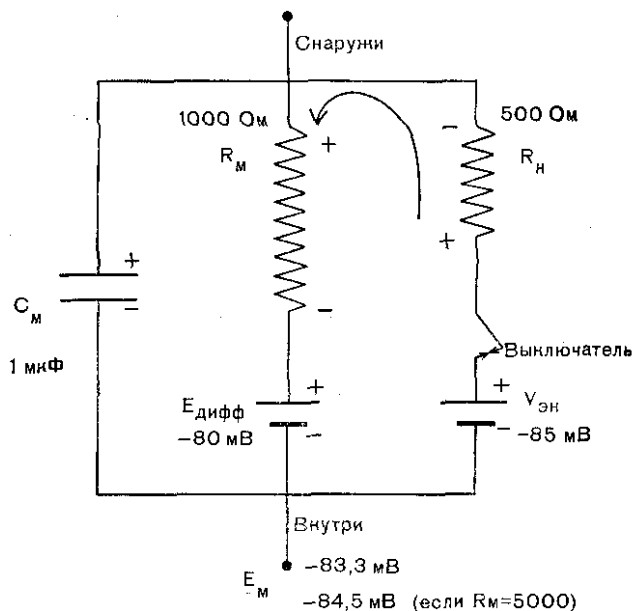


Рис. 3.8. Предполагаемая эквивалентная схема электрогенного натриевого насоса. Модель представляет собой цепь насоса, включенную параллельно с сопротивлением мембраны (R_M) и емкостью мембраны (C_M). Эта модель удовлетворяет условию, подтвержденному экспериментально, что работа насоса не зависит от процесса возбуждения мембраны и что белки, образующие насосы, и белки ионных каналов, по-видимому, встроены в бислойную липидную мембрану в виде параллельных элементов. Последовательно с R_M показана батарея с напряжением -80 мВ, соответствующая диффузионному потенциалу $E_{\text{дифф}}$, зависящему от равновесных ионных потенциалов и относительных проницаемостей. Предполагается, что цепь насоса состоит также из батареи и некоторого постоянного сопротивления (сопротивление насоса R_H , которое не меняется при изменении R_M и величина которого мало отличается от R_M в покое). Батарея насоса заряжена до некоторого напряжения (например, $V_{\text{эн}} = -85$ мВ) генератором тока насоса. При работе электрогенного насоса электрический ток может возникать, например, если на 3 выведенных из клетки иона Na^+ в нее вводится всего 2 иона K^+ . Для показанных на рисунке элементов цепи ($R_M = 1000$ Ом; $E_{\text{дифф}} = -80$ мВ; $R_H = 500$ Ом и $V_{\text{эн}} = -85$ мВ) измеряемый мембранный потенциал, рассчитываемый при анализе цепи, составит $-83,3$ мВ; т. е. непосредственный вклад потенциала электрогенного насоса в потенциал покоя будет равен $-3,3$ мВ. Если R_M увеличить до 5000 Ом (например, помещая клетку в раствор, не содержащий Cl^- , или добавляя ионы Ba^{2+} для снижения R_K , то при расчете получим $E_M = -84,5$ мВ, т. е. значительно ближе к $V_{\text{эн}} (-85$ мВ).
По [3].

гиперполяризацию. Последнюю можно устранить оубабином. Ток, генерируемый насосом, и скорость выведения ионов Na^+ из клетки пропорциональны количеству ионов Na^+ , введенного при инъекции.

Доказательство электрогенности насоса затрудняют следующие причины: 1. Например, необходимо строго доказать, что гиперполяризация, вызываемая инъекцией ионов Na^+ , не является ре-

зультатом ускорения работы электронейтрального насоса. В последнем случае происходит уменьшение концентрации ионов K^+ в ограниченном диффузионном пространстве в непосредственной близости к мембране; истощение запасов ионов вызовет увеличение E_k , а значит, и гиперполяризацию мембраны. Такое истощение может быть следствием того, что Na^+/K^+ -насос откачивает ионы K^+ быстрее, чем происходит пополнение этих ионов за счет диффузии из большого объема межклеточной жидкости. 2. Если гиперполяризация действительно обусловлена работой электрогенного Na^+/K^+ -насоса, то тогда она должна возрастать при увеличении сопротивления мембраны. 3. Необходимо показать, что изменения ионных проницаемостей (например, увеличение g_k или уменьшение g_{Na}) не способны объяснить наблюдаемую гиперполяризацию. Этим можно пренебречь, когда величина E_m превышает E_k , т. е. более отрицательна.

Предполагают, что мембранный потенциал способен влиять на работу электрогенного Na^+/K^+ -насоса. С энергетической точки зрения деполяризация должна стимулировать работу этого насоса, а гиперполяризация должна его ингибировать. Это объясняется тем, что при деполяризации уменьшается электрохимический градиент (а значит, и энергетический порог), против которого необходимо выводить ионы Na^+ , в то время как при гиперполяризации этот градиент возрастает. Если энергетические законы играют важную роль в работе насоса, то должен существовать некоторый потенциал, более отрицательный, чем E_k , при котором Na^+/K^+ -насос перестает работать (т. е. равновесный потенциал насоса).

Известно, что ионы Cl^- способны шунтировать потенциал электрогенного Na^+/K^+ -насоса. Например, если ионы Cl^- во внеклеточном растворе заменить менее проницаемым анионом, то электрогенный натриевый насос будет сильнее гиперполяризовать мембрану. Ионы Cl^- могут уменьшать роль создаваемого насосом потенциала, снижая сопротивление мембраны. Чем выше R_m , тем больший потенциал создается при работе электрогенного насоса.

Плотность расположения молекул Na^+/K^+ -насоса в мембране, оцениваемая по специфическому связыванию $[^3H]$ -оубаина, обычно составляет около 1000 на 1 мкм^2 . Число оборотов насоса обычно принимается равным $20-100 \text{ с}^{-1}$. Величина тока, генерируемого при работе насоса (исходя из $I_n = V_n/R_m$, где V_n —потенциал, создаваемый насосом), оказалась около $10 \text{ пмоль/см}^2 \cdot \text{с}$. При плотности 1000 насосов/ мкм^2 (10^{11} насосов/ см^2) и числе оборотов насоса 20 с^{-1} получаем 2×10^{12} циклов/ $\text{см}^2 \cdot \text{с}$. Если за каждый цикл переносится 3 иона Na^+ , то получим 6×10^{12} ионов $Na^+/\text{см}^2 \cdot \text{с}$; разделив этот результат на число Авогадро ($6,02 \times 10^{23}$ ионов/моль), получаем 10×10^{-12} моль/ $\text{см}^2 \cdot \text{с}$, т. е. ту же величину $10 \text{ пмоль/см}^2 \cdot \text{с}$, которая была зарегистрирована экспериментально. Суммарный ток насоса будет меньше, в зависимости от количества ионов K^+ , которые он перекачивает в противоположном направлении (т. е. от коэффициента сопряжения).

Можно построить следующую схему гипотетического механиз-

ма работы переносчика при активном сцепленном Na^+/K^+ -транспорте. Так как известно, что на одну молекулу АТФ переносится 3 иона Na^+ , можно предположить, что переносчик несет на себе суммарный отрицательный заряд, равный 3. Находясь на внутренней поверхности мембраны, переносчик может иметь значительно большее сродство к ионам Na^+ , чем к ионам K^+ , а на внешней стороне мембраны может быть справедливо обратное соотношение. Предполагается также, что переносчик не перемещается с внутренней стороны мембраны к наружной, пока он не связан с 3 ионами Na^+ .

На каждые 3 выводимых из клетки иона Na^+ должно быть введено 1—3 иона K^+ . Если насос электрогенный, т. е. генерирует при работе трансмембранный ток (и, следовательно, потенциал), то количество переносимых внутрь ионов K^+ должно быть меньше количества ионов Na^+ , выходящих наружу, т. е. коэффициент сопряжения Na^+/K^+ должен быть 3:2 или 3:1. Коэффициент сопряжения не может составлять 3:0 вследствие того, что наличие ионов K^+ во внеклеточном растворе, как хорошо известно, необходимо для работы насоса. Коэффициент сопряжения 3:2 или 3:1 может быть получен в том случае, если переносчик способен перемещаться в обратном направлении (с внешней стороны мембраны к внутренней), не будучи полностью загружен ионами K^+ . При измерениях чаще всего получают значение коэффициента сопряжения, равное 3:2. Однако коэффициент сопряжения в одной и той же клетке может, по-видимому, изменяться в зависимости от условий.

Если при данном коэффициенте сопряжения (например, 3:2) увеличить число оборотов Na^+/K^+ -насоса, например, повысив $[\text{Na}^+]_i$ или $[\text{K}^+]_o$, то вклад потенциала, генерируемого электрогенным насосом в E_m , увеличивается, что наблюдается также при постоянной скорости работы насоса, если повышается коэффициент сопряжения (например, до 3:1). Не ясно, какие факторы определяют величину коэффициента сопряжения. Потенциал, генерируемый насосом, главным образом пунтируется ионами K^+ . В некоторых типах клеток Na^+/K^+ -насос может переключаться, и вместо обмена ионов Na^+ на ионы K^+ осуществляется обмен ионов Na^+ на ионы Na^+ ; выбор одного из этих режимов работы определяется величиной отношения внутриклеточных концентраций АТФ/АДФ/ P_n . Имеются некоторые данные о том, что на коэффициент сопряжения Na^+/K^+ может влиять концентрация АДФ.

Вклад генерируемого насосом потенциала в E_m рассчитывается как разность между величиной E_m , измеренной при работающем насосе, и величиной E_m после остановки насоса под действием оубаина. Следовательно, создается впечатление, что потенциал, генерируемый насосом (V_n), подключен последовательно с истинным катионным диффузионным потенциалом ($E_{\text{дифф}}$):

$$E_m = E_{\text{дифф}} + R_{mH},$$

где i_n — ток, генерируемый электрогенным насосом; $E_{\text{дифф}}$ — мембранный потенциал E_m , рассчитанный только на основании урав-

нения постоянного поля, исходя из градиентов концентраций ионов и их относительных проницаемостей, без учета потенциала, создаваемого электрогенным насосом. Это уравнение означает, что E_m представляет собой сумму величин $E_{\text{дифф}}$ и потенциала, генерируемого электрогенным насосом. Однако генерируемый насосом потенциал, по-видимому, следует рассматривать как включенный параллельно с $E_{\text{дифф}}$ (см. рис. 3.8). Вследствие того что плотность насосов более чем в 1000 превышает плотность Na^+ - и K^+ -каналов в покоящейся мембране, не должно быть никакой связи между цепью, создаваемой насосом (активный поток) и R_m (пассивный поток ионов). Цепь насоса расположена параллельно с цепью пассивного сопротивления. Истинный генерируемый насосом потенциал должен быть значительно больше, чем ΔE_m , согласно регистрации E_m в отсутствие и в присутствии оубаина; т. е. в качестве генерируемого насосом потенциала следует рассматривать полный потенциал между нулем и максимальным отрицательным потенциалом (V_n''), создаваемым при работе насоса (см. рис. 3.7).

Одна из возможных эквивалентных цепей для электрогенного Na^+/K^+ -насоса, учитывающая большинство известных фактов, показана на рис. 3.8. Цепь, создаваемая насосом, расположена параллельно с цепью, образованной ионной проводимостью, поэтому генерируемый насосом потенциал представляет собой полный потенциал (а не ΔV). Цепь насоса показана в виде источника напряжения с выключателем. Выключатель разомкнут (бесконечное сопротивление), когда потенциал, создаваемый насосом, равен нулю или низок настолько, что не может закорачивать $E_{\text{дифф}}$. Относительно постоянное сопротивление (R_n) небольшой величины и включенное последовательно с насосом, позволяет объяснить, что вклад потенциала, создаваемого насосом, в E_m (ΔV) является функцией сопротивления мембраны (R_m): чем выше R_m (R_n постоянно), тем ближе E_m к V_n . Генератор тока насоса заряжает его батарею до некоторого определенного напряжения. Если насос заблокирован оубаином, то создаваемый им потенциал быстро исчезает, разряжаясь через R_m с постоянной времени $(R_m + R_n)C_m$. Если $V_n < E_{\text{дифф}}$ (-80 мВ), то $E_m = -80$ мВ, т. е. создаваемый насосом потенциал маскируется $E_{\text{дифф}}$. Если же $V_n > E_{\text{дифф}}$, значение E_m будет находиться между $E_{\text{дифф}}$ и V_n . Точная регистрируемая величина E_m зависит от величин V_n и R_m . Анализируя цепь для величин параметров, приведенных на рис. 3.8, получаем, что E_m должен быть равен $-83,3$ мВ, т. е. сравнительно близко к величине V_n (-85 мВ) (табл. 3.2). Если R_m увеличить в 5 раз (до 5000 Ом), то E_m будет равен $-84,5$ мВ, т. е. еще приблизится к V_n (см. табл. 3.2). Таким образом, такая эквивалентная цепь действительно способна продемонстрировать зависимость вклада создаваемого насосом потенциала от R_m . К этому выводу можно прийти другим путем: чем больше R_m (по отношению к R_n), тем больше вклад V_n в E_m , потому что меньшая доля потенциала V_n закорачивается через R_m . Если величина $E_{\text{дифф}}$ снижена (например, в клетках с высоким отношением $R_{\text{Na}}/R_{\text{K}}$ или при понижении

Таблица 3.2. Суммарные данные по расчету потенциала покоя E_m на модели, в которой потенциал электрогенного насоса (V_n) подключен параллельно диффузионному потенциалу

$E_{\text{дифф}}$ (мВ)	R_m (Ом · см ²)	R_n (Ом · см ²)	V_n (мВ)	Регистрируе- мый E_m (мВ)	$(E_m - E_{\text{дифф}})$ (мВ)
(1) -80	1000	500	-85	-83,3	-3,3
(2) -80	1000	500	-90	-86,7	-6,7
(3) -80	1000	500	-80	-80,0	0
(4) -80	1000	500	-70	-73,3	+6,7
(5) -80	1000	500	0	-26,7	+53,4
(6) -80	2000	500	-85	-84,0	-4,0
(7) -80	4000	500	-85	-84,5	-4,5
(8) -80	500	500	-85	-82,5	-2,5
(9) -80	1000	1000	-85	-82,5	-2,5
(10) -75	1000	500	-85	-81,6	-6,6
(11) -75	1000	1000	-85	-80,0	-5,0

R_m — сопротивление мембраны; R_n — сопротивление насоса; ΔV — вклад V_n в регистрируемую величину E_m . E_m рассчитывался с помощью следующего соотношения:

$$E_m = \frac{R_m}{R_m + R_n} V_n + \frac{R_n}{R_m + R_n} E_{\text{дифф}}$$

E_K путем повышения $[K^+]_o$), то относительный вклад создаваемого насосом потенциала в E_m становится больше. Например, для тех же значений параметров, показанных на рис. 3.8, если $E_{\text{дифф}}$ изменить от -80 до -50 мВ, то E_m был бы равен -76,7 мВ (см. рис. 3.2), т. е. теперь ΔV станет 26,7 мВ по сравнению с 6,7 мВ (см. рис. 3.2). Как и следовало ожидать, повышение V_n (путем стимуляции работы насоса или увеличения коэффициента сопряжения) гиперполяризует мембрану [ср. (4) и (3) в табл. 3.2], а величина гиперполяризации, создаваемой при увеличении V_n , становится тем больше, чем меньше величина $E_{\text{дифф}}$ [ср. (8) и (4) в табл. 3.2].

Физиологическое значение потенциала, создаваемого электрогенным насосом в миокардиальных клетках, не совсем понятно. Небольшое изменение потенциала покоя мембраны, обусловленное вкладом потенциала насоса, может существенно влиять на уровень инактивации быстрых Na^+ -каналов. Кроме того, потенциал, создаваемый электрогенным насосом, может задерживать деполяризацию в неблагоприятных условиях (например, при ишемии и гипоксии) и ускорять восстановление нормального потенциала покоя при окончании неблагоприятных условий. Для возбудимой клетки необычайно существенно поддерживать потенциал покоя на нормальном уровне, так как даже небольшая деполяризация влияет на скорость нарастания потенциала действия и скорость распространения возбуждения, а при значительной деполяризации происходит полная утрата возбудимости.

В клетках с низким потенциалом покоя (например, в гладкомышечных клетках сосудов и в узловых клетках сердца) (см.

табл. 3.1) вклад создаваемого насосом потенциала может быть значительно больше. Ритмичные изменения скорости работы Na^+/K^+ -насоса могут вызывать осцилляции E_m , которые в свою очередь могут иметь важное значение для регуляции спонтанной активности клетки. Повышение активности насоса вызывает гиперполяризацию мембраны, что угнетает автоматическую активность узловых клеток в то время, как замедление работы насоса приводит к деполяризации мембраны и генерации потенциала действия. Колебания скорости работы насоса могут быть вызваны изменениями $[\text{Na}^+]_i$. Например, возбуждение клетки обуславливает повышение $[\text{Na}^+]_i$ (а в узловых клетках отношение объема к площади поверхности мало), что вызывает активацию работы электрогенного насоса. В свою очередь увеличение скорости работы насоса приводит к гиперполяризации и подавляет возбуждение клетки, что влечет за собой снижение $[\text{Na}^+]_i$ и устранение стимулирующего воздействия на насос; замедление работы насоса вызывает деполяризацию и возбуждение клетки, и цикл снова повторяется. Noma, Irisawa [10] пришли к заключению, что в клетках SA-узла сердца кролика электрогенный Na^+/K^+ -насос может быть одним из факторов, модулирующих частоту сердечного ритма в физиологических условиях. Если проводящие кардиомиоциты или узловые клетки стимулировать с высокой частотой, то после прекращения стимуляции происходит кратковременное угнетение их автоматической активности («overdrive suppression»). Основная причина этого явления заключается в стимуляции электрогенного насоса вследствие повышения $[\text{Na}^+]_i$ [11, 12].

ПЕЙСМЕКЕРНЫЕ ПОТЕНЦИАЛЫ И АВТОМАТИЗМ

Для поддержания постоянного потенциала покоя выходящий K^+ -ток должен быть равен по величине и противоположен по направлению входящему Na^+ -току (в основном Na^+ , но также и Ca^{2+}) при допущении, что ионы Cl^- распределены пассивно. Если величина входящего тока превышает величину выходящего, то мембрана будет деполяризоваться с некоторой скоростью, определяющей крутизну пейсмерного потенциала или диастолическую (фаза 4) деполяризацию, которая зависит от величины суммарного входящего тока (или превышения величиной входящего тока величины выходящего). Входящие Na^+ - и Ca^{2+} -токи утечки часто называют фоновым входящим током. Для того чтобы величина входящего тока превысила величину выходящего (т. е. чтобы суммарный ток стал входящим), можно увеличить входящий ток или уменьшить выходящий ток I_K . Оба эти механизма участвуют в генерации пейсмерного потенциала водителя ритма сердца. Например, если после ПД и следовой гиперполяризации происходит уменьшение g_K во времени, то I_K снижается и мембрана деполяризуется (g_{Na}/g_K постепенно возрастает). И наоборот, если увеличить g_K в покое с помощью ацетилхолина (Ацх), то это приводит к росту выходящего тока I_K , мембрана гиперполяризуется

и крутизна пейсмекерного потенциала уменьшается, снижая таким образом частоту возбуждения. Некоторые вещества, как, например, порадрепалин, могут усиливать фоновый ток и снижать силу выходящего тока, увеличивая таким образом крутизну пейсмекерного потенциала, влияя на оба механизма.

Необходимым условием возникновения автоматизма является достаточно низкая проницаемость клеточной мембраны для ионов Cl^- (g_{Cl}). Это условие выполняется для всех или для большинства типов клеток сердца. При высокой величине g_{Cl} развитие пейсмекерного потенциала затруднено вследствие шунтирующего действия I_{Cl} . Например, если портяжную мышцу лягушки с высоким отношением $g_{\text{Cl}}/g_{\text{K}}$, равным 4.0, перфузировать раствором, содержащим 0,5 мМ Ba^{2+} , то потенциал покоя в ней меняется незначительно. Однако, когда мышцу предварительно выдерживают в растворе без ионов Cl^- для снижения g_{Cl} до нуля, ионы Ba^{2+} вызывают быструю деполяризацию, повышение R_{m} и возникновение автоматической активности [13]. Влияние ионов Cl^- можно объяснить по-другому, используя модель Коула [14], в которой возбудимая мембрана описывается цепью с параллельно включенными емкостью и индуктивностью ($C_{\text{m}}L_{\text{m}}$). При высоком шунтирующем сопротивлении R_{Cl} (и R_{Na}) эта модель предсказывает возникновение спонтанных колебаний потенциала. Индуктивность мембраны L_{m} обусловлена особыми свойствами сопротивления, связанного с калиевыми каналами: с аномальным выпрямлением. Такое выпрямление вызывает мгновенное уменьшение g_{K} при деполяризации мембраны и его увеличение при гиперполяризации.

При развитии пейсмекерного потенциала происходит постепенное повышение R_{m} в результате уменьшения g_{K} [15, 16]. Быстрое прекращение роста g_{K} (задержанное выпрямление) ответственно за быструю реполяризацию, завершающую потенциал действия, и развитие вслед за ним следовой («положительной») гиперполяризации, которая обычно наблюдается в пейсмекерных клетках. Уменьшение g_{K} вызывает деполяризацию. Пейсмекерная деполяризация в клетках сердца обычно развивается линейно во времени.

В некоторых случаях в сердечных клетках может возникнуть автоматизм другого типа, когда следовая гиперполяризация вызывает появление высокоамплитудной следовой деполяризации [17]. Если такая следовая деполяризация достигает порогового потенциала ($V_{\text{п}}$), то начинается генерация следующего потенциала действия. При таком типе автоматизма каждый последующий ПД запускается предыдущим. Поэтому непрерывная последовательность ПД может быть остановлена простым блокированием одного ПД в этой серии (например, с помощью короткого импульса гиперполяризующего тока) [18, 19]. Верапамил угнетает такую следовую деполяризацию, а сердечные гликозиды усиливают ее [20, 21], вызывая, таким образом, эктопический пейсмекерный автоматизм.

В определенных условиях все клетки сердца способны прояв-

лять автоматическую активность. Например, автоматизм развивается в клетках желудочков, выращенных в условиях культуры ткани [16, 18]. Автоматизм развивается также в миокардиальных клетках при действии ионов Ba^{2+} , снижающих g_K и вызывающих деполяризацию [18, 19, 22, 23]. Спонтанные возбуждения миокарда желудочков наблюдаются также при длительной деполяризации, вызванной пропусканьем через ткань электрического тока [16, 24—26]. Это означает, что если E_m смещен в область потенциалов, где может проявляться пейсмекерная активность, то возникает автоматизм. Если же при пропусканьи электрического тока мембрана пейсмекерной клетки сердца гиперполяризуется, то частота спонтанных возбуждений уменьшается вплоть до полной остановки, т. е. автоматизм угнетается при больших потенциалах покоя [16]. И наоборот, подача деполяризующего тока увеличивает частоту возбуждения. Таким образом, крутизна нарастания пейсмекерного потенциала необычайно чувствительна к небольшим изменениям E_m . Чем больше E_m превышает E_K (в разумных пределах), тем выше степень автоматизма (и аномального выпрямления). При низкой величине g_K , что также означает относительно низкую величину потенциала покоя, автоматизм усиливается. Увеличение $[\text{K}^+]_o$, которое повышает g_K , угнетает автоматизм, несмотря на деполяризацию мембраны [22, 27].

В сердце, находящемся в нормальных условиях, имеет место следующая последовательность автоматических центров: клетки СА-узла > клетки АВ-узла > проводящие сердечные миоциты. В миокардиальных клетках предсердий и желудочков автоматизм развивается только в патологических условиях, таких как локальная ишемия. Природа возникновения автоматизма проводящих сердечных миоцитов несколько отличается от таковой узловых клеток [28—30]. В нормальных условиях автоматизм клеток, стоящих ниже в последовательном ряду (например, проводящие сердечные миоциты), находится в латентном состоянии («латентные пейсмекеры») вследствие того, что главный водитель ритма (СА-узел) возбуждает эти клетки с более высокой частотой. Благодаря явлению угнетения автоматизма высокочастотной стимуляцией (частое возбуждение пейсмекерной клетки вызывает ее гиперполяризацию, что приводит к остановке автоматической активности после прекращения внешнего возбуждения), латентные пейсмекеры обычно могут частично находиться в таком угнетенном состоянии. Поэтому пейсмекерный потенциал в таких клетках может не проявляться во время диастолы, но может и быть заметен на регистрациях. Одним из факторов, вызывающих угнетение автоматизма высокочастотной стимуляцией, может быть усиление активности электрогенного Na^+/K^+ -насоса вследствие увеличения $[\text{Na}^+]_i$ при высокой частоте возбуждения [12, 31]. Кроме того, при высокой частоте возбуждения в межклеточном пространстве накапливаются ионы K^+ .

Важной особенностью пейсмекеров является отсутствие аккомодации: независимо от скорости изменения E_m при достижении порогового потенциала $V_{\text{пор}}$ в них возникает ПД. Это может быть

связано с существованием в их мембране однородной популяции ионных каналов, характеризующихся практически одинаковой зависимостью вероятности открывания ворот от потенциала, с высокой величиной g_{Cl} (влияние хлорного тока, стабилизирующее потенциал покоя, менее выражено), или с небольшим g_K в результате номинального выпрямления. При развитии пейсмерной деполаризации медленные каналы практически не инактивируются, так как это происходит при менее отрицательных потенциалах (между -45 и -10 мВ).

Очаг автоматизма сердца (узловые клетки) обычно находится под контролем вегетативной нервной системы. Освобождение АЦХ из парасимпатических нервных окончаний увеличивает g_K , что приводит к гиперполяризации клеток (E_m приближается к E_K) и угнетению очага автоматизма. АЦХ также угнетает этот очаг, подавляя медленный входящий ток [32]. Освобождение норадреналина из симпатических нервных окончаний приводит к усилению медленного входящего тока и уменьшению g_K (влияя на скорость его активации); оба фактора способствуют увеличению автоматизма.

Возникновение пейсмерных потенциалов более подробно изложено в главе 5.

ВЛИЯНИЕ ПОТЕНЦИАЛА ПОКОЯ НА ПОТЕНЦИАЛ ДЕЙСТВИЯ

Любое вещество, влияющее на потенциал покоя (например, деполаризующее мембрану), будет существенно воздействовать на сердечный ПД. Деполаризация уменьшает скорость нарастания ПД и, таким образом, замедляет распространение возбуждения в сердце. Это будет отражаться на эффективности работы сердца как насоса для перекачки крови. При увеличении степени деполаризации эти эффекты усиливаются. Если миокардиальные клетки или проводящие сердечные миоциты деполаризованы приблизительно до -50 мВ, тогда скорость нарастания ПД падает до нуля, а возбудимость исчезает (вместе с сократительной активностью), что приводит к остановке сердца. Гиперполяризация обычно вызывает лишь незначительное увеличение скорости нарастания ПД, а более высокая гиперполяризация может в действительности уменьшить скорость проведения (вследствие увеличения критической величины деполаризации, необходимой для смещения мембранного потенциала к пороговому уровню) и вызвать блок проведения.

Влияние потенциала покоя («стартового» потенциала) на максимальную скорость нарастания (V_{\max}) ПД можно объяснить на основании сигмоидальной зависимости h_{∞} от E_m . В терминах теории Ходжкина—Хаксли h является параметром инактивации для быстрой натриевой проводимости; он носит вероятностный характер, описывая переход инактивационных (I) ворот канала из открытого состояния ($h=1,0$) в закрытое ($h=0$) (рис. 3.9;

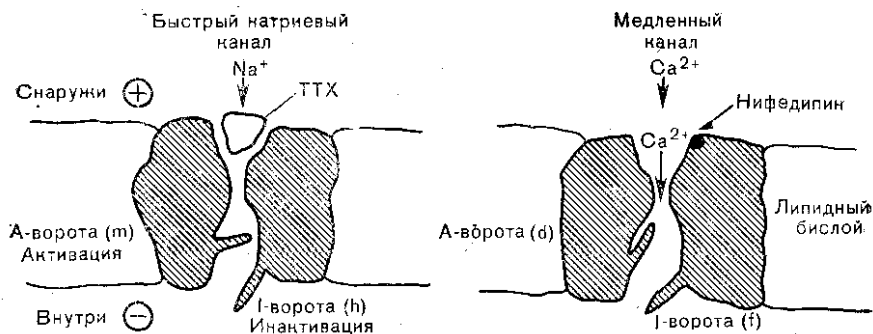


Рис. 3.9. Рисованные модели быстрого натриевого канала (слева) и медленного канала (справа) в мембране миокардиальной клетки. Как видно на рисунке, каждый такой канал имеет два воротных механизма: активационные ворота (А) и инактивационные ворота (I). Вероятно, эти ворота несут положительный заряд, поэтому они чувствительны к потенциалу на мембране. I-ворота движутся медленнее А-ворот. Кинетика ворот медленного канала значительно более снижена, чем кинетика ворот быстрого натриевого канала. Быстрый натриевый канал показан в состоянии покоя (А-ворота закрыты; I-ворота открыты), когда только начинается процесс активации, в то время как медленный канал показан в активированном состоянии (все ворота открыты), и процесс инактивации только начинается. Деполяризация вызывает быстрое открывание А-ворот, так что канал становится проводящим (активированное состояние). Однако деполяризация вызывает также закрывание I-ворот, происходящее медленнее, что приводит к инактивации канала (инактивированное состояние). В процессе восстановления возбудимости при реполяризации А-ворота закрываются, а I-ворота открываются. На рисунке не показано, что, согласно гипотезе, некоторый белок, входящий в состав медленного канала, должен быть фосфорилирован для того, чтобы канал перешел в рабочее состояние и был способен активироваться потенциалом. Тетродотоксин (ТТХ) блокирует быстрый натриевый канал с наружной стороны мембраны, связываясь, по-видимому, с местом входа в канал. Верапамил и Mn^{2+} блокируют медленный канал. По [3].

3.10). Величина h является функцией E_m и времени (t); а h_{∞} представляет собой установившуюся величину h при бесконечном времени (практически $t > 20$ мс). При нормальном потенциале покоя (-80 мВ) h_{∞} равна 0,9—1,0 и уменьшается при деполяризации, становясь равной нулю приблизительно при -50 мВ. В покоящейся мембране I-ворота открыты и медленно закрываются (постоянная времени — несколько миллисекунд) при деполяризации, приводя к инактивации проводимости по быстрым натриевым каналам (см. рис. 3.9; 3.10).

Медленные каналы миокардиальных клеток похожи на быстрые натриевые каналы, за исключением того, что их активационные (А) и инактивационные (I) ворота имеют значительно более медленную кинетику, т. е. они медленнее открываются (активируются), закрываются (инактивируются) и восстанавливают возбудимость (реактивируются) (см. рис. 3.9; 3.10). Кроме того, зависимость их инактивации от потенциала сдвинута вправо, так что они начинают инактивироваться при потенциале около -45 мВ и полностью инактивируются при потенциале около 0 мВ [33, 34].

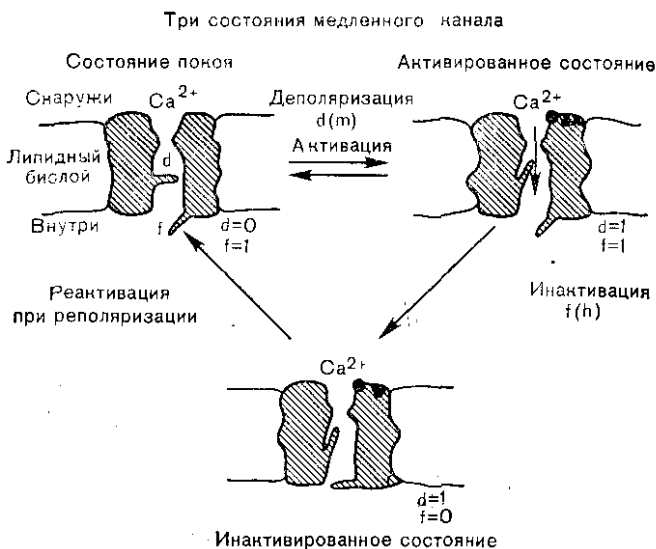


Рис. 3.10. Рисованная модель трех состояний медленного канала миокардиальной клетки, построенная по аналогии с моделью Ходжкина—Хаксли для быстрого натриевого канала. В состоянии покоя активационные (d) ворота закрыты, а инактивационные (f) ворота открыты. В активированном состоянии d -ворота открыты, а f -ворота еще не успели закрыться. В инактивированном состоянии d -ворота остаются открытыми, однако f -ворота закрываются. В процессе восстановления возбудимости канал переходит из инактивированного состояния вновь в состояние покоя при закрывании f -ворот.

Медленные каналы характеризуются также более высоким потенциалом активации (пороговым потенциалом), составляющим -35 мВ (по сравнению с -60 мВ для быстрых натриевых каналов). В том случае, когда быстрые натриевые каналы либо блокированы тетродотоксином (ТТХ), либо инактивированы деполаризацией при повышении $[K^+]_o$ (25 мМ, $E_m = -40$ мВ), такие вещества с положительным инотропным действием, как катехоламины или гистамин, восстанавливают возбудимость клеток путем увеличения числа медленных каналов, способных активироваться потенциалом. Скорость нарастания развивающегося в таком случае медленного ПД тоже зависит от параметра h_∞ (для медленных каналов миокардиальных клеток он обычно обозначается как f_∞), причем угнетение \dot{V}_{\max} начинается при -45 мВ, а при -20 мВ \dot{V}_{\max} становится равной 0. (Кажущееся расхождение между уровнями E_m , при которых \dot{V}_{\max} и f_∞ становятся равным нулю, объясняется тем, что распространение возбуждения прекращается, когда медленный входящий ток становится меньше некоторой минимальной величины). Эти зависимости показаны на рис. 3.11.

Потенциал покоя также влияет на длительность ПД. Деполаризация, вызванная пропусканием электрического тока, приводит

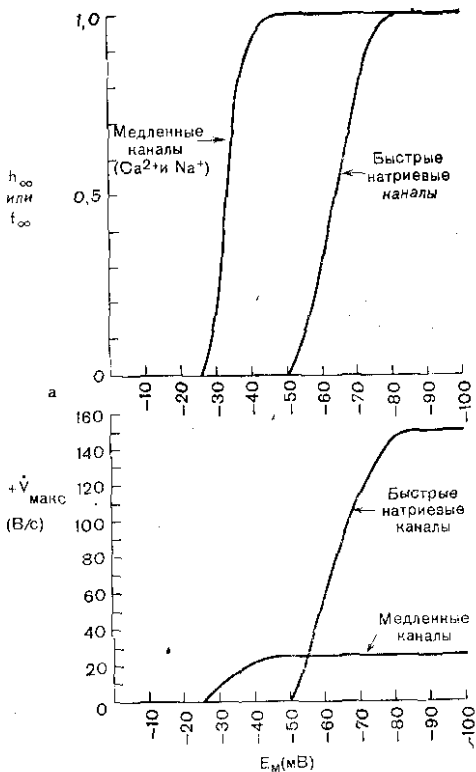


Рис. 3.11. Графики различного поведения быстрых натриевых и медленных натрий-кальциевых каналов в зависимости от потенциала.

а — h_{∞} — параметр инактивации быстрых натриевых каналов в модели Ходжкина — Хаксли ($g_{Na} = g_{Na} m^3 h$, где g_{Na} — натриевая проводимость, а m и h — вероятностные переменные, E_{Na} — максимальная натриевая проводимость). Он соответствует параметру f для медленных каналов. Показаны зависимости и от потенциала покоя E_m , h_{∞} и f_{∞} представляю собой значения параметров h и f при $t \rightarrow \infty$, т. е. в установившихся условиях (практически 20 мс для h и 1 с для f). График показывает, что быстрые натриевые каналы миокардиальной клетки начинают инактивироваться около -75 мВ и полная инактивация достигается при -50 мВ ($h=0$). В отличие от быстрых натриевых каналов медленные каналы инактивируются между -45 мВ ($f=1.0$) и -25 мВ ($f=0$); б — зависимость максимальной скорости нарастания потенциала действия ($+V_{\max}$) от потенциала покоя для нормального «быстрого» потенциала действия в миокарде (определяющегося током, поступающим по быстрым натриевым каналам) и для медленного потенциала действия (определяющегося током, поступающим по медленным каналам), развивающегося в клетках, когда быстрые натриевые каналы блокированы с помощью ТТХ или деполаризацией приблизительно до -45 мВ. $+V_{\max}$ является мерой плотности входящего тока (при условии, что все остальные свойства мембраны, как например емкость, остаются неизменными), в свою очередь зависящей от числа каналов, способных активироваться при возбуждении.

к удлинению ПД, а гиперполяризация укорачивает его. Если же для деполаризации клеток использовать повышение $[K^+]_o$, то ПД обычно укорачивается. В особых условиях, например, при перфузии раствором, не содержащим ионы Cl^- , ПД может удлиняться при повышении $[K^+]_o$ [30]. Одним из основных факторов, определяющих длительность ПД, является калиевая проводимость (g_k). Вещества или условия, увеличивающие g_k , такие как повышение $[K^+]_o$, будут способствовать уменьшению длительности ПД. И, наоборот, вещества, уменьшающие g_k или замедляющие активацию g_k , такие как ионы Ba^{2+} или тетраэтиламмония (TEA^+), увеличивают длительность ПД. Вследствие аномального выпрямления (т. е. уменьшения g_k при деполаризации и его увеличения при гиперполяризации) деполаризация током удлиняет ПД, а гиперполяризация — укорачивает его.

Продолжительность ПД зависит также от других факторов. Например, вещества, замедляющие закрытие инактивационных ворот быстрых натриевых каналов, такие как вератридин, удлиняют ПД. Вещества, влияющие на медленный входящий ток (I_{Si}),

Также влияют на длительность ПД. Замедление инактивации I_{Si} или увеличение его амплитуды способствует удлинению ПД, и наоборот, вещества, угнетающие I_{Si} , такие как верапамил или Mn^{2+} , слегка укорачивают ПД. Вещества, угнетающие метаболизм в сердце, такие как валиномицин, или же воздействие гипоксии в основном подавляют I_{Si} , уменьшают проводимость медленных каналов g_{Si} и косвенно вызывают более раннее увеличение g_K , так что ПД в сердце резко укорачивается [35—38].

Наконец, ПД клеток сердца заметно укорачивается при высокой частоте сердечного ритма. Такой эффект определяется тремя факторами: а — повышением $[Ca^{2+}]_i$ (в результате повышения $[Na^+]_i$ и стимуляции $Na^+—Ca^{2+}$ -обмена), вызывающим повышение g_K в покое и ускоряющим кинетику активации g_K (эффект Гардоса—Миха) [39—44]; б — аккумуляцией ионов K^+ с наружной стороны клеточной мембраны, увеличивающей g_K ; в — неполным восстановлением (реактивацией) медленных каналов, вызывающим угнетение I_{Si} .

ПРОФИЛЬ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛА В МЕМБРАНЕ

На внешней и внутренней поверхности клеточной мембраны расположены фиксированные отрицательные заряды. Они преимущественно обусловлены кислыми фосфолипидами бислоя и молекулами белков, либо встроенных в мембрану (в виде островков, плавающих в бислойном липидном матриксе), либо прочно адсорбированных на поверхности мембраны. У большинства белков изoeлектрическая точка находится в кислой области, так что при рН около 7,0 они обладают суммарным отрицательным зарядом. Потенциал на внешней поверхности клеточной мембраны по отношению к раствору, окружающему клетки, называется Z-потенциалом (дзета-потенциал). Этот заряд ответствен за электрофорез клеток в электрическом поле, причем клетки движутся к аноду (положительному электроду) в результате притяжения разноименных зарядов. Поверхностный заряд влияет на истинную трансмембранную разность потенциалов, как показано на рис. 3.12, а. С каждой стороны мембраны фиксированные заряды создают электрическое поле, которое распространяется на небольшое расстояние в раствор, приводя к тому, что обе стороны мембраны становятся немного более отрицательными (на несколько милливольт), чем внеклеточный и внутриклеточный растворы. Потенциал, теоретически регистрируемый идеальным электродом по мере того, как электрод передвигают сквозь раствор перпендикулярно поверхности мембраны, должен стать более отрицательным, когда он приближается на расстояние нескольких нанометров к поверхности; т. е. разность потенциалов между поверхностью мембраны и раствором экспоненциально спадает с изменением расстояния от поверхности. Постоянная длины является функцией ионной силы (или удельного сопротивления) раствора: чем меньше ионная сила, тем больше постоянная длины. Вели-

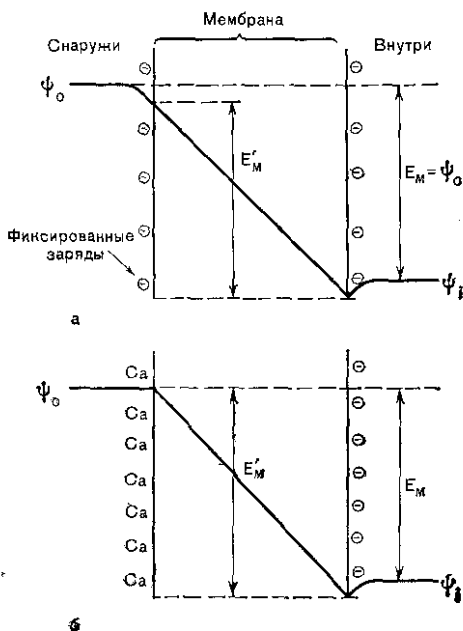


Рис. 3.12. Профиль распределения потенциала в клеточной мембране.

а — в связи с наличием на внешней и внутренней поверхностях мембраны фиксированных отрицательных зарядов (при рН 7,4) с обеих сторон мембраны возникают отрицательные потенциалы, распространяющиеся от края мембраны внутрь раствора. Такой поверхностный потенциал спадает в растворе экспоненциально с увеличением расстояния от края мембраны. Величина поверхностного потенциала зависит от плотности зарядов на поверхности; ψ_0 — потенциал внеклеточного раствора, ψ_1 — потенциал внутриклеточной среды, а мембранный потенциал (E_m) является разностью между ними ($\psi_0 - \psi_1$). E_m определяется равновесными потенциалами и относительными проницаемостями. Профиль распределения потенциала в мембране предполагается линейным (предположение постоянного поля), хотя для наших исследований его точная форма не существенна и она может на самом деле отличаться от линейной. Если поверхностный потенциал на внешней поверхности мембраны точно равен потенциалу на внутренней поверхности, то истинный мембранный потенциал (E'_m) равен мем-

бранному потенциалу (E_m), измеряемому с помощью микроэлектрода; б — если величина поверхностного потенциала на внешней поверхности мембраны отличается от таковой на внутренней поверхности, что в данном примере достигается путем повышения внеклеточной концентрации Ca^{2+} , так что большинство отрицательных зарядов оказываются экранированными с ионами Ca^{2+} , то значение E_m превышает таковое измеряемого потенциала E'_m . Уменьшение плотности зарядов на внутренней поверхности мембраны снижает величину E'_m . Именно E'_m управляет работой ионных каналов мембраны. По [3].

чина разности потенциалов зависит от плотности зарядов (количества на единицу площади мембраны); на количество зарядов влияют также ионная сила и рН.

На рис. 3.12, а показано, что трансмембранный потенциал, измеренный внутриклеточным микроэлектродом (E_m), равен потенциалу внешнего раствора (ψ_0 эталонный электрод) минус потенциал внутреннего раствора (ψ_1 , регистрирующий микроэлектрод): $E_m = \psi_0 - \psi_1$. Однако истинной трансмембранной разностью потенциалов (E'_m) является падение потенциала непосредственно в самой мембране, как показано на рисунке. Если поверхностные заряды с каждой стороны мембраны равны, то $E'_m = E_m$. Если заряд внешней поверхности полностью экранирован путем связывания дополнительных катионов, таких как ионы Ca^{2+} , то мембрана слегка гиперполяризуется ($E'_m > E_m$), хотя это и нельзя измерить с помощью внутриклеточного микроэлектрода (рис. 3.12, б). И наоборот, если заряд на внешней поверхности мембраны восстановлен или если нейтрализован заряд на внутренней поверхности мембраны, то мембрана слегка деполаризуется ($E'_m < E_m$), что также невозможно заметить с помощью микроэлектрода.

В результате того, что все виды ионных каналов мембраны управляются разностью потенциалов внутри самой мембраны (т. е. E'_m , а не E_m), изменения поверхностных зарядов (например, при воздействии веществ, изменении ионной силы или pH) могут вызвать кажущееся изменение порогового потенциала и сдвиг зависимости I_{∞} от E_m . Например, известно, что повышение $[Ca^{2+}]_o$ приводит к увеличению порогового потенциала (т. е. критического уровня деполяризации, необходимого для достижения электрического порога), чего и следует ожидать, учитывая происходящее при этом небольшое увеличение E'_m . Аналогичный механизм может также изменять кажущийся порог активации механической активности (величины E_m , при которой начинается сокращение мышцы).

З а к л ю ч е н и е

В рассмотренной главе были обсуждены основные факторы, определяющие потенциал покоя сердечных клеток или влияющие на него. Кратко рассмотрены структура и химический состав точной мембраны и их связь с сопротивлением и емкостью мембраны. Описаны также механизмы, регулирующие внутриклеточные концентрации ионов в миокардиальных клетках в установившихся условиях. К таким механизмам относятся Na^+/K^+ -насос, реакция $Na^+—Ca^{2+}$ -обмена, сарколеммальный Ca^{2+} -насос и внутриклеточные поливалентные макроэлектролиты. В качестве Na^+/K^+ -насоса выступает мембраносвязанный фермент— (Na^+, K^+) -АТФаза. Для работы этого фермента требуются как ионы Na^+ , так и ионы K^+ ; при гидролизе одной молекулы АТФ транспортируется 3 иона Na^+ и обычно два иона K^+ . Сердечные гликозиды являются специфическими блокаторами этой транспортной АТФазы. Na^+/K^+ -насос не имеет непосредственной связи с возбудимостью, но влияет на нее косвенно, поддерживая градиенты концентраций ионов Na^+ и K^+ (т. е. блокирование этого насоса не приводит к немедленной деполяризации или исчезновению потенциалов действия и сокращения). Реакция $Na^+—Ca^{2+}$ -обмена, по-видимому, опосредована переносчиком и получает энергию из электрохимического градиента ионов Na^+ ; т. е. энергия для выведения ионов Ca^{2+} из клеток запасается при работе (Na^+, K^+) -АТФазы. В процессе $Na^+—Ca^{2+}$ -обмена происходит перенос одного внутриклеточного иона Ca^{2+} в обмен на два, три или четыре внеклеточных иона Na^+ .

Был обсужден также механизм возникновения диффузионных потенциалов при неравном распределении ионов относительно мембраны, а также факторы, определяющие величину и полярность равновесного потенциала для каждого вида ионов. Суммарная электродвижущая сила для любого вида ионов определяется его равновесным потенциалом и трансмембранной разностью потенциалов; произведение этой движущей силы на проводимость мембраны для данного вида ионов определяет суммарный ионный ток, или поток этих ионов. Результирующее движение ионов

сквозь мембрану может быть направлено внутрь или наружу в зависимости от направления электрохимического градиента.

Ключевым фактором, определяющим величину потенциала покоя без учета потенциала, создаваемого электрогенным насосом, и при фиксированном распределении ионов, является относительная проницаемость мембраны для различных ионов, в частности, ионов K^+ и Na^+ , т. е. отношение P_{Na}/P_K (или g_{Na}/g_K), что следует из уравнения постоянного поля Гольдмана. Основными физиологическими ионами, влияющими на потенциал покоя или на потенциал действия, являются K^+ , Na^+ , Ca^{2+} и Cl^- . Непосредственное воздействие электрохимического градиента ионов Ca^{2+} на потенциал покоя незначительно, однако внеклеточная концентрация ионов Ca^{2+} может влиять на проницаемость (или проводимость) мембраны для других ионов, таких как Na^+ и K^+ . (Увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} в некоторых случаях может приводить к увеличению проницаемости мембраны для ионов K^+ путем активации независимых от потенциала K^+ -селективных каналов, управляемых ионами Ca^{2+}). Ионы Cl^- распределены пассивно относительно мембраны в соответствии с мембранным потенциалом, т. е. они активно не транспортируются. Однако имеются некоторые данные, указывающие на то, что $[Cl^-]_i$ реально в 2 или 3 раза превышает величину, рассчитанную на основе E_m , так что величина E_{Cl} оказывается находящейся в диапазоне от -35 до -50 мВ, что существенно отличается от потенциала покоя, составляющего -80 мВ. Однако прежде чем сделать вывод о существовании Cl^- -насоса, заканчивающего ионы Cl^- внутрь клетки, следует доказать, что рассчитанная величина E_{Cl} (с учетом активности ионов, а не их концентрации) значительно более положительна, чем средний потенциал покоя в клетке, усредненный за большой период времени: т. е., например, следует учесть спонтанные потенциалы действия. Если ионы Cl^- распределены пассивно, то они не могут влиять на потенциал покоя. Однако кратковременное перемещение таких ионов через мембрану, например во время потенциала действия, способно и должно влиять на E_m , особенно если проводимость g_{Cl} высока.

В соответствии с уравнением Нернста превышение $[K^+]_o$ нормы, составляющей 4 мМ, уменьшает равновесный потенциал для ионов K^+ (E_K) ($[K^+]_i$ приблизительно постоянна) и вызывает деполяризацию. Однако в некоторых случаях повышение $[K^+]_o$ до 5—10 мМ может вызвать гиперполяризацию. Снижение $[K^+]_o$ до 1,0—0,1 мМ обычно приводит к сильной деполяризации. Эти эффекты обычно объясняют тем, что: а — g_K является функцией P_K и $[K^+]_o$; б — P_K уменьшается при понижении $[K^+]_o$ и увеличивается при повышении $[K^+]_o$; в — при низкой величине $[K^+]_o$ происходит угнетение работы электрогенного Na^+/K^+ -насоса.

Потенциал покоя является не только источником потенциальной энергии для генерации и распространения потенциалов действия; от уровня потенциала покоя существенно зависит скорость нарастания потенциала действия, а значит, и скорость распространения возбуждения, так как мембранные потенциалозависи-

мые катионные каналы инактивируются при длительной деполяризации. Например, небольшое повышение концентрации ионов K^+ в крови приводит к существенному нарушению функции сердца.

Степень электрогенности Na^+/K^+ -насоса зависит от коэффициента сопряжения, равного отношению количества ионов Na^+ , выводимых насосом наружу, к количеству ионов K^+ , закачиваемых внутрь, а также от сопротивления мембраны. Потенциал, создаваемый электрогенным насосом, по-видимому, подключен параллельно суммарному ионному диффузионному потенциалу ($E_{дифф}$, определяемому равновесными потенциалами ионов всех видов и их относительными проницаемостями). Вклад потенциала, создаваемого электрогенным насосом, в потенциал покоя, регистрируемый в миокардиальных клетках, обычно очень невелик (всего несколько милливольт), так что деполяризация мембраны вскоре после полной блокады Na^+/K^+ -насоса сердечными гликозидами составляет лишь несколько милливольт. Конечно, при длительной остановке насоса деполяризация все более возрастает, так как исчезают ионные градиенты. Скорость работы Na^+/K^+ -насоса и, следовательно, величина вклада потенциала электрогенного насоса в E_m контролируется $[Na^+]_i$ и $[K^+]_o$, а также другими факторами. Потенциал электрогенного насоса в определенных условиях, когда клетки имеют тенденцию к деполяризации, например при ишемии или гипоксии, может иметь важное физиологическое значение для сердца. В таких случаях постоянный потенциал, создаваемый при работе насоса и подключенный параллельно E_m , будет препятствовать деполяризации клетки. Потенциал электрогенного насоса может также влиять на автоматизм узловых клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jain M. K. The bimolecular lipid membrane: a system. New York: Van Nostrand, 1972.
2. Henn F. A., Sperelakis N. Stimulative and protective action of St^{2+} and Ba^{2+} on (Na^+, K^+) -ATPase from cultured heart cells. — Biochem. Biophys. Acta, 1968, vol. 163, p. 415—417.
3. Sperelakis N. Handbook of physiology/Ed. R. M. Berne, N. Sperelakis. The cardiovascular system. Bethesda: American Physiological Society, 1979, vol. 1, p. 187—267.
4. Dhalla N. S., Ziegelhoffer A., Hazzow J. A. Regulatory role of membrane systems in heart function. — Canad. J. Physiol. Pharmacol., 1977, vol. 55, p. 1211—1234.
5. Jones L. R., Maddock S. W., Besch H. R. Jr. Unmasking effect of alamethicin on the (Na^+, K^+) -ATPase, beta-adrenergic receptor-coupled cyclase, and cAMP-dependent protein kinase activities of cardiac sarcolemmal vesicles. — J. Biol. Chem., 1980, vol. 255, p. 9971—9980.
6. Daniel E. E., Kwan C. V., Matlib M. A. et al. Characterization and Ca^{2+} -accumulation by membrane fractions from myometrium and artery. — In: Excitation-contraction coupling in smooth muscle/Ed. R. Casteels, T. Godfraind, J. C. Ruegg. Amsterdam: Elsevier/North-Holland, 1977, p. 181—188.
7. Glitsch H. G. Activation of the electrogenic sodium pump in guinea-pig auricles by internal sodium ions. — J. Physiol. (Lond.), 1972, vol. 220, p. 565—582.

8. Page E., Storm S. R. Cat heart muscle in vitro. VIII. Active transport of sodium in papillary muscles. — *J. gen. Physiol.*, 1965, vol. 48, p. 957—972.
9. McDonald T. F., McLeod D. P. Maintenance of resting potential in anoxic guinea pig ventricular muscle: electrogenic sodium pumping. — *Science*, 1971, vol. 172, p. 570—572.
10. Noma A., Irisawa H. Electrogenic sodium pump in rabbit sinoatrial node cell. — *Pflugers Arch.*, 1974, vol. 351, p. 177—182.
11. Vassalle M. Electrogenic suppression of automaticity in sheep and dog Purkinje fibers. — *Circulat. Res.*, 1970, vol. 27, p. 361—377.
12. Pelleg A., Vogel S., Belardinelli L., Sperelakis N. Overdrive suppression of automaticity in cultured chick myocardial cells. — *Amer. J. Physiol.*, 1980, vol. 238, p. H24—H30.
13. Sperelakis N., Schneider M., Harris E. J. Decreased K^+ conductance produced by Ba^{++} in frog sartorium fibers. — *J. gen. Physiol.*, 1967, vol. 50, p. 1565—1583.
14. Cole K. S. Membranes, ions and impulses: a chapter of classical biophysics. Berkeley: University of California, 1968.
15. Trautwein W., Kassebaum D. G. On the mechanism of spontaneous impulse generation in the pacemaker of the heart. — *J. gen. Physiol.*, 1961, vol. 45, p. 317—330.
16. Sperelakis N., Lehmkühl D. Effect of current on transmembrane potentials in cultured chick heart cells. — *J. gen. Physiol.*, 1964, vol. 47, p. 895—927.
17. Sperelakis N., Lehmkühl D. Effects of temperature and metabolic poisons on membrane potentials of cultured heart cells. — *Amer. J. Physiol.*, 1967, vol. 213, p. 719—724.
18. Sperelakis N. Electrophysiology of cultured chick heart cells. — In: *Electrophysiology and ultrastructure of the heart*/Ed. T. Sano, V. Mizuhira.
19. Sperelakis N. (Na^+ , K^+)-ATPase activity of embryonic chick heart and skeletal muscles as a function of age. — *Biochim. biophys. Acta*, 1972, vol. 266, p. 230—237.
20. Ferrier G. R., Moe G. K. Effects of calcium on acetylstrophanthidin-induced transient depolarizations in canine Purkinje tissue. — *Circulat. Res.*, 1973, vol. 33, p. 508—515.
21. Kass R. S., Tsieng R. S., Weingart R. Ionic basis of transient inward current induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibres. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1978, vol. 281, p. 209—226.
22. Sperelakis N., Lehmkühl D. Ionic interconversion of pacemaker and non-pacemaker cultured chick heart cells. — *J. gen. Physiol.*, 1966, vol. 49, p. 867—895.
23. Hermsmeyer K., Sperelakis N. Decrease in K^+ conductance and depolarization of frog cardiac muscle produced by Ba^{++} . — *Amer. J. Physiol.*, 1970, vol. 219, p. 1108—1114.
24. Katzung B. G. Effects of extracellular calcium and sodium on depolarization-induced automaticity in guinea papillary muscle. — *Circulat. Res.*, 1975, vol. 37, p. 118—127.
25. Imanishi S., Surawicz B. Automatic activity in depolarized guinea pig ventricular myocardium. — *Circulat. Res.*, 1976, vol. 39, p. 751—759.
26. Reuter H., Scholz H. The regulation of the calcium conductance of cardiac muscle by adrenaline. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1977, vol. 264, p. 49—62.
27. Vassalle M. Cardiac pacemaker potentials at different extra- and intracellular K concentrations. — *Amer. J. Physiol.*, 1965, vol. 208, p. 770—775.
28. Noble D. Initiation of the heartbeat. Oxford: Clarendon, 1975.
29. Irisawa H. Comparative physiology of the cardiac pacemaker mechanism. — *Physiol. Rev.*, vol. 58, p. 461—498.
30. Carmeliet E., Vereecke J. Electrogenesis of the action potentials and automaticity. — In: *Handbook of physiology*/Ed. R. M. Berne, N. Sperelakis. Bethesda: American Physiological Society, 1979, p. 269—334.
31. Vassalle M. Electrogenic suppression of automaticity in sheep and dog Purkinje fibers. — *Circulat. Res.*, 1970, vol. 27, p. 361—377.
32. Josephson I., Sperelakis N. On the ionic mechanism underlying adrener

- gic-cholinergic antagonism in ventricular muscle. — *J. gen. Physiol.*, 1982, vol. 79, p. 69—86.
33. *New W., Trautwein W.* Inward membrane currents in mammalian myocardium. — *Pflügers Arch.*, 1972, vol. 334, p. 1—23.
 34. *McDonald T. F., Trautwein W.* Membrane currents in cat myocardium: separation of inward and outward components. — *J. Physiol.*, 1978, vol. 274, p. 193—216.
 35. *McDonald T. F., MacLeod D. P.* Metabolism and the electrical activity of anoxic ventricular muscle. — *J. Physiol.*, 1973, vol. 229, p. 559—582.
 36. *Schneider J. A., Sperelakis N.* The demonstration of energy dependence of isoproterenol-induced transcellular Ca^{2+} current in isolated perfused guinea pig hearts—an explanation for mechanical failure of ischemic myocardium. — *J. surg. Res.*, 1974, vol. 16, p. 389—403.
 37. *Sperelakis N., Schneider J. A.* A metabolic control mechanism for calcium ion influxes that may protect the ventricular myocardial cell. — *Amer. J. Cardiol.*, 1976, vol. 37, p. 1079—1085.
 38. *Vluegels A., Carmeliet E., Bosteels S., Zaman M.* Differential effects of hypoxia with age on the chick embryonic heart. — *Pflügers Arch.*, 1976, vol. 365, p. 159—166.
 39. *Meech R. W.* Intracellular calcium injection causes increased potassium conductance in *Aplysia* nerve cells. — *Comp. Biochem. Physiol.*, 1972, vol. 42A, p. 493—499.
 40. *Iseberg G.* Is potassium conductance of cardiac Purkinje fibres controlled by $[Ca^{2+}]_i$?—*Nature (Lond.)*, 1975, vol. 253, p. 273—274.
 41. *Bassingwaighe J. B., Fry C. H., McGuigan J. A. S.* Relationship between internal calcium and outward current in mammalian ventricular muscle: a mechanism for the control of the action potential duration?—*J. Physiol.*, 1976, vol. 262, p. 15—37.
 42. *Singer S. J., Nicolson G. L.* The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. — *Science*, 1972, vol. 175, p. 720—731.
 43. *Sperelakis N.* Changes in membrane electrical properties during development of the heart. — In: *The slow inward current and cardiac arrhythmias*/Ed. D. P. Zipes, Bailey J. C., V. Elharrar. The Hague: Martinus Nijhoff, 1980, p. 221—262.

Глава 4

ИОННЫЕ ОСНОВЫ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СЕРДЦА

P. C. KASS (R. S. KASS)

ВВЕДЕНИЕ

Ткани сердечной мышцы, как ткани скелетных мышц и нервной системы, относятся к так называемым возбудимым. Такая классификация отражает способность клеток возбудимых тканей генерировать и передавать импульсы возбуждения регенеративным способом. Электрическая активность разных областей нервной системы или скелетной мускулатуры обладает практически одними и теми же свойствами и определяется сходными ионными механизмами. В противоположность этому различные области сердца характеризуются совершенно разными по форме потенциалами действия. Такое разнообразие форм потенциала действия отражает тот факт, что в тканях сердца электрическая активность выполняет сразу несколько функций. Однако, несмотря на региональные отличия, генерация электрических импульсов в сердце определяется в общем такими же механизмами проницаемости мембраны, как и в других возбудимых тканях.

В этой главе дан обзор основных ионных токов в сердце и показана связь этих токов как с электрической активностью различных областей сердца, так и со специальными функциями, выполняемыми этой активностью. Особое внимание уделено зависимым от времени токам, изученным на кардиомиоцитах различных млекопитающих. У нас не было намерения представить исчерпывающий обзор по каждому из этих токов. В этой главе даны только основы, помогающие читателю в дальнейшем изучении этого вопроса.

ВОЗБУЖДЕНИЕ СЕРДЦА

Нормальное распространение возбуждения: роль специализированных тканей

Электрические импульсы в возбудимых клетках возникают вследствие локальных изменений относительных проницаемостей мембраны для различных ионов (см. главу 3). В свою очередь такие изменения проницаемости влияют на трансмембранную разность потенциалов посредством изменения электрохимических потенциалов для соответствующих ионов. Как результат этих локальных изменений мембранного потенциала возникают гради-

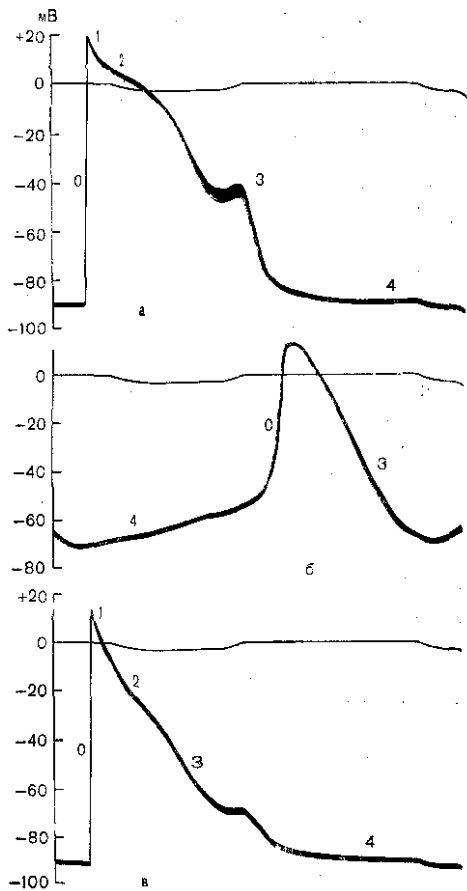
Рис. 4.1. Типичные формы трансмембранных потенциалов действия в рабочем миокарде желудочков (а), синоатриальном узле (б) и в миокарде предсердий (в); 0—4 — фазы потенциала действия. По [4].

енты потенциала через клеточную мембрану и вдоль поверхности клетки между возбужденным участком мембраны и его окружением. Эти градиенты приводят в движение ионы по обе стороны мембраны, т. е. возникают ионные токи. Упорядоченный процесс возбуждения и сокращения сердца определяется свойствами этих токов, а также кабельными свойствами (см. главу 6) и строением различных областей сердца. Он определяется уникальными электрофизиологическими характеристиками рассматриваемой области сердца, выполняющей, возможно, некоторую специализированную функцию.

Электрическая активность в сердце начинается с возбуждения синоатриального (СА) узла, представляющего собой полосу тонких мышечных волокон вблизи места впадения верхней полой вены в правое предсердие. СА-узел генерирует электрическую активность циклически, спонтанно деполяризуясь и гиперполяризуясь. Способность ткани к спонтанной деполяризации называется пейсмекерной активностью. СА-узел является не единственным участком сердца, обладающим этой способностью (рис. 4.2), однако он возбуждается с наивысшей частотой и поэтому является доминирующим пейсмекером в сердце при нормальных условиях.

При некоторых патологических состояниях возбуждение из СА-узла не способно распространяться на другие области сердца, а сердечный ритм при этом определяется другой пейсмекерной областью, возбуждающей сердце со значительно более редкой частотой.

В нормальных условиях возбуждение быстро распространяется из СА-узла по миокарду предсердий, проведение по которым



ускоряется благодаря специализированной проводящей системе, аналогичной клеткам волокон Пуркинье желудочков [1]. Электрическая активность предсердий передается в желудочки через атриовентрикулярный (АВ) узел, небольшую полоску тонких волокон, соединяющую предсердную ткань с желудочковой. Небольшая толщина волокон АВ-узла и особенности его электрофизиологических свойств обеспечивают очень медленное распространение возбуждения через этот узел (обычно около 0,2 м/с), что создает необходимую задержку между сокращением предсердий и желудочков. Такая задержка имеет существенное значение для полноценного наполнения желудочков и осуществления ими насосной функции.

Из АВ-узла возбуждение распространяется по специализированной проводящей системе — клеткам волокон Пуркинье. В отличие от АВ-узла волокна Пуркинье состоят из крупных клеток (проводящих сердечных миоцитов), что обеспечивает наилучшие условия для быстрой передачи возбуждения. Скорость проведения в проводящих сердечных миоцитах достигает 5 м/с (более чем в 10 раз превышает скорость проведения в АВ-узле), что обеспечивает одновременное быстрое возбуждение всей массы желудочков. Такое быстрое распространение возбуждения приводит к практически синхронному сокращению миоцитов желудочков и развитию однородного по всему их объему напряжения, выталкивающего кровь из полостей сердца. Когда проведение по сердечным проводящим миоцитам замедляется при заболевании, выброс крови из желудочков снижается в результате потери синхронизации сокращения отдельных кардиомиоцитов (см. главы 19—21) [2, 3].

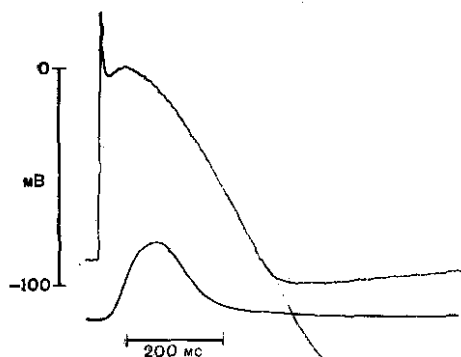
Потенциал действия сердца

Как уже было сказано в предыдущем разделе, различная функциональная роль электрической активности в разных областях сердца хорошо коррелирует с различиями в форме потенциалов действия, регистрируемых в этих областях.

Узловая ткань

Пример электрической активности, зарегистрированной в препарате СА-узла, показан на рис. 4.1. Длительность такого потенциала действия, как и таких же потенциалов в других областях сердца, очень велика (порядка 100 мс и более). В СА-узле выявляется спонтанная активность. Мембранный потенциал изменяется от некоторого отрицательного значения (около -65 мВ) до более 0 мВ, а затем снова становится отрицательным (реполяризуется), и цикл повторяется. Поскольку СА-узел определяет частоту сердечного ритма, медленное изменение потенциала в положительную сторону (деполяризация) в период между циклами сокращения называется пейсмекерной деполяризацией. Наибольшее отрицательное значение потенциала, достигаемое в СА-узле, составляет около -65 мВ, что значительно меньше по абсолют-

рис. 4.2. Потенциал действия и одиночный цикл сокращения в изолированном волокне Пуркинье. Вверху — трансмембранный потенциал действия в изолированном волокне Пуркинье при искусственной стимуляции, зарегистрированный с помощью внутриклеточного микроэлектрода. Обратите внимание на то, что после окончания действия потенциала происходит медленное нарастание диастолической деполяризации, определяющей пейсмерную активность. Внизу — физическое сокращение волокна, вызванное этим потенциалом действия. Сокращения регистрировали с помощью оптического метода (R. S. Krass, D. Kraife, неопубликованные данные).



ной величине, чем потенциал покоя в нерве или скелетной мышце. Однако было бы не совсем правильно называть этот потенциал потенциалом покоя, так как СА-узел является спонтанно активным. Для описания этой части потенциала действия СА-узла применяют термин «максимальный диастолический потенциал» (МДП). Другой характеристикой потенциала действия является максимальная скорость деполяризации, представляющая собой меру величины тока, приводящего к генерации потенциала действия (см. уравнение 4), и составляет в СА-узле около 10 В/с.

Электрическая активность клеток АВ-узла очень похожа на активность клеток СА-узла, но пейсмерная активность в АВ-узле менее выражена [4]. Подобно активности волокон СА-узла, максимальная скорость деполяризации составляет около 10 В/с, а МДП — около -60 мВ.

Волокна Пуркинье

Клетки в пучках волокон Пуркинье в большинстве случаев также обладают пейсмерной активностью (см. рис. 4.2), однако она развивается значительно медленнее, чем в СА-узле, МДП проводящих кардиомиоцитов значительно более отрицательна (-90 мВ), а максимальная скорость деполяризации значительно больше (500 В/с) по сравнению с соответствующими параметрами узловой ткани. Так как изменения максимальной скорости деполяризации зависят от МДП, можно предположить, что существуют два различных механизма генерации потенциалов действия в тканях этих двух типов.

Для показанного на рис. 4.2 потенциала действия характерно, что вслед за его быстрым нарастанием трансмембранный потенциал почти так же быстро уменьшается приблизительно до 0 мВ. Эта фаза быстрой реполяризации наиболее выражена в проводящих кардиомиоцитах (см. раздел «Токи, активируемые ионами кальция»).

После окончания фазы быстрой реполяризации потенциал на мембране начинает уменьшаться значительно медленнее, и мембрана постепенно реполяризуется от 0 до -20 мВ. Такая фаза потенциала действия называется фазой плато. Она поддерживается за счет баланса больших по величине ионных токов, который легко нарушается при различных условиях, например при изменении частоты сердечного ритма или температуры.

Миокард предсердий и желудочков

Как и в проводящих сердечных миоцитах, наибольший по абсолютной величине отрицательный потенциал клеток миокарда предсердий и желудочков равен приблизительно -90 мВ, однако в нормальных условиях в них не проявляется пейсмекерная активность (см. рис. 4.1). Поэтому при описании такого потенциала вполне допустимо употребление термина «потенциал покоя». Ни в предсердных кардиомиоцитах, ни в кардиомиоцитах желудочков не наблюдается фазы быстрой реполяризации, следующей за начальной деполяризацией, однако фаза плато отмечается в обоих типах клеток, хотя и имеет различную форму. Максимальная скорость нарастания потенциала действия во время фазы быстрой деполяризации близка к наблюдаемой в волокнах Пуркинье ($100-300$ В/с).

Развитие потенциала действия в сердечной мышце является результатом сложного взаимодействия нескольких ионных токов. Различия электрической активности разных участков миокарда обычно возникают в результате разных вкладов определяющих ее ионных токов. В следующем разделе будут рассмотрены способы измерения ионных токов и выявления некоторых наиболее существенных токов, определяющих электрическую активность различных анатомических областей.

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ: ЭКВИВАЛЕНТНЫЕ ЦЕПИ

Математическое описание распространения импульса возбуждения, предложенное на основании измерений локальных токов в нервном волокне [5], осуществляется с помощью практически тех же уравнений, которые впервые были разработаны Кельвином для описания передачи электрических сигналов по подводному телеграфному кабелю, и поэтому называется «кабельной теорией». Кабельная теория не только описывает распространение импульса возбуждения, но и дает основу для разработки методов измерений мембранных токов в возбудимых тканях. Кабельные свойства сердечной ткани более полно описаны в главе 6, однако некоторые из них будут кратко обсуждены в данной главе в связи с измерением ионных токов.

Одним из первых и наиболее простых способов биофизической интерпретации проницаемости клеточных мембран является ли-

нейная (омическая) эквивалентная цепь. Такая цепь соответствует модели сосредоточенных электрических параметров локальных участков мембраны. Она состоит из емкости мембраны (C_M) и полной проводимости, т. е. пути трансмембранного движения ионов, для которых клеточная мембрана проницаема. И хотя такая модель не позволяет описать реальный процесс движения ионов сквозь мембрану [6], она крайне полезна при изучении как кабельных свойств, так и электрических реакций возбудимых клеток.

Емкость мембраны, наличие которой объясняется самой структурой мембраны [2], практически постоянна для большинства биологических мембран (1 мкФ/см^2). Для изменения напряжения на этой емкости необходимо добавить электрический заряд с одной стороны мембраны и удалить его с другой, как и в случае любых других проводящих поверхностей, образующих конденсатор. Такое движение зарядов называется током смещения, или емкостным током. Он связан со скоростью изменения потенциала на емкости мембраны следующим соотношением:

$$I_c = C_M \cdot dV_M/dt. \quad (4.1)$$

В соответствии с этим выражением мембранный потенциал (V_M) не изменяется, если не изменяется заряд на мембранной емкости. Оно также показывает, что во время емкостного тока скорость изменения потенциала пропорциональна величине тока, протекающего между окружающей средой и проводящими поверхностями конденсатора.

Участок мембраны называется активным, если в нем возможно внезапное увеличение проницаемости для одного или нескольких видов ионов. При этом положительно заряженные ионы движутся по направлению соответствующих им электрохимических градиентов через открытые каналы. Такой входящий ток увеличивает положительный заряд на внутренней поверхности мембраны, вызывая локальную деполяризацию. Одновременно устанавливается разность потенциалов вдоль поверхности волокна между этим деполяризованным участком и другими участками, все еще находящимися в состоянии покоя. Эта разность потенциалов приводит в движение ионы (в основном ионы K^+), которые перемещаются от активного участка к пассивным, давая начало локальным токам, распространяющим деполяризацию вдоль поверхности клетки.

В каждом фрагменте мембраны полный трансмембранный ток состоит из емкостного тока, изменяющего трансмембранную разность потенциалов, и ионного тока (I_i), проходящего по проводящим путям, шунтирующим мембранную емкость. Таким образом, полный ток в мембране равен сумме двух компонентов:

$$I_M = I_i + I_c \quad (4.2)$$

или, используя уравнение (1) для I_c ,

$$I_M = I_i + C_M dV_M/dt. \quad (4.3)$$

ИЗМЕРЕНИЕ ИОННОГО ТОКА

Для упрощения уравнения (3) и облегчения анализа мембранного тока можно использовать два различных экспериментальных подхода. В первом из них экспериментально устраняется разность потенциалов вдоль поверхности клетки, что позволяет исключить локальные токи. При использовании аксона кальмара это достигается путем короткого замыкания внутреннего пространства аксона с помощью низкоомного внутриклеточного электрода, расположенного вдоль оси волокна. Такой экспериментальный способ называется методом «пространственной фиксации», а электрическая активность, регистрируемая при помощи этого метода, — «мембранным потенциалом действия». В этом случае полный трансмембранный ток равен нулю и (3) упрощается и принимает вид:

$$C_m dV/dt = -I_i. \quad (4.4)$$

Многоклеточная структура сердечной ткани не позволяет использовать для препаратов миокарда такой экспериментальный подход, разработанный для нервного волокна, однако уравнение (4.4) можно применять для описания ионных токов в небольших изолированных миокардиальных препаратах. Такие препараты позволяют создать условия отсутствия продольных токов, а уравнение (4.4) будет пригодно для оценки суммарного ионного тока исходя из изменений мембранного потенциала во времени. Однако следует критически подходить к этому методу, так как при его использовании не учитываются частотно-зависимые изменения емкости мембраны [7, 8], а также нелинейные свойства ионных токов в миокарде [9].

Другое упрощение (4.3) может быть получено путем измерения мембранного потенциала и экспериментального управления им, пропуская ток от внешнего источника. Этот метод называется методом «фиксации потенциала». Так как потенциал поддерживается на постоянном уровне, то появляется возможность ликвидации емкостного тока (за исключением коротких его всплесков при изменении потенциала), а общий подаваемый в препарат ток (который и измеряется) будет представлять собой трансмембранный ионный ток I_i . В этом случае также требуется однородное распределение потенциала по всему объему препарата. Это условие легко выполняется в аксоне кальмара с ассиметрическим расположением электрода, но при использовании многоклеточного миокардиального препарата условие однородного распределения потенциала может быть выполнено лишь приблизительно. Однако некоторые осуществленные недавно усовершенствования метода фиксации потенциала повысили надежность измерения токов в сердце. К ним следует отнести учет ограниченного внеклеточного пространства в многоклеточном миокардиальном препарате [10] и использование для фиксации потенциала одиночных изолированных кардиомиоцитов [11].

ИОННЫЕ ОСНОВЫ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СЕРДЦА

Основные понятия

Прежде чем перейти к обсуждению ионных основ электрической активности сердца, полезно рассмотреть некоторые основные концепции, используемые при описании ионных токов. Из предыдущего раздела (см. уравнение 4) ясно, что в экспериментальных условиях, устраняющих распространение потенциала (пространственная фиксация), скорость изменения мембранного потенциала определяется величиной и направлением суммарного ионного тока, протекающего через мембрану. Условно принято, что отрицательный ток представляет собой направленное внутрь движение положительного заряда. Он деполяризует мембрану и вызывает положительное изменение dV_m/dt . Полный ионный ток обычно является суммой нескольких ионных токов различной природы, и цель экспериментатора заключается в том, чтобы охарактеризовать каждый из этих компонентов. Любой ионный ток может быть описан произведением проводимости соответствующих каналов (G_i) и движущей силы ($V_m - V_i$):

$$I_i = G_i \cdot (V_m - V_i), \quad (4.5)$$

где V_i — равновесный потенциал для данного вида иона (см. главу 3); V_m — мембранный потенциал. В общем случае G_i может быть функцией мембранного потенциала и времени.

Ионы проникают сквозь мембрану по каналам, способным различать вид переносчиков заряда. Относительная проницаемость каналов для различных видов ионов, селективность канала отражается в равновесном потенциале. Равновесным потенциалом называется потенциал, при котором суммарный ток, проходящий через канал, равен нулю; этот потенциал является функцией градиентов концентраций ионов, для которых мембрана проницаема.

Два типа входящих токов в сердце

По максимальной скорости деполяризации потенциалы действия в сердце могут быть подразделены на две группы. Одну группу составляют потенциалы, характеризующиеся очень высокой скоростью нарастания (500 В/с, клетки предсердий и желудочков, проводящие сердечные миоциты), ко второй группе (клетки SA- и АВ-узлов) относятся потенциалы действия, нарастающие значительно медленнее (10 В/с). Если основываться на уравнении (4.4), то такая разница в скорости нарастания деполяризации позволяет предположить, что регенеративно нарастающий входящий ток в узловых клетках должен быть значительно меньше, чем в других типах сердечной ткани. Эти группы отличаются также по диапазонам потенциалов, при которых происходит развитие фазы быстрой деполяризации. Клетки узловой ткани активируются при зна-

чительно более положительных потенциалах, чем клетки других миокардиальных препаратов.

Эти важные результаты свидетельствуют о существовании двух типов входящих токов в кардиомиоцитах. Их можно различать как по диапазонам потенциалов, при которых они развиваются, так и по величине. Большое число экспериментальных данных в настоящее время подтверждает эту точку зрения и дает несколько критериев для дифференциации этих токов, обеспечивающих возбуждение клеток. Один из них, переносимый ионами Na^+ , напоминает регенеративный натриевый ток в нерве и скелетной мышце и ответствен за быструю деполяризацию и быстрое проведение потенциала действия по миокарду предсердий и желудочков, а также по специализированной проводящей системе. Второй ток, переносимый в основном ионами Ca^{2+} , обеспечивает генерацию потенциала действия в узловых клетках, определяет медленное проведение потенциала действия по АВ-узлу и поддерживает фазу плато потенциала действия в других тканях сердечной мышцы.

Натриевый ток

Быстрое нарастание потенциала действия в клетках рабочего миокарда и специализированной проводящей системы, подобно потенциалам действия в нерве и скелетной мышце, обусловлено кратковременным увеличением проницаемости мембраны для ионов Na^+ . Высокая скорость нарастания потенциалов действия в этих тканях свидетельствует (на основании уравнения 4.4), что ток, ответственный за эти изменения потенциала, имеет большую амплитуду (около 1 мА/см^2).

Еще до появления миокардиальных препаратов, в которых можно было бы методом фиксации потенциала исследовать большие по величине входящие токи [10—12], эксперименты по изучению скорости нарастания и овершута потенциала действия проводящих сердечных миоцитов показали, что эти параметры зависят от ионов Na^+ [13]. Позднее такой же подход был использован для изучения воротного механизма этого канала [14] и влияния на него ионов Ca^{2+} и некоторых местных анестетиков [15].

К настоящему времени с помощью метода фиксации потенциала удалось исследовать натриевые токи в различных миокардиальных препаратах [11, 12, 16—18]. Они оказались похожими на натриевые токи в нерве и скелетной мышце. Когда клеточная мембрана деполяризована выше -65 мВ , развивается входящий ток, нарастающий до некоторого максимума, а затем за несколько миллисекунд уменьшающийся и исчезающий (рис. 4.3, а). Как и в других возбудимых клетках, такой ток может быть описан как проходящий через каналы, управляемые активационными и инактивационными воротами, зависящими от времени и потенциала. В данный момент времени при заданном потенциале доля открытых натриевых каналов определяется произведением параметра активации и инактивации. Зависимость установившихся значений

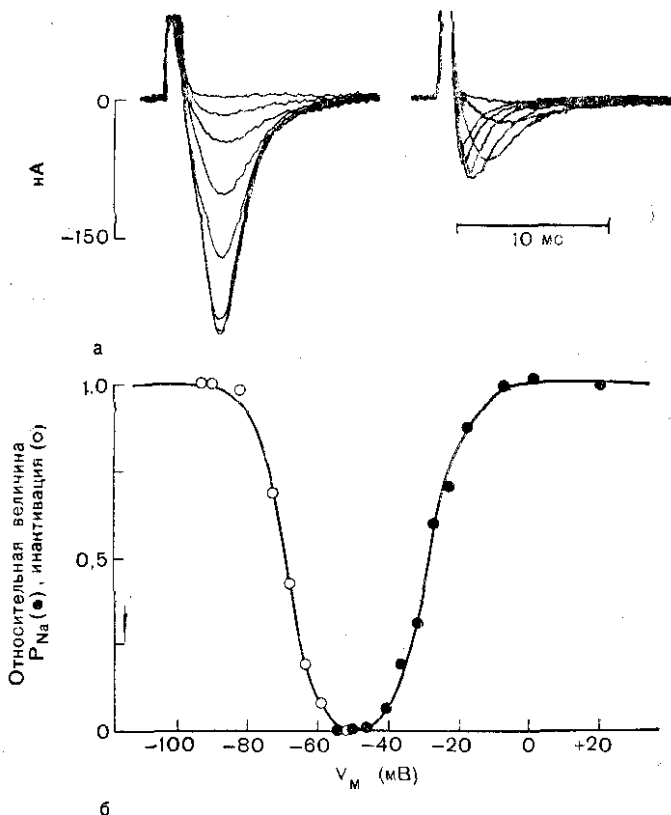


Рис. 4.3. Натриевый ток в волокне Пуркинье сердца кролика.

а — семейства суммарных ионных токов, полученные при стандартных протоколах для определения параметров инaktivации (слева) и активации (справа). Инaktivацию измеряли, подавая постоянную тестирующую ступеньку потенциала (-38 мВ) после кондиционирующего импульса длительностью 500 мс. Активацию рассчитывали, исходя из максимальной амплитуды входящего тока при различных тестирующих ступеньках потенциала. Поддерживаемый потенциал составляет -58 мВ; б — зависимость относительных параметров инaktivации (светлый кружок) и активации (черный кружок) от потенциала. По [6].

этих параметров от потенциала, полученная на проводящих сердечных миоцитах кролика, показана на рис. 4.3, б.

Так как это произведение равно нулю при всех потенциалах, показанных на рис. 4.3, б, то на основании этих кривых можно предположить, что в установившихся условиях натриевая проводимость должна быть также равна нулю. Эти данные получены при низкой температуре. Однако при температурах, близких к физиологическим, по-видимому, существует область потенциалов, в которой эти кривые перекрываются, что приводит к появлению «окна» установившегося натриевого тока в диапазоне потенциалов около плато потенциала действия [19—21]. Существование такого тока объясняет влияние тетродотоксина (ТТХ) и удаления ионов натрия из раствора на фазу плато потенциала действия миокарда [22, 23].

Мембранный потенциал воздействует на число натриевых каналов, находящихся в открытом состоянии, и таким образом определяет число натриевых каналов, принимающих участие в генерации потенциала действия. При потенциалах в диапазоне фазы плато (см. рис. 4.3, 6) большая часть этих каналов закрыта (инактивирована). При диастолическом потенциале происходит реактивация натриевых каналов, которые переходят из инактивированного состояния в состояние покоя. Развитие этого процесса во времени определяет количество этих каналов, которые могут в данный момент принимать участие в проведении потенциала действия, а следовательно, и период, в течение которого клетки остаются невозбудимыми (рефрактерный период). Таким образом, натриевые каналы клеток сердечной ткани аналогичны натриевым каналам в других возбудимых клетках по своей зависимости от потенциала и чувствительности к местным анестетикам. Однако некоторые результаты, такие как явно более низкая чувствительность к ТТХ, а также зависимость блокирования каналов при действии ТТХ от потенциала [24], позволяют предположить, что натриевые каналы клеток сердечной ткани могут существенно отличаться от натриевых каналов клеток других тканей. Этот вопрос является одним из наиболее важных, изучаемых в настоящее время при исследовании натриевых токов в сердце методов фиксации потенциала.

Кальциевый ток

Эксперименты с регистрацией потенциала действия. Экспериментальные методы позволяют так изменить потенциал действия проводящего сердечного миоцита или клетки рабочего миокарда, что он будет напоминать потенциал действия SA- или АВ-узлов. Это достигается в самых разнообразных экспериментальных условиях, приводящих к деполяризации клетки. Потенциал действия проводящего сердечного миоцита будет в таком случае иметь очень небольшую скорость нарастания (около 10 В/с) и распространяться медленно (0,1—0,01 м/с). Поэтому такой потенциал называется медленным ответом [3, 25]. Характеристики медленного ответа рассмотрены в главе 8.

Ток, обеспечивающий генерацию медленного ответа, в настоящее время называют «медленным входящим током» (I_{si}). Он в основном переносится ионами Ca^{2+} , и его величина в 100 раз меньше максимального значения натриевого тока. Кроме того, что этот ток ответствен за возникновение медленного ответа, он определяет распространение возбуждения в узловой ткани [26, 27] и имеет важное значение для поддержания фазы плато потенциала действия в миокарде и в специализированной проводящей системе [28, 29].

Исследования I_{si} методом фиксации потенциала

При изучении электрических свойств волокон Пуркинье [30, 31] и других препаратов [32—34] было продемонстрировано существование входящего тока, величина которого зависит от концент-

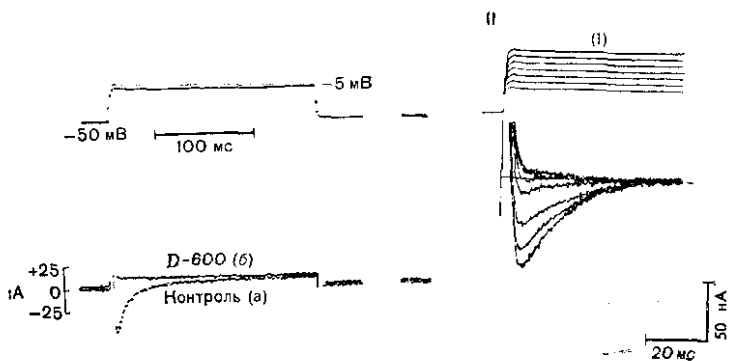


Рис. 4.4. Кальциевый ток в миокардиальных клетках двух типов.

I — трансмембранный ток в волокне Пуркинье сердца теленка, измеренный в ответ на ступеньку потенциала длительностью 250 мс до (а) и после добавления блокатора кальциевого тока D-600 (б). Быстрый короткий всплеск входящего тока, направленного вниз, представляет собой кальциевый ток (I_{Ca}) в контроле. Он полностью блокируется D-600 (по R. S. Kass, неопубликованные данные); II — кальциевый ток, зарегистрированный в СА-узле сердца кролика. Показанные записи тока получены в ответ на ступеньки потенциала от уровня поддерживаемого потенциала до разных уровней в диапазоне от 0 до +60 мВ с шагом 10 мВ. По [78].

рации ионов Ca^{2+} (I_{Ca}). Многие свойства такого тока были предположены на основе экспериментов по изучению медленного ответа: он увеличивается под действием катехоламинов и блокируется Mg^{2+} и другими катионами металлов, и его зависимость от потенциала явно отличается от аналогичной зависимости для I_{Na} .

В intactных препаратах I_{Ca} был исследован Reuter, Trautwein и др. [35]. Позднее этот ток был зарегистрирован в одиночных изолированных кардиомиоцитах [36—39] и в участках изолированной мембраны, выделенных из миокардиальных клеток в культуре [40]. Аналогично натриевому току его можно описать как ток, текущий через канал, управляемый воротами:

$$I_{Ca} = \bar{G}_{Ca} \cdot d \cdot f \cdot (V_m - V_{Ca}),$$

где \bar{G}_{Ca} — полная проводимость, когда все кальциевые каналы открыты; d — параметр активации; f — параметр инактивации; V_{Ca} — равновесный потенциал. Зависимость этих воротных параметров от потенциала и их кинетика отличаются от свойств параметров натриевого канала, что и объясняет наблюдаемые характеристики кальциевых потенциалов действия. В результате изучения медленного ответа было предложено, что диапазон потенциалов, при котором происходит инактивация I_{Ca} , настолько отличается от диапазона инактивации I_{Na} , что можно активировать кальциевый ток при таких поддерживаемых потенциалах, при которых натриевый ток практически полностью инактивирован.

Примеры записей кальциевого тока на волокнах Пуркинье теленка и в препаратах СА-узла кролика показаны на рис. 4.4. Сравнение этих записей показывает, что кальциевый ток почти одина-

ков в клетках обоих типов, что, по-видимому, справедливо для всех миокардиальных препаратов, в которых проводили измерение этого тока [41, 42].

Reuter, Scholz [43] обнаружили, что каналы, ответственные за I_{si} , не являются исключительно селективными для ионов Ca^{2+} . Оказалось, что через эти каналы также могут проходить ионы Na^+ и K^+ , но их проницаемость приблизительно в 100 раз меньше, чем для Ca^{2+} . Lee, Tsien [39] подтвердили, что ионы K^+ также проходят через кальциевый канал в изолированных клетках желудочка сердца крысы. Таким образом, по своим свойствам медленные ионные каналы в миокарде оказались аналогичными таковым в других возбудимых клетках [41, 42].

Фармакология и чувствительность к нейромедиаторам. Кальциевые каналы не блокируются тетродотоксином, а угнетаются соединениями совершенно другой группы. К ней относятся катионы металлов La^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} , а также несколько органических веществ, таких как Д-600, верапамил, нифедипин, низолдипин и дилтиазем. И хотя все эти агенты блокируют ток, текущий через кальциевые каналы (см. рис. 4.4), в экспериментальных исследованиях только в настоящее время начинают выявляться различия в их специфичности и способах действия [39, 44, 45].

Кальциевый ток в миокарде изменяется под влиянием нейромедиаторов. Он уменьшается под действием мускариновых соединений [46, 47] и увеличивается под влиянием катехоламинов [48]. Reuter, Scholz [49] предположили, что основное действие адреналина на I_{si} заключается в увеличении максимальной проводимости (G_{si}) каналов этого типа. Это может быть следствием либо усиления максимальной проводимости каждого кальциевого канала, либо возникновения новых каналов, каждый из которых обладает постоянной проводимостью, характерной для одного канала. Цитируемые авторы предположили, что справедливо первое предположение, но его еще предстоит подтвердить в исследованиях, в которых будет возможно прямое измерение проводимости одного канала [40].

Выходящие токи: реполяризация потенциала действия

Задержанное выпрямление. Фаза плато потенциала действия проводящего сердечного миоцита (а также клеток рабочего миокарда желудочков) поддерживается благодаря тонкому балансу между небольшими по величине входящими и выходящими токами. Во время фазы плато мембранный потенциал изменяется очень медленно, свидетельствуя о том, что через мембранную емкость проходит очень небольшой суммарный заряд (см. уравнение 4). Затем равновесие нарушается в пользу выходящего тока, результирующее движение положительного заряда происходит с внутренней поверхности мембраны к наружной и начинается реполяризация клетки. Постепенное смещение суммарного тока в выходящем направлении обусловлено как инактивацией (уменьшением) каль-

циевого тока I_{si} , так и медленной активацией (увеличением) зависящего от времени выходящего тока.

Noble, Tsien [50] изучали процесс реполяризации в проводящем сердечном миоците. Они зарегистрировали зависящий от времени выходящий ток, активирующийся в диапазоне потенциалов, близком к потенциалу фазы плато потенциала действия. Его зависимость от времени состоит из двух компонентов: один имеет относительно маленькую постоянную времени (500 мс), а другой — значительно большую (5 с). При использовании стандартных протоколов метода фиксации потенциала для определения равновесного потенциала этого тока цитируемые авторы обнаружили, что переносчиками заряда этого тока в основном, но не исключительно, являются ионы K^+ . Так как этот канал не является абсолютно селективным для какого-либо одного вида переносчика заряда, то ток, проходящий через него, был обозначен I_x и выражен в виде двух компонентов:

$$I_x = I_{x_1} + I_{x_2},$$

где I_{x_1} — более быстрый компонент; I_{x_2} — более медленный. Такой ток часто называют также «током с задержанным выпрямлением», связывая его, таким образом, с реполяризующими выходящими токами в нерве и скелетной мышце. На рис. 4.5, а показаны записи I_x , взятые из [50].

Реконструкция потенциала действия проводящего сердечного миоцита с помощью компьютера подтвердила, что существование I_x необходимо для процесса реполяризации в этих клетках [28]. В настоящее время аналогичные зависящие от времени выходящие токи обнаружены в препаратах СА-узла (рис. 4.5, б) [51], в препаратах предсердий и в клетках желудочков [52, 53]. И хотя такой ток в миокарде желудочков не является столь критичным для реполяризации, как в волокнах Пуркинье [29], он вносит определенный вклад в этот процесс в каждом из этих типов клеток и даже участвует в развитии пейсмекерной активности в СА-узле [54], а также наблюдается в частично деполяризованных клетках желудочков [53] и в проводящих сердечных миоцитах.

Ток I_x блокируется ионами цезия как изнутри клетки [63], так и снаружи [53], а также при внутриклеточном введении соединений с четвертичным аммонием [56]. Он также очень чувствителен к норадреналину [57], увеличиваясь почти в 4 раза при максимальной концентрации этого нейромедиатора [48].

Транзиторный выходящий ток. Фаза быстрой реполяризации потенциала действия проводящих сердечных миоцитов, следующая за фазой быстрой деполяризации, зависящей от ионов Na^+ , также обусловлена изменением направления тока с входящего на выходящее, но в этом случае изменение обусловлено инактивацией I_{Na} одновременно с активацией и последующей инактивацией выходящего тока большой амплитуды.

В ранних исследованиях методом фиксации потенциала был обнаружен транзиторный компонент выходящего тока, доминирующий в начальный период развития тока, регистрируемого во

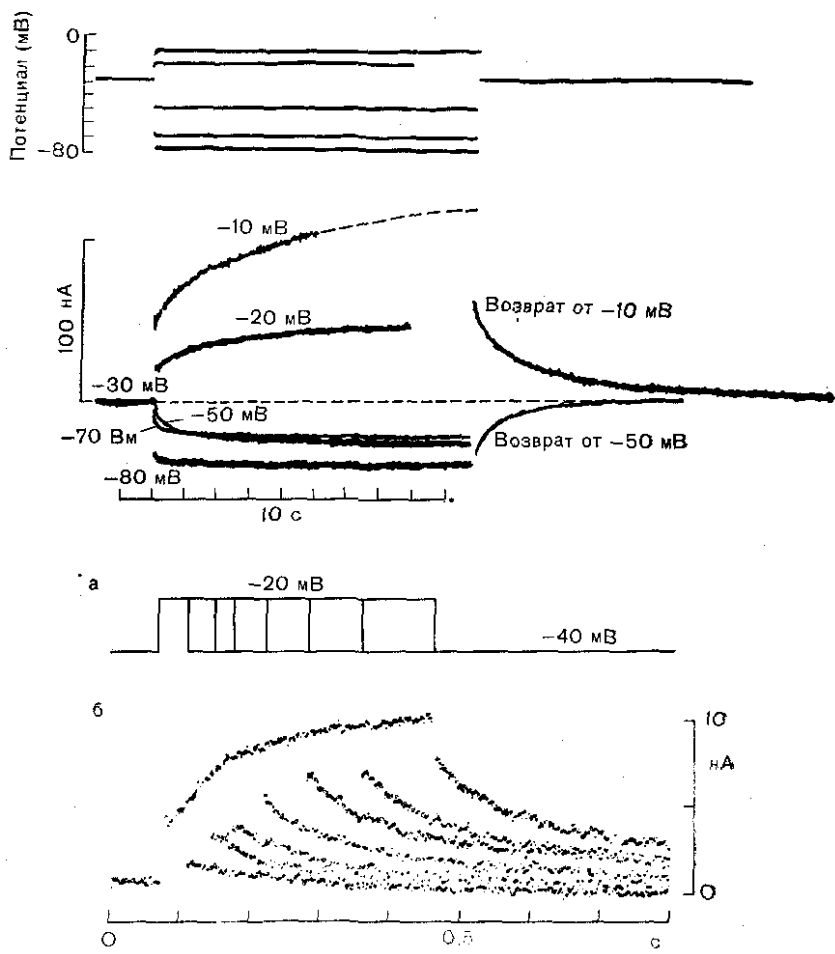


Рис. 4.5. Реполаризующие выходящие токи в волокне Пуркинье и СА-узле. а — медленная активация I_x в волокне Пуркинье сердца овцы. Ступеньки деполяризации до уровней -20 и -10 мВ вызывают медленное увеличение амплитуды выходящего тока. При гиперполяризации амплитуда тока уменьшалась. Хвостовые токи, регистрируемые после окончания ступенек потенциала, использовали для определения части тока I_x , которая была активирована во время предшествующей ступеньки потенциала; б — аналогичным методом зарегистрирован более быстрый выходящий ток в СА-узле сердца кролика. В данном случае показаны записи тока, развивающегося в ответ на тестирующие ступеньки потенциала до уровня -20 мВ разной продолжительности. Обгибающая хвостовых токов, развивающихся после окончания ступеньки потенциала, показывает увеличение амплитуды этого тока в времени. По [51].

время деполяризующих импульсов высокой амплитуды. Эти исследования позволили предположить, что этот ток переносится ионами хлора, так как он сильно уменьшается при удалении последнего из раствора [58, 59]. Но такое влияние удаления хлора позже стали относить за счет его косвенного действия через изменение внутриклеточной активности Ca^{2+} [60].

В последующих исследованиях было получено доказательство того, что ионы K^+ являются наиболее вероятными переносчиками течения во время этого транзиторного выходящего тока. Такой вывод основан на фармакологическом тестировании: было показано, что транзиторный выходящий ток чувствителен к химическим соединениям и изменяется при воздействиях, блокирующих калиевые каналы в других возбудимых клетках. Он чувствителен к 4-аминопиридину, тетраэтиламмоний, подаваемому извне [60, 61], и соединениям, содержащим четвертичный аммоний, воздействующим изнутри [56], а также к замене внутриклеточного K^+ на Cs^+ [62, 63].

Такой ток первоначально обозначали как I_{qr} , но в настоящее время обозначается I_{to} (транзиторный выходящий ток). Его кинетические свойства еще не полностью проанализированы, но ясно, что он быстро активизируется и инактивируется, по крайней мере частично, с постоянной времени приблизительно 50 мс. Результаты последних исследований позволили предположить, что I_{to} может также состоять из двух компонентов, один из которых чувствителен к внутриклеточной концентрации кальция, а второй — не зависит от кальция [64].

I_{to} наиболее выражен в проводящих сердечных миоцитах, в которых он участвует в образовании «выемки» на потенциале действия. Он также имеется и в клетках других тканей сердца, таких как клетки рабочего миокарда желудочков, хотя в них он не играет такой значительной роли [65].

Токи, активируемые ионами кальция. Известно, что активируемые кальцием токи имеются в клетках самых разных тканей и, возможно, I_{to} является именно таким током. Siegelbaum и соавт. [66] первыми продемонстрировали возможное участие $[Ca^{2+}]_i$ в регуляции проводимости по I_{to} каналам, что было подтверждено другими исследователями [64, 67]. С этой точки зрения, изменения I_{to} во времени обусловлены не только изменениями проводимости соответствующих каналов вследствие функционирования потенциалозависимых ворот. Вместо этого увеличение проводимости определяется повышением внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , которая фазически изменяется во время деполяризации.

Некоторые свойства тока с задержанным выпрямлением (I_x) также позволяют предположить, что и этот ток может активироваться кальцием. Вход кальция (I_{si}) предшествует развитию I_x , происходящему медленнее, а ряд химических соединений, блокирующих I_{si} , также уменьшают I_x [44]. Кроме того, вызванное катехоламинами увеличение I_{si} сопровождается существенным повышением I_x . Однако последние экспериментальные данные показали, что активацию I_x можно отделить от активации I_{si} с помощью нового блокатора кальциевых каналов — низолдипина [45]. Так же как и Д-600, низолдипин предотвращает увеличение I_{si} при действии норадреналина, но не влияет на рост I_x [48]. Поэтому маловероятно, что последний активируется внутриклеточными ионами Ca^{2+} [68].

Пейсмекерный ток. Хотя проводящие сердечные миоциты и не

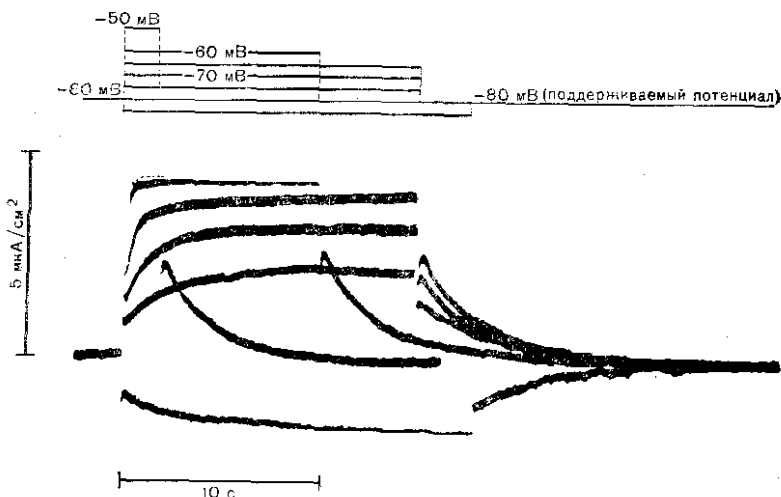


Рис. 4.6. Пейсмекерный ток (I_{K_2}) в волокне Пуркинье сердца овцы. Показаны кривые трансмембранного ионного тока в ответ на ступеньки потенциала в пределах диапазона диастолических потенциалов. Представлены шесть записей, наложенных одна на другую, использовавшиеся для определения изменения величины этого тока в зависимости от амплитуды хвостовых токов [71].

являются основными водителями ритма сердца, ионные основы пейсмекерной активности были впервые исследованы на этих клетках, так как они наиболее доступны для экспериментального изучения, чем клетки тканей других водителей ритма. На основании уравнения (4) и в этом случае очевидно, что медленная деполяризация водителя ритма должна быть обусловлена смещением суммарного ионного тока во входящем направлении. Weidman (цит. по [69]) предположил, что существуют три возможных объяснения этого явления: 1) медленное повышение натриевой проницаемости; 2) медленное уменьшение калиевой проницаемости; 3) медленное уменьшение выходящего тока, создаваемого при работе натриевого насоса (см. ниже).

Vassale [70] использовал комбинацию методов фиксации тока и фиксации потенциала и получил данные в поддержку второй гипотезы. Позднее Noble, Tsien [71] в своем очень подробном исследовании описали свойства такого пейсмекерного тока, который назвали I_{K_2} ; полученные ими данные свидетельствовали о том, что этот ток переносится через калиевые каналы, управляемые воротами (рис. 4.6). Все эти каналы находятся в открытом состоянии, когда мембранный потенциал выше -60 мВ, и начинают закрываться по мере того, как мембрана становится более отрицательной во время процесса реполяризации. Переход этих каналов из открытого состояния в закрытое, происходящий во времени, определяет скорость, с которой выходящий суммарный трансмембранный ток уменьшается, что и объясняет величину наклона пейсмекерной де-

поляризации (см. уравнение 4). Аналогичный механизм ответственности по искомую активность СА-узла [54].

И хотя результаты фармакологического тестирования поддерживают гипотезу о том, что пейсмекерный ток проводящих сердечных миоцитов в основном переносится ионами K^+ , в результате последних экспериментов возникло предположение, что ситуация является более сложной частично вследствие аккумуляции или истощения ионов K^+ во внеклеточном пространстве препарата [72—74]. DiFrancesco [75] предположил, что I_{K_2} может быть, по крайней мере частично, обусловлен зависимым от времени входящим током. Дальнейшие исследования пейсмекерных токов в изолированных проводящих сердечных миоцитах помогут решить, какая из этих точек зрения верна.

Хронотропное действие нейромедиаторов. Норадреналин увеличивает частоту сердечного ритма, ацетилхолин уменьшает ее. И хотя наиболее известным результатом стимуляции блуждающего нерва (вызывающей освобождение ацетилхолина) является повышение пассивной калиевой проницаемости, оба нейромедиатора также влияют на каналы, управляемые воротами; и общая реакция сердца определяется суммой всех этих эффектов.

Влияние норадреналина на частоту сердечного ритма также было впервые описано в проводящих сердечных миоцитах. Tsien [76] обнаружил, что этот катехоламин влияет на кинетику I_{K_2} -канала, ускоряя его уменьшение в диапазоне диастолических потенциалов. Такое ускорение «выключения» выходящего тока приводит к увеличению наклона деполяризации (см. уравнение 4). Подобное явление наблюдается в СА-узле, но в этом случае определенную роль в повышении частоты возбуждений этих клеток играет влияние норадреналина на I_{Si} . Аналогично этому снижение частоты возбуждения узловых клеток при действии ацетилхолина частично обусловлено его угнетающим действием на кальциевый ток в узловых клетках (см. предыдущий раздел).

Заключение

В этой главе основное внимание было уделено зависимым от времени ионным токам, вносящим свой вклад в электрическую активность сердца. Не зависящие от времени фоновые токи [2], токи электрогенного Na^+/K^+ -насоса (см. главу 18) [77], а также возможная роль $Na^+—Ca^{2+}$ -обмена в электрической активности сердца (см. главу 10) в данной главе не рассматривались.

Вместе с тем был представлен обзор характеристик нескольких токов, которые были описаны для сердечной мышцы, и приведены ссылки на более подробные исследования каждого из этих токов. Электрофизиология сердца является интересной областью исследования, расширяющейся по мере разработки новых количественных методов, что позволяет уточнить наше понимание механизмов, лежащих в основе сложных форм электрической активности нормального сердца, и корректировать ее нарушения в поврежденных участках миокарда.

Глава 5

ЭЛЕКТРОГЕНЕЗ ПЕЙСМЕКЕРНОГО ПОТЕНЦИАЛА В АТРИОВЕНТРИКУЛЯРНОМ УЗЛЕ

Х. ИРИСАВА, А. НОМА, С. КОКУБУН, Ю. КУРАЧИ
(H. IRISAWA, A. NOMA, S. KOKUBUN, Y. KURACHI)

ВВЕДЕНИЕ

Атриовентрикулярный (АВ) узел осуществляет две жизненно важные функции. Одна из них состоит в проведении возбуждения из предсердия в желудочки. Медленное проведение возбуждения в ткани узла [1, 2] обеспечивает необходимую временную задержку между сокращением предсердий и сокращением желудочков и позволяет сердцу работать в качестве эффективного насоса. Вторая функция АВ-узла заключается в его способности выступать в качестве водителя ритма сердца благодаря наличию вторичной пейсмерной активности. Когда синоатриальный (СА)-узел утрачивает способность быть водителем ритма сердца либо в результате угнетения его автоматизма, либо при нарушении проведения, то водителем ритма становится АВ-узел.

После открытия АВ-узла в начале века [3] лишь в конце 50-х годов было начато изучение основных физиологических принципов его работы, когда были проведены исследования трансмембранных потенциалов клеток АВ-узла. К настоящему времени практически все основные принципы работы АВ-узла экспериментально исследованы. Однако эти исследования в основном ограничивались анализом формы потенциала действия и максимальной скорости деполяризации, поэтому остается неясным, чем определяются полученные результаты: свойствами мембран клеток АВ-узла или характеристиками распространяющегося потенциала действия. Например, связаны ли искажения фазы быстрой деполяризации со ступеньками или завалами, часто наблюдаемыми в узловых клетках, в основном с необычными характеристиками входящего тока, или же это просто артефакт, обусловленный блоком проведения? Увеличивает ли ацетилхолин калиевую проводимость мембраны или он угнетает медленный входящий ток? Зависит ли генерация потенциала действия от мембранного потенциала покоя? Для того чтобы ответить на все эти вопросы, необходимо осуществить прямое измерение мембранных ионных токов.

В 1976 г. Noma, Irisawa [4] разработали способ выделения небольшого препарата СА-узла, использование которого обеспечило возможность изучения клеток первичного водителя ритма методом фиксации потенциала. В нескольких независимых лабораториях этот метод стал обычным для исследований СА-узла [5, 6]. В дан-

ной главе приведен обзор только нами проведенных исследований АВ-узла. Оказалось, что небольшие препараты АВ имеют электрофизиологические характеристики, похожие на АВ-узла.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

АВ-узел сердца кролика расположен между устьем коронарного синуса и створкой трехстворчатого клапана [7] и имеет размер приблизительно 5×3 мм. Перед началом препаровки небольшой образец мы исследуем форму потенциала действия в интактном АВ-узле (рис. 5.1, б). Мы подразделяли область узла на 15 малых участков, как показано на рис. 5.1, а. Форма потенциала действия, зарегистрированного от участка I, была похожа на форму потенциала действия, регистрируемого в предсердии, но максимальной скорость нарастания этого потенциала составляла 28,6 В/с меньше обычно наблюдаемой в ткани предсердий. В участке регистрировали потенциалы действия, похожие на потенциалы действия NH-клеток (оригинальная номенклатура, клетки промежуточного типа между узловыми клетками и клетками предсердно-желудочкового пучка), однако максимальная скорость нарастания этого потенциала действия очень мала по сравнению с наблюдаемой в предсердно-желудочковом пучке. Амплитуда потенциала действия в области III была наименьшей, причем потенциал был наименее отрицательным по сравнению с таковым в трех других участках. Все эти три типа потенциалов действия являлись распространяющимися потенциалами действия. Эти потенциалы зарегистрированные в интактных распластанных препаратах, похожи на потенциалы, наблюдаемые другими исследователями [8—10], что подтверждает, что область, которую мы исследовали действительно является АВ-узлом.

После этого мы рассекали область АВ-узла перпендикулярно АВ-кольцу на пять полосок шириной 1 мм каждая. Обе стороны каждой полоски аккуратно подрезали кусочек за кусочком до ширины 0,5 мм. Эти полоски были пронумерованы от I до V (рис. 1.5, а). Затем во всех полосках удаляли эпикардиальный слой, а эндокард оставляли интактным. Каждую полоску затем перевязывали хирургическим шелком на три равные части, пометив буквами А, Б и В.

Для метода фиксации потенциала такой размер препарат является достаточно маленьким. Нам приходилось постепенно резать препарат до размеров $0,25 \times 0,25 \times 0,1$ мм. Подрезание проводили осторожно с помощью кусочка бритвенного лезвия.

ПОТЕНЦИАЛЫ ДЕЙСТВИЯ В НЕБОЛЬШИХ ОБРАЗЦАХ ТКАНИ АВ-УЗЛА

На рис. 5.2 показан один из примеров потенциалов действия зарегистрированных в таком небольшом образце. В десяти экспериментах 4—6 образцов из участков I-A, I-B, II-A и V-B спон-

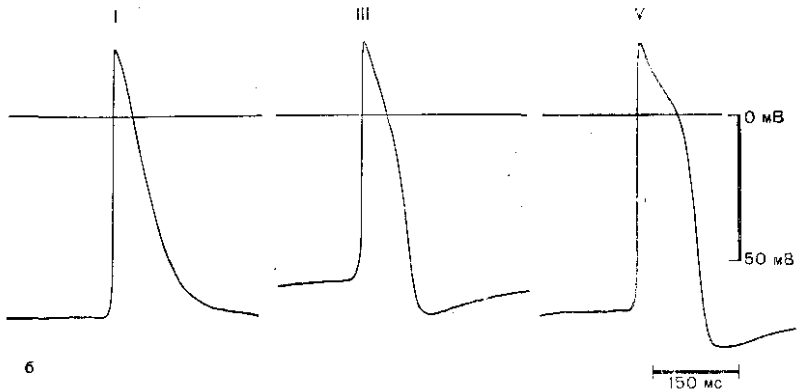
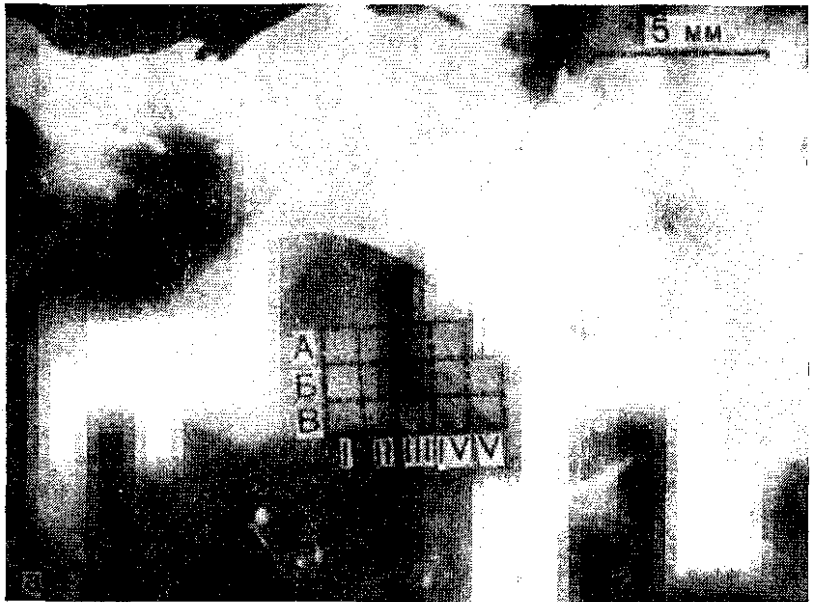
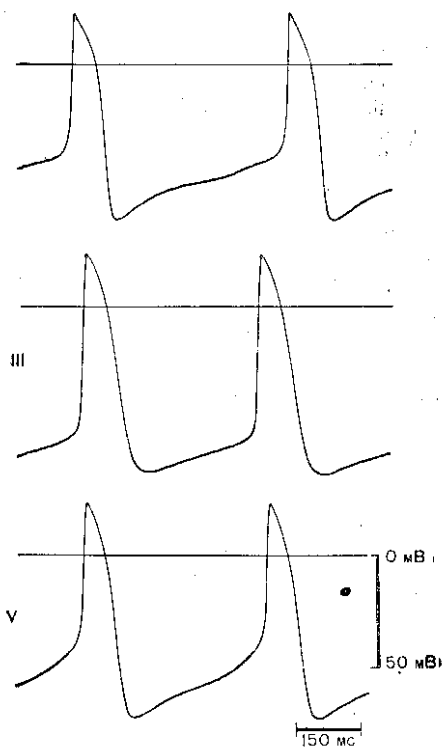


Рис. 5.1.

(а) Фотография области АВ-узла: КС — коронарный синус; ПП — правое предсердие; ОО — овальное отверстие; ПЖ — правый желудочек; ТК — трехстворчатый клапан; ПЖП — предсердно-желудочковый пучок (пучок Гиса) (А, В, С, I—V объяснены в тексте). б — потенциалы действия, зарегистрированные в интактных препаратах АВ-узла; I, III, V — соответствующие участкам I-В, III-В, V-В на рис. 5. По [30].

но не возбуждались, однако в большинстве случаев отдельные небольшие препараты проявляли спонтанную активность, как видно по медленно развивающейся пейсмеркерной деполяризации (см. рис. 5.2). В отличие от наблюдавшейся разницы в форме потенциалов действия, зарегистрированных в отдельных участках интактного препарата АВ-узла, потенциалы действия от небольших об-

Рис. 5.2. Потенциалы действия, зарегистрированные в небольших образцах ткани АВ-узла: I, III, V соответствуют участкам I-Б, III-Б, V-Б на рис. 5.1, а. По [30].



раццов ткани АВ-узла, зарегистрированные от всех 14 участков, были близки по своим параметрам.

Амплитуда потенциала действия в небольших образцах лишь слегка превышала приводимую для узловых клеток в ссылках [8, 10], а максимальная скорость нарастания потенциала действия и его длительность были равными с полученными другими авторами в более поздних исследованиях [11].

Потенциал покоя небольших образцов ткани АВ-узла составлял приблизительно -44 мВ, и эта величина была, очевидно, более положительна, чем потенциал покоя интактных препаратов АВ-узла (-62 мВ в трех неактивных образцах). Последнее значение хорошо соответствует данным, полученным другими исследователями [8, 10]. В небольших образцах потенциал покоя и максимальная скорость нарастания потенциала действия были ниже нормы, а амплитуда и овершут потенциала действия были нормальными, и не наблюдалось искажений фазы быстрой деполяризации. В небольших образцах ткани АВ-узла потенциалы действия, регистрируемые в трех различных точках, возникают практически одновременно, что указывает на синхронность возбуждения в пределах образца.

В небольших образцах ткани АВ-узла ацетилхолин гиперполяризует мембрану точно так же, как в клетках СА-узла (рис. 5.3). При добавлении в перфузат ацетилхолина в концентрации 10^{-7} г/мл мембрана клеток гиперполяризуется и спонтанная активность прекращается.

Реакция на пропускание тока

Мембранным потенциалом небольших образцов ткани АВ-узла можно управлять, пропуская ток через второй микроэлектрод. Когда размер образца превышал 0,5 мм, точечное пропускание тока

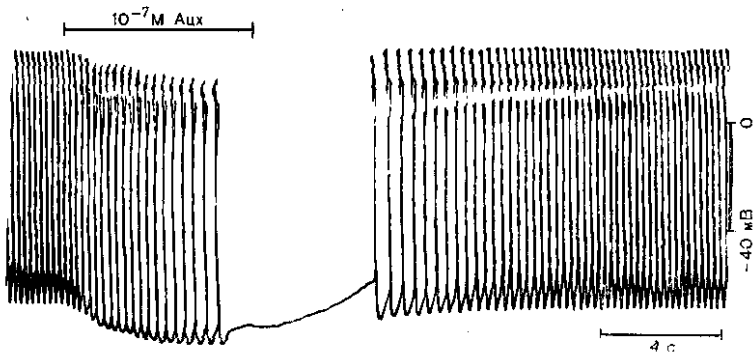
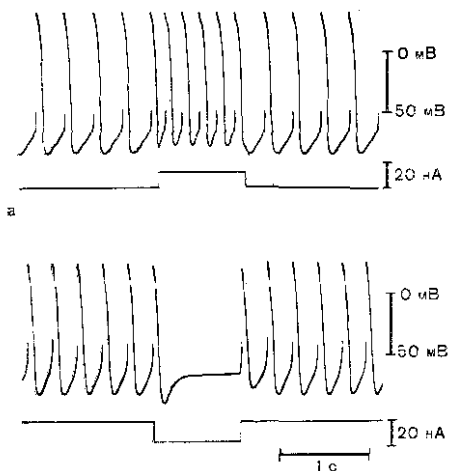


Рис. 5.3. Действие ацетазолина (10^{-7} г/мл) на небольшой образец ткани АВ-узла (S. Kokubun, оригинальная запись).

через второй микроэлектрод не изменяло частоту спонтанных возбуждений [12]. В более крупных образцах пропускание тока с помощью электрода-присоски с диаметром кончика 0,1 мм приводит к изменению амплитуды и частоты спонтанных возбуждений [13, 14]. Mendez [11] повторил эксперименты Shigeto, Igisawa, используя микропипетку большого диаметра, помещенную над предсердно-желудочковым пучком. В своих экспериментах цитируемые авторы обнаружили, что максимальная скорость нарастания потенциала действия узловых клеток уменьшается незначительно. Если вспомнить, какова постоянная длины в этом участке миокарда [15], то становится совершенно ясно, что точечная инъекция электрического тока в области предсердно-желудочкового пучка не может изменить частоту возбуждения клеток в центре АВ-узла.

В небольших образцах ткани АВ-узла, выделенных из любого участка АВ-узла из числа показанных на рис. 5.1, наблюдаются



изменения как частоты, так и амплитуды спонтанных потенциалов действия в ответ на инъекцию тока (рис. 5.4). При деполяризующих импульсах тока максимальный диастолический потенциал уменьшается, а частота спонтанных возбуждений возр

Рис. 5.4. Результаты эксперимента по фиксации тока в небольших образцах ткани АВ-узла. На каждом фрагменте рисунка: верхняя запись — мембранный потенциал, нижняя — подаваемый ток.
а — деполяризующий ток 11,4 μ А;
б — гиперполяризующий ток 17,1 μ А.
По [30].

дент, в то время как при воздействии гиперполяризующего тока происходит прекращение спонтанной активности.

В этом примере самый низкий потенциал, при котором происходит прекращение автоматизма, был равен -60 мВ, что близко потенциалу покоя интактных спонтанно неактивных образцов ткани АВ-узла.

Наличие электрогенного натриевого насоса в небольших образцах ткани АВ-узла

В небольших образцах ткани АВ-узла был также обнаружен электрогенный Na^+/K^+ -насос [16, 17]. Электрогенность Na^+/K^+ -насоса определяли по кратковременной гиперполяризации, вызываемой ионами K^+ после помещения образца на короткое время в бескальциевый раствор Тироде (рис. 5.5). Перфузия бескальциевым раствором Тироде продолжалась только 2 мин, а затем образец перфузировали раствором Тироде с 50 мМ K^+ . При длительном воздействии бескальциевого раствора Тироде наблюдались осцилляции мембранного потенциала. Когда перфузию переключали на раствор Тироде с высоким содержанием ионов K^+ , то мембрана гиперполяризовалась до $-69,3$ мВ, т. е. до явно более отрицательного потенциала, чем равновесный K^+ -потенциал, составляющий -28 мВ при внутриклеточной концентрации ионов K^+ — 150 мМ. Такая кратковременная гиперполяризация исчезала после воздействия строфандинна (10^{-5} М). При такой кратковременной гиперполяризации наклон линейного участка вольтамперной кривой (проводимость на линейном участке) остается неизменным. Способность одновалентных катионов активировать натриевый насос в месте связывания ионов K^+ располагается в следующем ряду: $\text{Tl} > \text{Rb} = \text{K} > \text{NH}_4 = \text{Cs} > \text{Li}$, что не противоречит аналогичным последовательностям, опубликованным в литературе. Эти результаты показывают, что характеристики натриевого насоса в клетках АВ-узла аналогичны таковым в других возбудимых тканях, и подтверждают, что небольшие образцы ткани АВ-узла сохраняют нормальные физиологические свойства даже после многократного уменьшения их размеров при подрезании.

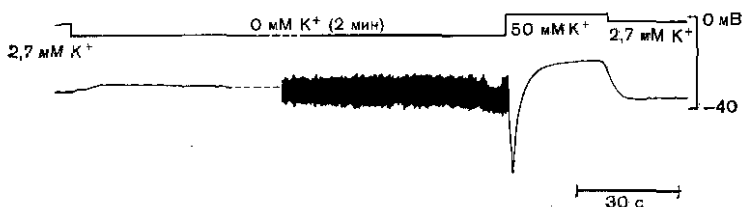


Рис. 5.5. Влияние 50 мМ K^+ на кратковременную деполяризацию. В течение всего эксперимента перфузионный раствор содержал Д-600 в концентрации 10^{-6} г/мл. По [16].

Мембранные токи в клетках АВ-узла

Использование небольших образцов ткани АВ-узла позволило исследовать их методом фиксации потенциала. Мы применяли обычный двухмикроэлектродный метод фиксации потенциала [18]. Системы мембранных токов интенсивно изучались в проводящих сердечных миоцитах млекопитающих, в клетках желудочков и в клетках СА-узла [19]. Noma и соавт. [20] и Kokubun и соавт. [15] опубликовали результаты, полученные на клетках АВ-узла. Ниже приводится краткое изложение этих результатов.

Метод фиксации потенциала можно применять, если размеры образцов ткани АВ-узла составляют не более $0,2 \times 0,2 \times 0,1$ мм. Даже при таких размерах образцы продолжали спонтанно сокращаться и имели потенциалы действия нормальной формы. Однородность распределения потенциала в небольшом образце была исследована с помощью трех микроэлектродов. Было подтверждено отсутствие каких-либо существенных отклонений измеряемого потенциала от задаваемого командного импульса, за исключением отклонения порядка 5 мВ в течение первых 10 мс после начала ступеньки потенциала [20].

На рис. 5.6 представлено семейство записей тока, полученных в режиме фиксации потенциала, от поддерживаемого потенциала -40 мВ до потенциалов в диапазоне до $+10$ или до -100 мВ с шагом 10 мВ. Перед началом эксперимента образец проявлял спонтанную активность: амплитуда потенциала действия была 98 мВ, а максимальная скорость деполяризации — 11 В/с. После включения цепи фиксации потенциала наблюдалось постепенное уменьшение тока, связанного с предыдущими потенциалами действия, в конце концов регистрировался постоянный ток через мембрану. Этот постоянный ток был выходящим при поддерживаемых потенциалах, более положительных, чем -35 или -40 мВ, и был входящим при более отрицательных поддерживаемых потенциалах. При деполяризации возникал медленный входящий ток, который был чувствителен к D-600 и нечувствителен к тетродотоксину (ТТХ). После инактивации медленного входящего тока постепенно активировался выходящий ток, постепенно спадающий после окончания ступеньки и возврата к поддерживаемому потенциалу. Этот выходящий компонент тока представляет собой калиевый ток, аналогичный I_K в СА-узле. Хвост выходящего тока имел два компонента, быстрый и медленный. Если мембранный потенциал зафиксировать на уровне $+10$ мВ на период 1 с, а затем вернуться к поддерживаемому потенциалу, то первый компонент выходящего тока будет иметь постоянную времени 133 мс, а более медленный компонент — 1234 мс. Эти результаты хорошо согласуются со свойствами I_K в СА-узле [5, 6].

В клетках АВ-узла мы также наблюдали ток, активируемый при гиперполяризации (i_h) [22], i_f [24] или i_p [23]. При гиперполяризации от поддерживаемого потенциала -40 мВ первые две или три ступеньки (от -50 до -60 мВ с шагом 10 мВ) вызывали лишь постепенно спадающий выходящий ток i_K , однако при потен-

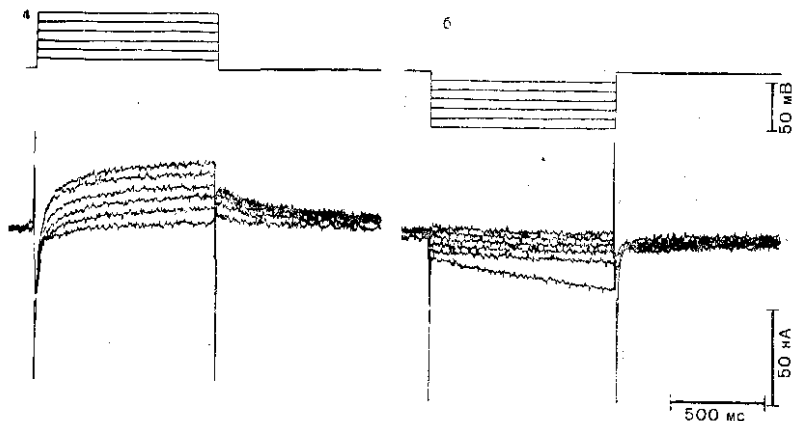


Рис. 5.6. Регистрация методом фиксации потенциала ионного тока в клетках АВ-узла, помещенных в растворе Тирода: вверху — потенциал, внизу — соответствующие кривые тока. Продолжительность тестирующих ступенек: 1 с. Поддерживаемый потенциал составляет -40 мВ. Частота следования тестирующих ступенек $0,1$ Гц. По [15].

потоках, более отрицательных, чем -70 мВ, наблюдалась активация i_h . При возврате к поддерживаемому потенциалу активировался натриевый ток (i_{Na}) и медленный входящий ток, причем последний наблюдался сразу после окончания емкостной волны. В некоторых образцах нам не удалось зарегистрировать i_h , несмотря на то, что в них проявлялась спонтанная активность.

Если цепь фиксации потенциала разрывали, то в образце немедленно возобновлялась спонтанная активность. Форма потенциала действия была практически той же, что и перед началом фиксации потенциала.

ЧАСТИЧНЫЙ ВКЛАД i_{Na}

Накапливается все больше данных в пользу того, что клетки АВ-узла, особенно находящиеся в его центральной области или в области N-клеток, имеют медленные каналы, проводящие медленный входящий ток [10, 24, 25]. Истинные узловое клетки (N-клетки) устойчивы к воздействию ТТХ, но их активность поднимается ионами марганца, а также верапамила. Однако Ронсе, Zunino и соавт. [26], De Ceretti и соавт. [27] предположили, что даже в клетках центральной области АВ-узла существуют быстрые натриевые каналы. Разные исследователи по-разному относятся к этим результатам. Одни считают, что такие клетки из центральной области АВ-узла являются не N-клетками, а переходными клетками. Другие утверждают, что N-клетка нечувствительна к ТТХ лишь при нормальном для нее потенциале покоя; когда большая часть натриевых каналов инактивирована. Если мембрану гиперполяризовать до потенциала ниже -70 мВ, то это может привести

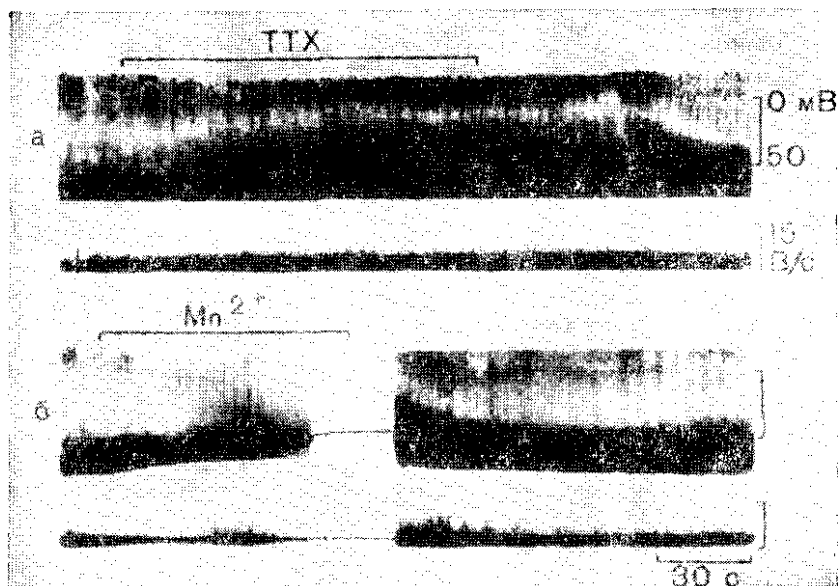


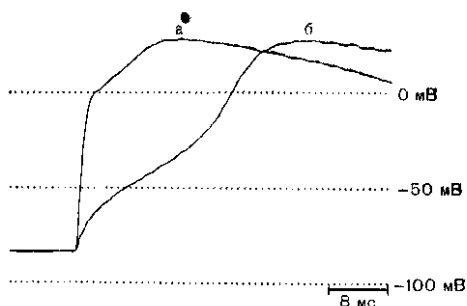
Рис. 5.7. Влияние ТТХ и ионов Mn^{2+} на потенциал действия АВ-узла. На каждом фрагменте рисунка: сверху — потенциал действия, внизу — максимальная скорость деполяризации. По [30].

к реактивации i_{Na} . Такое явление действительно наблюдается в клетках СА-узла [28, 29]. На эти вопросы можно ответить только при изучении АВ-узла методом фиксации потенциала.

Kokubun и соавт. [30] показали наличие i_{Na} в небольших образцах ткани АВ-узла, выделенных из его центральной области (рис. 5.7). ТТХ в концентрации 10^{-6} г/мл вызывает очень маленькие (6%) снижения амплитуды потенциала действия и скорости его нарастания. При такой концентрации ТТХ никогда не наблюдалось прекращение спонтанной активности, а введение 4 мМ Mn^{2+} через 2 мин вызывало угнетение спонтанной генерации потенциала действия. Применение верапамила в концентрации 10^{-6} г/мл давало такой же результат. Эти факты достаточно хорошо соответствуют результатам, полученным другими авторами, и подтверждают, что мы регистрируем потенциалы именно от N-клетки по классической номенклатуре. Используя метод фиксации потенциала, мы гиперполяризовали клетку до -83 мВ на 0,5 с для восстановления возбудимости i_{Na} . При разрыве цепи обратной связи регистрировали возбуждение, вызванное анодным замыканием. Фаза нарастания этого вызванного замыканием возбуждения состоит из двух отдельных фаз: быстрой (75 В/с) и медленной (4,2 В/с). После введения в перфузат ТТХ (10^{-7} г/мл) фаза быстрого нарастания исчезает. Медленная фаза активизируется после некоторой начальной задержки, отражающей постоянную времени покоящейся мембраны. Следует отметить, что амплитуды потенциалов дей-

Рис. 5.8. Влияние ТТХ на фронт потенциала действия, возникающего при анодном размыкании.

а — нормальный раствор Тироде; б — раствор Тироде с добавлением ТТХ в концентрации 10^{-7} г/мл. По [15].



ствия при анодном размыкании в обоих случаях были близки по величине (рис. 5.8). Основываясь на этих данных, мы пришли к выводу, что даже в центральной области АВ-узла i_{Na} вносит частичный вклад в потенциал действия, но основным током при обычном для этих клеток потенциале покоя является медленный входящий ток.

ВЛИЯНИЕ БЕЗНАТРИЕВОГО И БЕСКАЛЬЦИЕВОГО РАСТВОРОВ ТИРОДЕ НА АВ-УЗЕЛ

Если в нормальном растворе Тироде заменить ионы Na^+ ионами триса, то спонтанная активность в образцах АВ-узла немедленно прекращается. В таких условиях уровень поддерживаемого тока сдвигается в выходящем направлении на 20 нА и все еще возможна активация медленного входящего тока, но его амплитуда по отношению к поддерживаемому току становится немного меньше, чем в контроле. В безнатриевом растворе возрастает амплитуда зависящего от времени выходящего тока, а также увеличивается ток утечки. Как показано на рис. 5.9, а, компонент выходящего тока, регистрируемый через 250 мс после начала ступеньки потенциала, практически линейно зависит от мембранного потенциала. Эти результаты ясно показывают, что клетки АВ-узла могут быть возбуждены и в безнатриевом растворе. Вследствие увеличения выходящего тока и тока утечки длительность потенциала действия в безнатриевом растворе будет короче.

Прекращение спонтанной активности в безнатриевом растворе происходит в результате возникновения гиперполяризации мембраны вследствие существенного увеличения поддерживаемого тока в выходящем направлении. Если в этих условиях в перфузат добавить 5 мМ Ba^{2+} , то спонтанная активность АВ-узла может восстановиться. Аналогичное явление наблюдали Wiggins, Cranefield [31], которым удалось вызвать устойчивую спонтанную активность проводящих сердечных миоцитов, перфузируя их безнатриевым раствором, содержащим 4 мМ Ba^{2+} , 16 мМ Ca^{2+} и 12,8 мМ ТЭА. Полученные результаты можно объяснить с помощью вольт-амперных зависимостей, показанных на рис. 5.9, а.

Образцы ткани АВ-узла также теряют спонтанную активность, когда перфузат содержал 0,5 мМ ЭГТА и не содержал ионов Ca^{2+} .

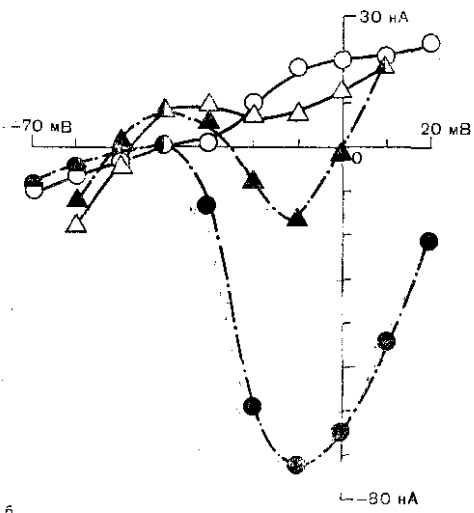
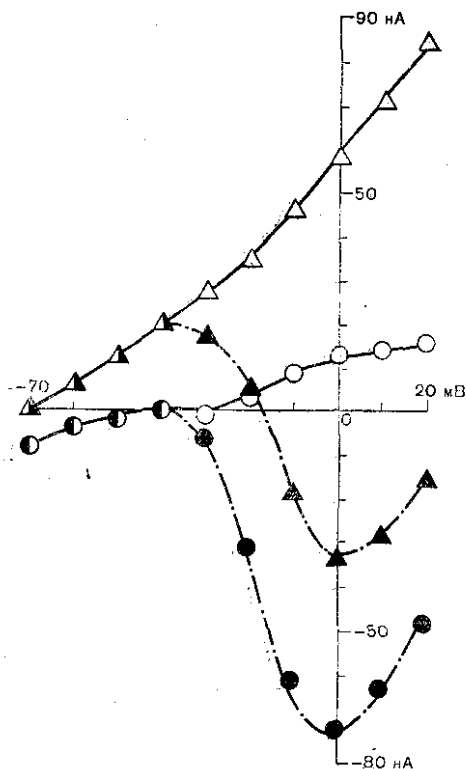


Рис. 5.9. Изменение медленного входящего тока при удалении из раствора ионов Na^+ или Ca^{2+} . Поддерживаемый потенциал составляет -40 мВ. Приведены вольтамперные зависимости для максимальных значений входящего тока (темные значки) и величин тока через 250 мс (а) или 330 мс (б) после начала тестирующей ступеньки потенциала (светлые значки); кружками обозначено применение раствора Тироде; треугольниками — тестирующего раствора без ионов Na^+ (а) или Ca^{2+} (б). По [15].

Поддерживаемый ток сдвигался в выходящем направлении на 10 нА (рис. 5.9, б). Амплитуда медленного входящего тока постепенно уменьшалась, и через 3 мин он исчезал. При продолжении перфузии бескальциевым раствором через 2 мин начинал появляться входящий ток, характеризуемый медленной инактивацией во времени. Такой ток полностью блокировался при действии Д-600. Вольтамперная зависимость в бескальциевом растворе показана на рис. 5.9, б. Через 330 мс после начала ступеньки потенциала кривая имела отрицательный наклон между -40 и -20 мВ. Этот наклон исчезал под действием верапамила, следовательно, он являлся результатом неполной инактивации медленного входящего тока. Полученные данные свидетельствуют о том, что входящий ток, регистрируемый в бескальциевом растворе, переносится ионами Na^+ через каналы медленного входящего тока. Существование

160

последнего в безнатриевом или бескальциевом растворе позволяет предположить, что медленный входящий ток в клетках АВ-узла не может переноситься ионами только одного вида.

Описанный в миокардиальной ткани медленный входящий ток идентичен кальциевому току в других возбудимых тканях. Это подтверждено в экспериментах на одиночных кардиомиоцитах желудочков и при анализе одиночных каналов. Поэтому можно с уверенностью утверждать, что в АВ-узле существуют кальциевые каналы, способные пропускать как ионы Ca^{2+} , так и ионы Na^+ . Полученные результаты хорошо соответствуют опубликованным для АВ-узла ранее [8]. Потенциал действия, вызываемый в бескальциевом растворе, имеет плато большой длительности. Такая форма потенциала действия также может быть объяснена на основе описанных выше вольтамперных зависимостей.

ЛАТЕНТНАЯ ПЕЙСМЕКЕРНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК АВ-УЗЛА

Описанные выше эксперименты по фиксации потенциала выявили, что в клетках АВ-узла существует такая же система ионных токов, как и в СА-узле, поэтому в случае прекращения спонтанной активности СА-узла или нарушения проведения по предсердиям клетки АВ-узла могут играть роль водителя ритма. Однако в нормальном интактном сердце клетки АВ-узла никогда не возбуждаются спонтанно. Потенциал покоя интактных спонтанно неактивных образцов ткани АВ-узла составляет приблизительно -60 мВ, в то время как в спонтанно активных небольших образцах ткани АВ-узла он был равен приблизительно -40 мВ. Хорошо известно, что потенциал покоя в клетках предсердно-желудочкового пучка и в предсердных волокнах ниже -70 мВ. В экспериментах с пропусканием постоянного тока мы наблюдали, что спонтанная активность прекращается при мембранном потенциале -60 мВ. Эти данные указывают, что низкий потенциал покоя является одним из условий, необходимых для восстановления спонтанной активности АВ-узла.

Недавно было показано [32], что ток i_h в СА-узле совершенно похож на выходящий ток, характеризуемый внутри направленным выпрямлением, который обычно наблюдается в клетках желудочков [33] и скелетных мышечных клетках [34]. Ток i_h , активируемый при гиперполяризации, переносится ионами нескольких видов, в то время как ток с внутри направленным выпрямлением переносится только ионами K^+ . i_h нечувствителен к внешнему воздействию ионов Ba^{2+} , в то время как ток с внутри направленным выпрямлением блокируется ими. Как i_h , так и ток с внутри направленным выпрямлением блокируются ионами Cs^+ [32]. Ток с внутри направленным выпрямлением гиперполяризует мембрану до потенциала покоя, близкого к величине E_K . Если в клетке АВ-узла нет каналов такого типа, то наличие i_h может деполяризовать мембрану клетки АВ-узла до -60 мВ. При таком потенциале

мембрана спонтанно не возбуждается, но если немного возрастает ток утечки, то она будет продолжать деполяризоваться, что приведет к возникновению спонтанной активности. Кокубил удалось реконструировать потенциал действия АВ-узла в численных расчетах, и при уменьшении тока утечки, согласно его модели, спонтанная активность исчезала.

РЕЗУЛЬТАТЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ НА КЛАСТЕРАХ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК АВ-УЗЛА

Небольшие образцы типа АВ-узла были удобны для изучения в нем ионных токов. Taniguchi и соавт. [35] недавно удалось изолировать клетки АВ-узла после обработки коллагеназой. По сравнению с клетками желудочков клетки АВ-узла имеют небольшой диаметр; при 85 измерениях в растворе Тироде они имели 93 ± 23 мкм в длину и 14 ± 6 мкм в диаметре. Длина клеток желудочков составляет 115 ± 33 мкм, диаметр — 29 ± 9 мкм (в 102 измерениях). Клетки желудочков не были спонтанно активны в растворе Тироде, содержащем $1,8$ мМ Ca^{2+} . При выделении клеток АВ-узла в растворе Тироде был получен еще один интересный результат — наличие кластеров клеток. Кластер содержит 3—10 округленных клеток. Такие клетки не окрашиваются трипановым синим, что позволяет предположить, что они являются живыми клетками. В таких округленных клетках, выделенных из ткани желудочков, не регистрируется потенциал покоя, а в клетках АВ-узла, образующих кластер, наблюдаются потенциалы действия, форма которых очень близка к наблюдаемой в интактных образцах ткани АВ-узла. На рис. 5.10 проиллюстрирован эксперимент по фиксации потенциала в плоских кластерах клеток АВ-узла, имеющих 50 мкм в ширину и 100 мкм в длину. Использовали двухмик

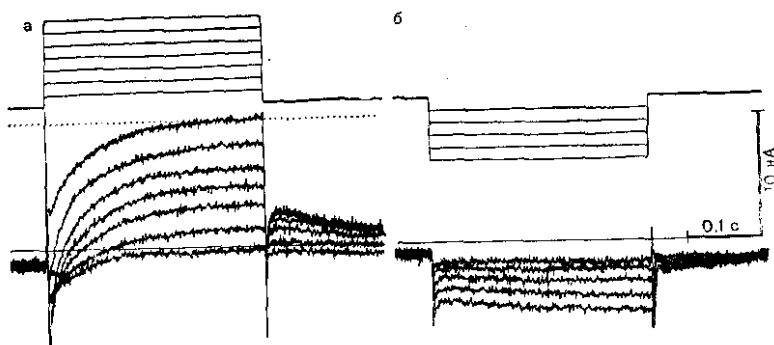


Рис. 5.10. Результаты эксперимента по фиксации потенциала в плоском кластере клеток АВ-узла шириной 50 мкм и длиной 100 мкм. Поддерживаемый потенциал составляет -40 мВ. Деполяризующие ступеньки потенциала подавали в диапазоне от -30 до $+30$ мВ, гиперполяризующие — в диапазоне от -90 до $+50$ мВ с шагом 10 мВ. Прямыми на записях тока обозначен нулевой уровень, точками — уровень 10 нА для выходящего тока. По [35].

микроэлектродный метод фиксации потенциала. Медленный входящий ток, выходящий калиевый ток и его хвостовой ток были по своим свойствам похожи на регистрируемые нами в небольших образцах ткани АВ-узла. Эти кластеры клеток реагировали на ацетилхолин и адреналин так же, как и небольшие образцы ткани АВ-узлы. Более того, нам удалось инъецировать химические вещества внутрь образующих кластер клеток через микроэлектрод. Мы обнаружили, что такой кластерный препарат также является полезным для изучения АВ-узла.

З а к л ю ч е н и е

Несмотря на рост фундаментальных сведений о электрофизиологических свойствах клеток АВ-узла в течение последнего десятилетия, ионные токи, лежащие в основе медленного проведения и лентитной пейсмейкерной активности клеток этого узла, не были достаточно изучены из-за отсутствия подходящего метода фиксации потенциала. Маленькие образцы ткани АВ-узла или кластеры этих клеток способны дать более определенную информацию о его работе, чем традиционные плоские образцы этого узла, в которых невозможно дифференцировать свойства мембранного потенциала действия от свойств распространяющегося потенциала действия.

Практически все клетки центральной части АВ-узла оказалось возможно изучить традиционными методами фиксации потенциала. В клетках АВ-узла обнаружены кальциевые каналы, через которые проходят как ионы Na^+ , так и ионы Ca^{2+} .

Отличие результатов проведенных нами экспериментов от описанных ранее [36, 37, 38] обусловлено использованием разных размеров образцов. В области АВ-узла действительно имеются уловые клетки, характеризующиеся низким потенциалом покоя, небольшими размерами и наличием кальциевых каналов, а отличие между клетками центральной и переходной областей может быть лишь количественным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hoffman B. F., Cransfield P. F.* Electrophysiology of the heart. — Mont Kisco N. Y. Futura, 1960 (reprinted 1876).
2. *Matsuda K., Hoshi T., Kameyama S.* Action potential of the atrioventricular node (Tawara) Tohoku. — J. Exp. Med., 1958, vol. 68, p. 8.
3. *Tawara S.* Das Reizleitungssystem des Säugetierherzens. — Jena: Gustav Fischer, 1906.
4. *Noma A., Irisawa H.* Membrane current in the rabbit sinoatrial node cell as studied by the double microelectrode method. — Pflügers Arch., 1976, vol. 364, p. 45—52.
5. *Irisawa H.* Comparative physiology of the cardiac pacemaker mechanism. — Physiol. Rev., 1978, vol. 58, p. 461—498.
6. *Brown H. F.* Electrophysiology of the sinoatrial node. — Physiol. Rev., 1982, vol. 62, p. 505—530.
7. *Paes de Carvalho A., De Almeida D. F.* Spread of activity through the atrioventricular node. — Circulat. Res., 1960, vol. 8, p. 801—809.
8. *Akiyama T., Fozzard H. A.* Ca and Na selectivity of the active membrane of rabbit AV node cells. — Amer. J. Physiol., 1979, vol. 236, p. C1—C8.

9. Ruiz-Ceretti E., Ponce Zumino A. Action potential changes under varied $(Na)_o$ and $(Ca)_o$ indicating the existence of two inward currents in cells of the rabbit atrioventricular node. — *Circulat. Res.*, 1976, vol. 39, p. 326—336.
10. Zipes D. P., Mendez C. Action of manganese ions and tetrodotoxin on atrioventricular nodal transmembrane potentials in isolated rabbit hearts. — *Circulat. Res.*, 1973, vol. 32, p. 447—454.
11. Mendez C. The slow inward current and AV nodal propagation. — In: *The slow inward current and cardiac arrhythmias*/Ed. D. P. Zipes, J. C. Bailey, V. Elharrar. The Hague: Martinus Nijhoff, 1980, p. 285—294.
12. Hoffman B. F. The specialized tissues of the heart/Ed. A. Paes de Carvalho, W. C. De Mello, B. B. Hoffman. Amsterdam: Elsevier, 1961.
13. Shigeto N., Irisawa H. Slow conduction in the atrioventricular node of the cat: a possible explanation. — *Experientia*, 1972, vol. 28, p. 1442—1443.
14. Shigeto N., Irisawa H. Effect of polarization on the action potentials of the rabbit AV node cells. — *Jpn. J. Physiol.*, 1974, vol. 24, p. 605—616.
15. Kokubun S., Nishimura M., Noma A., Irisawa H. Membrane currents in the rabbit atrioventricular node cells. — *Pflügers Arch.*, 1982, vol. 393, p. 15—22.
16. Kurachi Y., Noma A., Irisawa H. Electrogenic sodium pump in rabbit atrio-ventricular node cell. — *Pflügers Arch.*, 1981, vol. 391, p. 261—266.
17. Kurachi Y., Noma A., Irisawa H. Electrogenic Na pump evidenced by injecting various Na salts into the isolated A-V node cells of rabbit heart. — *Pflügers Arch.*, 1981, vol. 392, p. 89—91.
18. Deck K. A., Kern R., Trautwein W. Voltage clamp technique in mammalian cardiac fibres. — *Pflügers Arch.*, 1964, vol. 280, p. 50—62.
19. Carmeliet E., Vereecke J. Electrogenesis of the action potential and automaticity. — In: *Handbook of Physiology*/Ed. R. M. Bern, N. Sperelakis, S. R. Geiger. Sect. 2: The cardiovascular system. Vol. 1: The heart. Bethesda MD: American Physiological Society, 1979, p. 269—334.
20. Noma A., Irisawa H., Kokubun S., Kotake H., et al. Slow current systems in the A-V node of the rabbit heart. — *Nature*, 1980, vol. 285, p. 228—229.
21. Brown H. F., Di Francesco D., Noble S. J. How does adrenaline accelerate the heart? — *Nature*, 1979, 280, p. 235—236.
22. Yanagihara K., Irisawa H. Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. — *Pflügers Arch.*, 1980, vol. 390, p. 11—19.
23. Maylie J., Morad M., Weiss J. A study of pace-maker potential in rabbit sino-atrial node: measurement of potassium activity under voltage-clamp conditions. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1981, vol. 311, p. 161—178.
24. Mendez C., Moe G. K. Atrioventricular transmission. — In: *Electrical phenomena in the heart*/Ed. W. C. De Mello. New York: Academic, 1977, p. 263—291.
25. Wit A. L., Cranefield P. F. Effect of verapamil on the sinoatrial and atrioventricular nodes of the rabbit and the mechanism by which it arrests reentrant atrioventricular nodal tachycardia. — *Circ. Res.*, 1974, vol. 35, p. 413—425.
26. Ponce Zumino A. Z., Parisi I. M., De Ceretti E. R. P. Effect of ischemia and low sodium medium on atrioventricular conduction. — *Am. J. Physiol.*, 1970, vol. 218, p. 1489—1494.
27. De Ceretti E., Ruiz P., Ponce Zumino A., Parisi I. M. Resolution of two components in the upstroke of the action potential in atrioventricular fibers of the rabbit heart. — *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1971, vol. 49, p. 642—648.
28. Irisawa H. Ionic currents underlying spontaneous rhythm of the cardiac primary pacemaker cells. In: *The sinus node*/Ed. F. I. M. Bonke. The Hague: Martinus Nijhoff, 1980, p. 368—375.
29. Kreitner D. Effects of polarization and inhibitors of ionic conductances on the action potentials of nodal and perinodal fibers in rabbit sinoatrial node. — In: *The sinus node*/Ed. F. I. M. Bonke. The Hague: Martinus Nijhoff, 1980, p. 270—278.

10. Kokubun S., Nishimura M., Noma A., Irisawa H. The spontaneous action potential of rabbit atrioventricular node cells. — Jpn. J. Physiol., 1980, 30, 529—540.
11. Wiggins J. R., Cranefield P. F. The effect of membrane potential and electrical activity of adding sodium to sodium-depleted cardiac Purkinje fibers. — J. Gen. Physiol., 1974, vol. 64, p. 473—493.
12. Morad M., Kurachi Y. Cs and Ba block the inward rectifier K channel from the outside site in single isolated ventricular cells. 1982 (in preparation).
13. Cleemann L., Morad M. Potassium currents in frog ventricular muscle: evidence from voltage clamp currents and extracellular K accumulation. — J. Physiol. (Lond.), 1979, vol. 283, p. 113—143.
14. Standen N. B., Stanfield P. R. A potential- and time-dependent blockade of inward rectification in frog skeletal muscle fibres by barium strontium ions. — J. Physiol. (Lond.), 1978, vol. 280, p. 169—191.
15. Taniguchi J., Kokubun S., Noma A., Irisawa H. Spontaneously active cells isolated from the sino-atrial and atrioventricular nodes of the rabbit heart. — Jpn. J. Physiol., 1981, vol. 31, p. 547—558.
16. Cranefield P., Hoffman B., Paes de Carvalho. Effect of acetylcholine on single fibers of the atrioventricular node. — Circ. Res., 1959, vol. 7, p. 19—23.
17. Cranefield P. F. The conduction of the cardiac impulse: the slow response and cardiac arrhythmias. Mount Kisco N. Y.: Futura, 1975.
18. Hoffman B. F. Neural influences on cardiac electrical activity and rhythm. —In: The neural regulation of the heart/Ed. W. C. Randall. New York: Oxford University, 1977, p. 291—312.

Глава 6

КАБЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА И ПРОВЕДЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ. ВОЗБУДИМОСТЬ, ИСТОЧНИКИ И СТОКИ

М. Ф. АРНСДОРФ (ARNSDORF M. F.)

ВВЕДЕНИЕ

Возбудимость сердца включает в себя понятие легкости, с которой миокардиальные клетки регенеративно деполяризуются и реполяризуются как в отдельном цикле, так и в последовательности сердечных циклов, с которой они взаимодействуют друг с другом и передают импульсы электрической активности как в нормальных, так и аномальных условиях. Сердечное сокращение является результатом высокоорганизованного управления потоками ионов через каналы мембран кардиомиоцитов, в миоплазме, в межклеточных контактах и в межклеточном пространстве. Эти биоэлектрические явления регулируются в очень строгих пределах, что обеспечивает координированное распространение возбуждения и сокращение сердца, необходимое для получения эффективного сердечного выброса. Заболевания сердца часто сопровождаются аномалиями регуляторного механизма.

Вопрос возбудимости сердца достаточно непрост и, по-видимому, все более усложняется. В 1962 г. Noble описал все происходящее на мембране кардиомиоцитов явления с помощью всего двух токов [1]. В самых современных обзорах [2, 3, 4, 5, 6] показано, что для этого необходимы по крайней мере два или три входящих тока и четыре или больше выходящих токов с многочисленными механизмами регуляции активных и пассивных свойств мембраны. Строго научное количественное теоретическое и экспериментальное описание возбудимости сердца оказалось трудной проблемой для исследователей и клиницистов.

В качестве первого приближения все определяющие возбудимость сердца факторы можно разбить на две обобщенные категории: пассивные и активные свойства мембраны. Пассивные свойства мембраны характеризуются пропорциональной реакцией на стимул, активные — непропорциональной. В число пассивных свойств мембраны входят факторы, определяющие потенциал покоя, такие как внутри- и внеклеточные активности ионов, ионные насосы, поддерживающие ионные градиенты за счет потребления энергии, а также линейные и нелинейные кабельные свойства мембраны. К активным свойствам мембраны, определяющим генерацию потенциала действия, относится предельная длина, т. е. мини-

малый объем ткани, который необходимо деполяризовать выше некоторого порога для преодоления реполяризующего влияния окружающих тканей, приводящего к носящей взрывной характер регенеративной деполяризации. Кроме того, к активным свойствам относятся зависящие от потенциала и от времени мембранные ионные проводимости, управляющие ионными токами, ответственными за нормальную и аномальную деполяризацию, реполяризацию и автоматизм. Активные свойства мембраны присущи только возбудимым клеткам. Распространение потенциала действия зависит как от пассивных, так и от активных свойств мембраны, определяющих потенциал покоя, подпороговые события, выполнение требований к предельной длине, регенеративную деполяризацию, регенеративную реполяризацию и автоматизм.

В данной главе мы рассмотрим кабельные свойства и распространение потенциала действия в связи с факторами, определяющими возбудимость сердца. Будет использован следующий подход: сначала выдвигается качественное утверждение, постулат, а затем анализ этого утверждения. Также будут обсуждены структурно-функциональные взаимосвязи, имеющие отношение к электрическим явлениям. Влияние кабельных свойств и факторов, определяющих проведение, будет продемонстрировано с помощью нескольких уравнений. Читателя не должно настораживать умеренное привлечение математики, так как уравнения будут использоваться качественно как исходные точки для обсуждения. В следующем разделе для обсуждения будут отобраны определенные общие принципы и некоторые необходимые упрощения. Наиболее требовательных читателей мы отсылаем к сборнику статей в Руководстве по физиологии [7] и в книге [8]. И наконец, в обсуждение будут включены экспериментальные работы по электрофизиологии, фармакологии и аритмогенезу для иллюстрации рассматриваемых принципов.

СТРУКТУРА И БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ЭКВИВАЛЕНТЫ

Клеточная мембрана: структура и функции

Постулат 1: Сердечное сокращение является результатом возникновения и высокоорганизованного контроля за биоэлектрическими процессами на мембране кардиомиоцитов, внутри клеток, между клетками и во внеклеточном пространстве.

Ультраструктура сердечной мышцы была исчерпывающе описана в работе [9], а молекулярная биология мембраны — в работе [10]. Сарколемма служит границей мышечного волокна и имеет несколько компонентов. Одним из них является плазматическая мембрана, или плазмолемма, имеющая толщину 6—9 нм, другим — гликокаликс, покрывающий клетку материал, дающий окраску на сахара и часто связанный с коллагеном, имеющим толщину 50 нм и более.

Плазматическая мембрана представляет собой тонкий липидный бислой, разделяющий водные фазы внутри и снаружи клеток. Фосфолипиды и некоторые другие компоненты липидного бислоя имеют гидрофобные участки, ориентированные внутрь липидной мембраны, и заряженные гидрофильные участки, которые ориентированы в сторону внутренней или внешней водной фазы. Количество гидрофильных групп (и средство к воде) может варьировать от одиночной гидроксильной группы, как у холестерина, до цвиттерийонных или заряженных групп глицерофосфатидов, и до сложных олигосахаридов гликофинголипидов. Такая амфифильность является характерной чертой мембранных липидов, и именно она в основном определяет их взаимодействие и ориентацию в мембране. Многие из этих липидных компонентов способны поляризоваться, так что мембрана может быть емкостью или конденсатором, т. е. запасать электрический заряд. Липидный бислой служит ограничивающим барьером для потока ионов и заряженных молекул, однако плазмолемма гораздо более проницаема для ионов и воды, чем можно было бы ожидать для такого бислоя. Предполагается, что такая проницаемость создается и контролируется специальными структурами. По-видимому, эти структуры могут быть двух типов: заполненные водой каналы или поры, проходящие через всю толщину мембраны, и белковые переносчики, либо выступающие с двух сторон мембраны, либо совершающие «челночные» движения с одной стороны мембраны к другой.

Постулат 2: Мембрану сердечной клетки можно промоделировать с помощью электрического аналога, содержащего резисторы и конденсаторы (V_m и C_m соответственно) (рис. 6.1, б). Были предложены модели разной степени сложности.

Таким образом, плазмолемма имеет как емкостные, так и резистивные элементы (рис. 6.1). Как показано на рисунке, ток, протекающий через любую единицу длины кабеля (например, i_m в элементе АВ), состоит из двух компонентов: емкостного тока (i_c) через конденсатор С и ионного тока (i_i) через сопротивление r_m .

$$i_m = i_c + i_i, \quad (6.1)$$

где i_m измеряется в А/см.

В действительности ситуация является более сложной. Уравнение (6.1) довольно хорошо описывает внешнюю мембрану плазмолеммы, по которой регенеративный потенциал действия распространяется на всю длину препарата. Во многих типах ткани миокарда млекопитающих потенциал действия распространяется внутри волокна по системе поперечных трубочек (Т-система). Именно в месте контактов между Т-системой и саркоплазматическим ретикулом (СР) происходит соединение внеклеточных и внутриклеточных мембранных систем. Участки мембраны, расположенные в этих внеклеточных щелях, вносят дополнительный вклад в сопротивление и емкость последовательно к тем, которыми обладает внешняя мембрана c_s и r_s в схеме электрического аналога (рис. 6.1, в). Несомненно, трехмерная геометрия миокарда дополнительно усложняет электрическую аналоговую схему структуры мембраны [8,

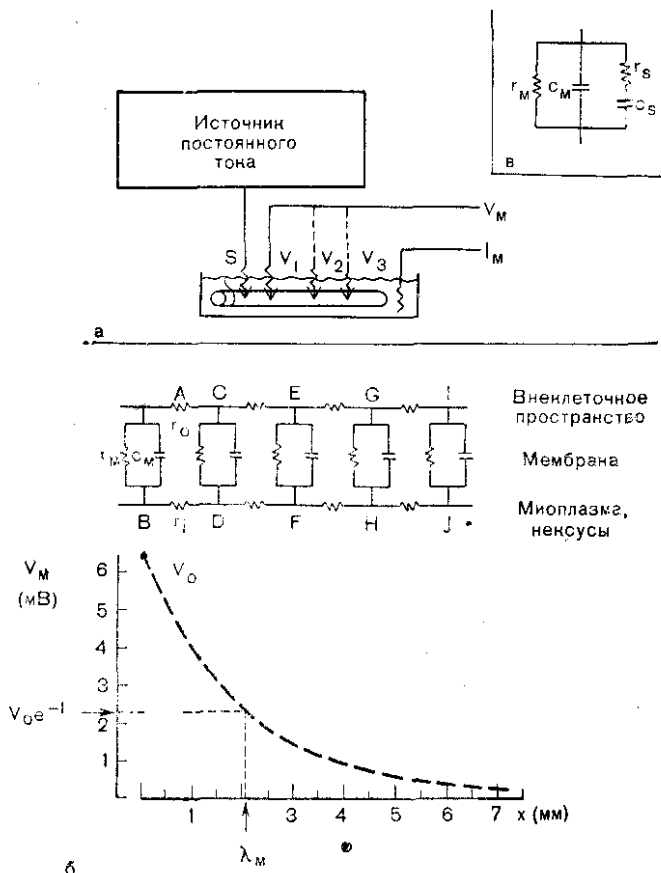


Рис. 6.1. Принципиальная схема эксперимента для проведения анализа кабельных свойств.

Постоянный ток подается внутрь клетки через микроэлектрод (S), введенный вблизи от перевязанного конца изолированного волокна Пуркинье. Реакция трансмембранного потенциала (V_M) регистрируется микроэлектродами в нескольких точках вдоль длины препарата (V_1, V_2, V_3 и т. д.). Измерение тока (I) осуществляется с помощью виртуального заземления перфузата; б — эквивалентная электрическая схема пассивных свойств мембраны, внеклеточного пространства, а также миоплазмы и нексусов, объединенных вместе. Ниже помещен график зависимости трансмембранного потенциала от расстояния до точки, в которую подается стимулирующий ток. Сокращения объяснены в тексте; в — более сложная эквивалентная схема, учитывающая последовательные сопротивление и емкость (r_s и c_s соответственно).

[12]. Тем не менее уравнение (6.1) дает полезное приближение, особенно когда за контроль принимают измерения, проведенные на том же препарате, и не производится существенных анатомических изменений.

Возвращаясь снова к уравнению (6.1), отметим, что i_c зависит от емкости единицы длины кабеля, c_m (Ф/см), и определяет скорость изменения трансмембранной разности потенциала (V_M). Это можно описать следующим образом:

$$i_c = c_m (\partial V_M / \partial t). \quad (6.2)$$

В соответствии с законом Ома ионный ток будет прямо пропорционален трансмембранной разности потенциалов (V_m) и обратно пропорционален сопротивлению мембраны для единицы длины канала, r_m (Ом·см). Поэтому:

$$i_i = V_m / r_m \quad (6.3)$$

и, комбинируя уравнения (6.1) — (6.3), получаем:

$$i_m = c_m (\partial V_m / \partial t) + (V_m / r_m). \quad (6.4)$$

Постулат 3: Мембрана сердечных клеток избирательно проницаема для различных ионов, проходящих через каналы, контролируемые воротами, открывающимися и закрывающимися в зависимости от потенциала и (или) времени. Изменение величины этих токов может быть описано в терминах мембранной проводимости и движущей силы. Движущая сила в свою очередь частично зависит от поддержания распределения ионов по обеим сторонам мембраны с помощью ионных насосов.

При описании биологических мембран чаще используют термин «проводимость мембраны» (g_m), чем сопротивление мембраны. Проводимость представляет собой величину, обратную сопротивлению (т. е. $g_m = 1/r_m$); она является показателем, насколько свободно ионы данного вида проникают через мембранные каналы. В общем поток ионов данного вида через мембранные каналы определяется проводимостью мембраны для этого вида ионов и движущей силой для них. Для данного вида ионов, допустим, у, движущая сила, является разностью между V_m и равновесным потенциалом (E_y), или:

$$i_y = g_y (V_m - E_y), \quad (6.5)$$

где ($V_m - E_y$) — движущая сила; g_y — проводимость.

Уравнения (6.3) и (6.5) предполагают наличие линейной или омической зависимости, но это не так. Проводимость может зависеть от напряжения, времени или же и от того, и от другого. Последние экспериментальные работы позволяют предположить, что это утверждение может быть справедливым для внутриклеточных активностей ионов [13, 14], частично определяющих равновесный потенциал. Энергозависимые ионные насосы определяют и поддерживают трансмембранные ионные градиенты и могут также влиять на V_m и равновесный потенциал. Последний, таким образом, зависит от активности ионов и от ионных насосов. Многие линейные и нелинейные свойства мембраны рассмотрены в обзоре [8] и в других главах этой книги.

Внутри клетки в состоянии покоя потенциал является отрицательным по отношению к внеклеточной среде, и клетка поляризована. Отрицательные заряды располагаются вдоль внутренней поверхности клеточной мембраны и уравновешены положительными зарядами на внешней поверхности мембраны. Когда внутрь клетки подается электрический ток, для изменения заряда на конденсаторе требуется некоторое время, так что V_m не изменяется мгновенно. Время, необходимое для того, чтобы V_m достиг определенной доли от своей конечной величины после включения или выключения тока, называется постоянной времени мембраны (τ_m): 84%

в длинной кабелеподобной структуре (см. уравнение (6.21) в [15], и также [16]) и 63% в коротких волокнах [16]. Из этого следует:

$$r_m = r_{mcm} \cdot \quad (6.6)$$

Межклеточные взаимодействия

Постулат 4: Клетки миокарда соединены между собой с помощью пексусов. В нормальных условиях пексусы имеют низкое сопротивление и практически не создают препятствия потоку ионов. Повреждение или другие факторы могут частично или полностью изолировать клетку от ее окружения. Продольное сопротивление в основном определяется пексусами, и на электрической эквивалентной схеме (рис. 6.1, б) они представлены резистором r .

В основном под влиянием работ немецких патологов, таких как Heidenhain [17], большинство исследователей рассматривают сердце как анатомический и электрический синцитий. Однако проведенные в 1954 г. электронно-микроскопические исследования [18] показали, что сердечные клетки ограничены мембраной и между ними нет прямого цитоплазматического контакта. Способ осуществления взаимодействия между клетками привлекает все большее внимание анатомов и электрофизиологов.

В 1952 г. Weidmann [19] исследовал электрофизиологические свойства проводящих сердечных миоцитов. Последние быстро проводят потенциал действия (0,5—5,0 м/с) и представляют собой тип клеток части проводящей системы между АВ-узлом и желудочками, которая включает в себя предсердно-желудочковый пучок, его ветви и ложные сухожилия, и терминальные ветви. Многие из волокон Пуркинье являются практически цилиндрическими и организованы в виде столбиков, имеющих диаметр, равный 2—3 диаметрам клеток. Эти столбики окружены соединительной тканью. Так как структурно они представляют собой цитоплазму, окруженную мембраной и соединительной тканью, и так как клетки соединены друг с другом, длинные волокна Пуркинье очень напоминают кабель. Weidmann подавал внутриклеточно через микроэлектрод деполяризующий или гиперполяризующий ток и другим микроэлектродом регистрировал V_m в различных точках по длине такого волокна Пуркинье. Он обнаружил постепенное падение V_m с увеличением расстояния от точки стимуляции, которое хорошо описывалось теорией однородного кабеля. Пример такой регистрации показан на рис. 6.2. Электротонический потенциал может быть зарегистрирован в нескольких миллиметрах от места подачи тока, указывая, что между стимулирующим и регистрирующим электродом располагается несколько клеток и что сопротивление потоку ионов структуры, ответственной за взаимодействие клеток между собой, должно быть низким. Более того, величина изменения V_m была практически линейно связана с амплитудой небольших подаваемых внутриклеточно импульсов деполяризующего или гиперполяризующего тока; этот факт свидетельствует скорее в

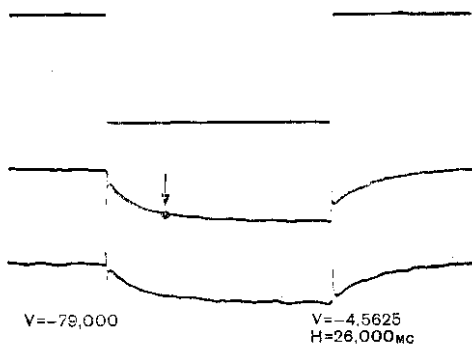


Рис. 6.2. Экспериментальные записи, полученные при исследовании кабельных свойств длинного волокна Пуркинье сердца овцы. Верхняя кривая — запись тока, нижние кривые — записи трансмембранного потенциала в различных точках вдоль волокна Пуркинье. Средняя запись получена в точке, расположенной к стимулирующему электроду ближе, чем нижняя запись, и видно отличие амплитуд изменений потенциалов. Обратите внимание на практически экспоненциальное изменение потенциала в ответ на прямо-

угольную ступеньку тока. Такая форма определяется сопротивлением и емкостью мембраны. Одной точкой отмечен уровень потенциала покоя непосредственно перед началом ступеньки тока, второй точкой (показана стрелкой) отмечен уровень потенциала, составляющий 84% от установившегося значения при пропускании тока. Внизу слева приведена величина потенциала покоя, внизу справа указаны координаты точки, отмеченной стрелкой, по отношению к точке, расположенной на записи потенциала перед началом ступеньки тока.

пользу низкоомной электрической связи, чем в пользу химической связи между клетками.

Позднее Weidmann исследовал диффузию ^{42}K в миокарде желудочка [20]. Теоретическое распределение ^{42}K было рассчитано в соответствии с кабельной теорией, и экспериментальные наблюдения хорошо соответствовали предположению, что ^{42}K свободно диффундирует между клетками, причем верхний предел для сопротивления между ними равен 3 Ом·см, почти в 700 раз меньше, чем для внешней поверхностной мембраны.

По-видимому, этими низкоомными структурами, ответственными за электрическое взаимодействие между клетками, являются нексусы, специальные мембранные структуры, через которые осуществляется внутриклеточное взаимодействие и транспорт небольших молекул и ионов между клетками [21, 22, 23]. Нексусы являются специализированной частью вставочных дисков, где мембраны соседних клеток сближаются до расстояния 30 нм и связаны гидрофильными каналами, соединяющими внутренние пространства соседних клеток. Геометрический массив субъединиц группируется вокруг центрального канала или поры, образуя коннексон, который выходит из миоплазмы, проникает через внутренний гидрофильный слой, гидрофобный липидный бислой и внешний гидрофильный слой мембраны и выступает в промежуток между клетками, где он встречается с коннексоном, выходящим из соседней клетки. Центральный канал этих коннексонов является непрерывным и соединяет внутренние пространства этих двух клеток. Несмотря на то что при электронно-микроскопическом исследовании все коннексоны выглядят одинаково, недавнее изучение изо-

лированных нексусов показало, что, хотя белковый состав коннексонов миокарда животных различных видов не различается, однако они отличаются от коннексонов печени или хрусталика [24, 25].

Ряд факторов, таких как увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция, уменьшение рН, некоторые метаболические яды и дигиталис, по-видимому, увеличивают сопротивление нексусов [21—23, 26, 27]. Интерес представляет способность сердца «заживлять повреждения», и имеющиеся данные позволяют предположить, что эта способность обусловлена скорее разобщением клеток вследствие увеличения сопротивления нексусов, а не образованием новых мембран [28—31]. Недавно было показано, что при ишемии изменяются геометрические характеристики нексусов [32]. Уменьшение электрического тока через нексусы может служить нескольким целям. Во-первых, происходит изоляция поврежденной клетки, предотвращается утечка содержимого соседних нормальных клеток через нексус в поврежденную клетку и далее в межклеточное пространство и, во-вторых, прекращается электрический ток, вызывающий аритмии. К другим следствиям электрического взаимодействия можно отнести емкостное сопряжение [33, 34], а также аккумуляцию и истощение ионов в ограниченном межклеточном пространстве [35].

Учитывая перечисленные факторы, отметим, что существует продольное или внутреннее сопротивление (r_1 на рис. 6.1), которое в основном определяется сопротивлением нексусов и в меньшей степени цитоплазматическими компонентами и, возможно, другими причинами. Кроме того, существует внеклеточное сопротивление (r_0 на рис. 6.1), которое в силу причин, обсуждаемых в следующем разделе, в нормальных тканях пренебрежимо мало. В тканях с малыми геометрическими размерами и в поврежденных тканях величиной r_0 уже нельзя пренебрегать, что также будет обсуждаться ниже.

КАБЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

Одномерная кабельная цепь

Постулат 5: Электрический аналог, показанный на рис. 6.1, напоминает телеграфный кабель тем, что сердечник с низким сопротивлением (миоплазма и нормальные нексусы с низким сопротивлением) окружен изолирующим слоем с относительно высоким сопротивлением (клеточная мембрана). Поэтому так называемые кабельные уравнения применимы для описания сердечных структур. Во многих случаях экспериментальные данные хорошо описываются кабельными уравнениями.

Кабельные свойства влияют на координацию электрической активности, проведение и возбудимость сердца в нормальных и аномальных условиях. Важная роль в этом пассивных электрических свойств и явилась причиной написания этой главы. Теперь мы можем экспериментально исследовать и количественно описывать многие пассивные свойства мембраны, имеющие отношение к возбудимости и проведению.

Многие врачи-электрокардиологи и некоторые электрофизиологи часто критически реагируют на вопрос о применении кабельных уравнений. Мы попытались уменьшить их скептицизм, насколько это возможно, отведя в предыдущих разделах довольно значительное место обсуждению структуры и биоэлектрических эквивалентов. Это должно подготовить читателя к более осмысленному подходу к этим уравнениям. Смысл и обозначения компонентов простого электрического аналога, приведенного на рис. 6.1, должны быть теперь в принципе понятны. В качестве первого приближения мы теперь проанализируем пассивные свойства мембран в терминах сопротивления мембраны (r_m), емкость мембраны (c_m), продольное или внутреннее сопротивление (r_i) и постоянная времени (τ_m).

Концепции и предположения. Предположим, что препарат напоминает линию связи, которая может быть описана как одномерный кабель, сопротивления и емкости в цепи которого расположены как показано на рис. 6.1. Предполагается, что клетка представляет собой столбик цитоплазмы с низким сопротивлением, окруженный внешней мембраной с высоким сопротивлением, клетки соединены между собой контактами с низким сопротивлением. Допускается также, что столбик имеет форму цилиндра, и мы пока не будем учитывать какие-либо неровности мембраны, особенности трехмерной структуры сердца и аккумуляцию или истощение ионов в межклеточных щелях ограниченного объема. Сделаны также другие упрощающие предположения: сопротивление мембраны и продольное сопротивление выбираются омическими и линейными для небольших изменений мембранного потенциала V_m , электрический ток, текущий в продольном направлении, однороден в пространстве, а радиальные токи пренебрежимо малы; емкость мембраны не допускает утечки и однородна, объем внешнего раствора достаточно большой, чтобы можно было пренебречь внешним сопротивлением (r_o).

КЛАССИЧЕСКОЕ КАБЕЛЬНОЕ УРАВНЕНИЕ: ОДНОМЕРНАЯ КАБЕЛЬНАЯ ЦЕПЬ

Постулат 6: Изоляция кабеля (мембрана) допускает утечку, и потеря тока через мембрану приводит к уменьшению тока, текущего в продольном направлении. На ток в продольном направлении в свою очередь влияют сопротивления цитоплазмы и нексусов. Цепь замыкается потоком ионов во внеклеточном пространстве.

В середине XIX века лорд Кельвин изучил причину ослабления сигнала, передаваемого по трансатлантическому телеграфному кабелю. Эта одномерная кабельная цепь включала в себя элементы, ответственные за внутреннее и внешнее сопротивление и за утечку тока через изоляцию. В своем классическом исследовании Hodgkin, Ruchton в 1946 г. [15] показали, что модифицированное кабельное уравнение довольно хорошо согласуется с экспериментальными наблюдениями на аксоне нервной клетки. Weidmann

в 1952 г. [19] применил теорию одномерного кабеля к проводящим сердечным миоцитам и обнаружил, что экспериментальные данные хорошо описываются кабельным уравнением. Основное уравнение в предположении, что r_0 пренебрежимо мало, имеет следующий вид:

$$i_m = \frac{1}{r_i} \cdot \frac{\partial^2 V_m}{\partial x^2} = \frac{V_m}{r_m} + c_m \frac{\partial V_m}{\partial t}, \quad (6.7)$$

где i_m — электрический ток через единицу длины мембраны; r_i — продольное сопротивление единицы длины внутреннего проводника или сердечника кабеля (Ом/см); V_m — трансмембранная разность потенциалов; r_m и c_m , определенные ранее, представляют собой сопротивление и емкость мембраны на единицу длины кабеля (Ом·см и Ф/см соответственно).

Это уравнение выглядит довольно громоздко, но его легко понять, если рассматривать в контексте описанных ранее структур и функций. Обратившись к рис. 6.1, заметим, что ток (i_i), текущий на данном участке внутреннего проводника клетки вправо, должен вернуться влево, пройдя через параллельный участок внешнего проводника. Сопротивления данного участка длины (x) внутреннего и внешнего проводников будут равны $r_i \Delta x$ и $r_0 \Delta x$ соответственно. Согласно закону Ома, разность потенциалов на каждом из этих сопротивлений (допустим, на сопротивлении r_i между элементами В и D на рис. 6.1) будет равна:

$$\Delta V_i = i_i \cdot r_i \cdot \Delta x. \quad (6.8)$$

Длина участка может постепенно уменьшаться, так что x приближается к нулю. Математически это записывается в виде:

$$\frac{\partial V_i}{\partial x} = \lim_{x \rightarrow 0} \frac{\Delta V_i}{\Delta x} = -i_i \cdot r_i. \quad (6.9)$$

Знак минус указывает на падение потенциала при прохождении тока через сопротивление.

Как уже было сказано, r_0 пренебрежимо мало вследствие большого объема внешнего раствора, тем не менее ток через него следует описывать так же, как и r_i . Так как r_0 пренебрежимо мало, V_m можно считать равным V_i из-за постоянства внеклеточного потенциала. По предположению ток во внеклеточном растворе также равен нулю. Следовательно, уравнение 6.9 можно представить в следующем виде:

$$\frac{\partial V_m}{\partial x} = -i_i \cdot r_i. \quad (6.10)$$

Клеточная мембрана имеет утечку, через которую теряется определенное количество тока ($-i_m$) на единицу длины кабеля (Δx). Из этого следует, что потеря тока через мембрану приведет к уменьшению величины тока, текущего в продольном направлении через сердечник. Изменение величины тока, проходящего в продольном направлении (Δi_i), можно описать следующим образом:

$$\Delta i_i = -i_m \Delta x. \quad (6.11)$$

В этом случае также длину участка мембраны можно брать все меньшей и меньшей. Вычислив предел при Δx , стремящемся к нулю, получим:

$$\frac{\partial i_i}{\partial x} = \lim_{x \rightarrow 0} \frac{\Delta i_i}{\Delta x} = -i_m \quad (6.12)$$

или, преобразуя,

$$i_m = -\frac{\partial i_i}{\partial x}. \quad (6.13)$$

Продифференцировав уравнение 6.10, получим:

$$\frac{\partial^2 V_M}{\partial x^2} = r_1 \cdot \left(\frac{\partial i_i}{\partial x} \right) \quad (6.14)$$

и, подставляя соотношение из уравнения (6.13), запишем:

$$\frac{\partial^2 V_M}{\partial x^2} = r_1 \cdot i_m. \quad (6.15)$$

Подставляя выражение для i_m из уравнения (6.4) и сделав преобразования, снова получаем кабельное уравнение (6.7):

$$i_m = \frac{1}{r_1} \cdot \frac{\partial^2 V_M}{\partial x^2} = \frac{V_M}{r_M} + c_M \frac{\partial V_M}{\partial t}. \quad (\text{см. 6.7})$$

КАБЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ, ОСНОВАННЫЙ НА ОДНОМЕРНОЙ КАБЕЛЬНОЙ ЦЕПИ

Постулат 7: Убедительность биофизической теории заключается в возможности экспериментальной проверки. Теория одномерного кабеля использовалась в качестве основы для анализа экспериментальных данных. Кабельные уравнения требуют некоторой модификации, чтобы учитывать величины, которые можно измерить экспериментально, которые могут быть выражены как электрический потенциал, расстояние или размер и время.

Уравнение (6.7) является фундаментальным уравнением одномерной линейной кабельной теории и служит основой для анализа свойств кабеля. Последний позволяет определить некоторые временные и пространственные константы: постоянную времени $\tau_M = r_M c_M$ [см. (6.6)] и постоянную длины, $\lambda_M = \sqrt{r_M / (r_1 + r_0)}$ или, если пренебречь r_0 , $\lambda_M = \sqrt{r_M / r_1}$. Постоянная длины — это такое расстояние, на котором V_M уменьшается до e^{-1} (около 37%) от своей величины в точке пропускания постоянного тока (см. рис. 6.1).

После того как мы ввели эти два определения, умножение уравнения (6.7) на r_M , подстановка и преобразование приводят его к следующему виду:

$$-\lambda_M^2 \left(\frac{\partial^2 V_M}{\partial x^2} \right) + \tau_M \left(\frac{\partial V_M}{\partial t} + V_M \right) = 0. \quad (6.16)$$

Уравнение (6.16) дает соотношение между V_M , x и t , которые допускают экспериментальную проверку. Для решения этого уравнения необходимо применение метода преобразования Лапласа и использование функции ошибок. Читателю, интересующемуся этим вопросом, мы рекомендуем работу [15]. Решение дает следующую

величину для трансмембранной разности потенциала в точке стимуляции (V_0) при длительном воздействии постоянным током (I_0):

$$V_0 = r_1 I_0 \lambda_M / 2. \quad (6.17)$$

Так как половина тока течет по кабелю в одном направлении, а половина — в другом, то введем знаменатель 2. Если ток подавать вблизи некоторого барьера с высоким сопротивлением, как например, обрезанный или перевязанный конец волокна Пуркинье, то величину потенциала не нужно делить на 2.

Довольно хорошо можно описать распределение трансмембранного потенциала вдоль кабеля при длительном пропускании постоянного тока внутрь клетки. Для V_x , определяемого как V_M в любой точке x по длине кабеля, его связь с V_0 определяется соотношением:

$$V_x = V_0 \cdot e^{-x/\lambda_M}. \quad (6.18)$$

Уравнение (6.18) означает, что величина V_x в точке, соответствующей постоянной длины, равна V_0/e . Падение потенциала происходит по экспоненциальному закону. Использование этого соотношения будет рассмотрено ниже.

Другое частное решение кабельного уравнения дает изменение потенциала в точке $x=0$ в зависимости от времени. Его можно описать следующим образом:

$$V_t = V_0 \cdot \operatorname{erf} \sqrt{t/\tau_M}. \quad (6.19)$$

Величина $\operatorname{erf}(1)$ составляет 0,84, так что через время, равное одной постоянной времени, величина V_M достигнет 84% от конечной величины потенциала, достигаемой при $t = \infty$. Применение этого соотношения также будет рассматриваться в следующем разделе.

Входное сопротивление (R_{bx}) описывает связь между величиной ступеньки тока и реакцией трансмембранного потенциала при точечной стимуляции.

$$R_{bx} = V_0 / I_0. \quad (6.20)$$

Учитывая, что $\lambda_M = \sqrt{r_M / r_1}$ и комбинируя (6.17) и (6.20), величину входного сопротивления можно выразить следующим образом:

$$R_{bx} = \frac{\sqrt{r_M / r_1}}{2}. \quad (6.21)$$

Введение геометрических параметров позволяет рассматривать удельное сопротивление и емкость мембраны, отнесенные к площади поверхности и площади поперечного сечения. При этом мы получаем:

$$R_M = 2\pi a r_M, \quad (6.22)$$

$$R_1 = \pi a^2 r_1, \quad (6.23)$$

$$C_M = c_M / 2\pi a, \quad (6.24)$$

где a — радиус кабеля, R_M — сопротивление 1 см² мембраны (Ом·см²), R_1 — внутриклеточное или продольное сопротивление в (Ом·см), C_M — емкость 1 см² мембраны (Ф/см²).

Впервые эти константы были экспериментально определены в волокнах Пуркинье сердца в классическом исследовании, проведенном Weidmann в 1952 г. [49]. Он также описал особые случаи, когда волокно заканчивается разветвлением, случай короткого замыкания или обрезанного конца волокна. Последний случай был особенно полезен для интерпретации данных, полученных методом фиксации потенциала в коротком фрагменте волокна Пуркинье [4, 16].

КАБЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ С ПОМОЩЬЮ ТЕОРИИ, ОПИСЫВАЮЩЕЙ ОДНОМЕРНУЮ КАБЕЛЬНУЮ ЦЕПЬ: ОГРАНИЧЕНИЯ

Постулат 8: Для того чтобы понять все возможности кабельного анализа, необходимо оценить ограничения области его применения. После определения таких ограничений этот метод можно использовать более аккуратно. В ряде очень важных и результативных экспериментов в физиологии и фармакологии использовали кабельный анализ, основанный на уравнениях для одномерной кабельной цепи.

Допущения, лежащие в основе одномерного кабельного анализа, рассмотренного в разделе «Концепции и допущения», не являются абсолютно точными, что ограничивает применение этого метода. Наиболее существенное отличие от упрощенной теории связано со сложной ультраструктурой миокарда. Неоднородность распределения заряда была замечена еще в ранних исследованиях, проведенных Weidmann на волокнах Пуркинье сердца некоторых видов копытных животных. В своем классическом исследовании [49] этот автор получил следующие величины для длинных волокон Пуркинье козленка: $R_1 \approx 100 \text{ Ом} \cdot \text{см}$; R_m — около $2000 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$; λ_m — около 2 мм ; τ_m — около 20 мс ; C_m — около 12 мкФ/см^2 . R_m сравнима с аналогичной величиной в нервном волокне, но оказалась несколько меньше, R_1 превышала сопротивление внеклеточного раствора, а величина C_m оказалась в 10 раз больше таковой в нерве. Weidmann предположил, что сделанные им геометрические допущения могут оказаться ошибочными. Позднее Mobley, Page [36] обнаружили, что мембрана поперечных Т-тубул составляет 80% от всей поверхностной мембраны, означая, что полная поверхность в 10—12 раз больше, чем предполагал Weidmann для простого цилиндра. Из этого следует, что C_m должна быть порядка 1 мкФ/см^2 , а R_m — около $20\,000 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$. Hellam, Studt [37] пришли к аналогичному выводу, и, согласно их расчетам, C_m была равна $0,9 \text{ мкФ/см}^2$. В 1966 г. Fozzard [38] обнаружил, что эквивалентная цепь мембраны должна содержать не только сопротивление и емкость, включенные параллельно, но также и некоторое сопротивление, включенное последовательно с емкостью (см. фрагмент б на рис. 6.1). Пучок волокон Пуркинье состоит из многих клеток, разделенных узкими межклеточными щелями [9, 36], и эти щели могут быть причиной возникновения последовательного сопротивления. Freygang, Trautwein [33] предположили, что вставочные дис-

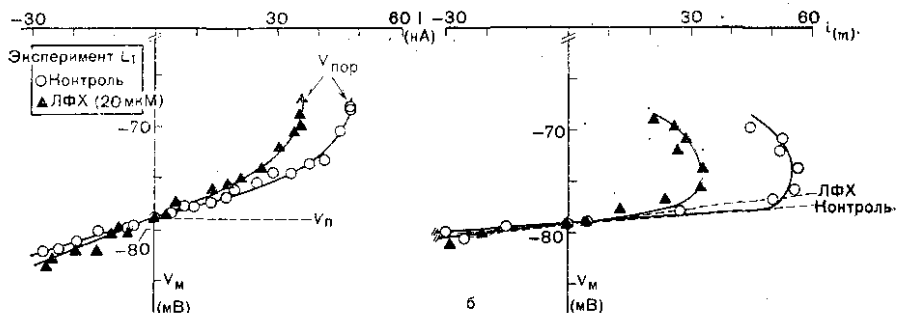


Рис. 6.3. Вольт-амперные зависимости, демонстрирующие нелинейную связь между током и потенциалом в подпороговом диапазоне. Получены в контроле и при действии лизофосфатидилхолина (ЛФХ) — токсического метаболита, появляющегося при ишемии.

а — зависимость I от V_M ; **б** — зависимость I_M от V_M , где I_M — плотность трансмембранного тока, полученная с помощью математических расчетов; $t=100$ мс. Тангенсы наклонов кривых (обозначены пунктирными линиями) дают оценку наклонной проводимости в данном случае в точке $I_M=0$, что эквивалентно хордовой проводимости. По [48].

ки могут обуславливать существование емкостного компонента в продольном направлении. Schoenberg и соавт. [39] использовали более сложную модель, основанную на данных, полученных Mølleu, Page для геометрии клеточной мембраны, и подробно обсудили различия в кабельных свойствах, зависящие от геометрических допущений. Эти исследователи определили, что внутренние мембраны пассивного волокна Пуркинье могут быть заряжены при пропускании тока через внешнюю поверхность волокна. Для волокна толщиной 100 μ м постоянная времени заряда составляет 1—2 мс, а постоянная длина для щелей при пропускании постоянного тока, по-видимому, — 100 μ м по порядку величины. Было бы разумно предположить, что скорость заряда внутренних мембран и величина постоянной длины по отношению к диаметру волокна являются причиной хорошего соответствия экспериментальных результатов с упрощенными теоретическими данными, за исключением особых случаев, например, при малой длительности стимулирующего импульса. В экспериментах по фиксации потенциала было подтверждено накопление ионов K^+ в межклеточных щелях и истощение их содержания в зависимости от условий [40, 41], но ошибки, вносимые такими эффектами, неясны. Влияние структуры миокардиального препарата будет также обсуждаться ниже, в разделе «Стоки: разрывы проведения», в котором будет введена концепция структурных и функциональных разрывов.

Как уже обсуждалось выше, сопротивление мембраны часто нельзя считать чисто омическим или линейным, за исключением случаев очень малых возмущений. Такое отсутствие линейности показано на рис. 6.3 и будет обсуждаться ниже. Следовательно, необходима разработка нелинейной теории (см. «Многомерные кабельные цепи и нелинейная теория»). Распределение плотности

тока вдоль волокна может быть однородным и неоднородным. Токи, текущие в радиальном направлении, могут быть пренебрежимо малы, а могут иметь и существенную величину. Необходима разработка теорий, которые учитывали бы двухмерные и трехмерные характеристики миокарда (см. «Многомерные кабельные цепи и нелинейная теория», «Источники, стоки и распространение» и «Фактор безопасности»).

Кабельный анализ с помощью теории, описывающей одномерную кабельную цепь: практическое применение. Несмотря на перечисленные выше ограничения, успешное использование такой упрощенной теории для описания экспериментальных данных было отмечено в ряде физиологических [16, 19, 20, 28, 38, 39, 42 и др.], фармакологических [43—47] и других исследований [48, 49].

Недавно мы заинтересовались действием лизофосфатидилхолина (ЛФХ) на электрические свойства проводящих сердечных миоцитов [48] и влиянием лидокаина на свойства мембраны, измененные под действием ЛФХ [49]. Причина такого интереса состоит в том, что ЛФХ накапливается в ишемическом миокарде, что не наблюдается в нормальной ткани, и влияет на электрофизиологические свойства. Было проведено строгое изучение роли ЛФХ и аналогичных ему соединений в развитии нарушений ритма, сопровождающих острую ишемию миокарда [50—52 и др.]. В предыдущем разделе приведено принципиальное описание основ и главные принципы математической обработки данных. В этом разделе будут описаны непосредственно эксперименты и способ их анализа.

Гиперполяризующий ток небольшой амплитуды подавали через стеклянный микроэлектрод, введенный внутрь клетки вблизи перерезанного конца длинного неветвящегося волокна Пуркинье. Такой подход позволил модифицировать (6.17), приведя его к форме, справедливой для однонаправленного прохождения тока:

$$V_0 = r_1 \cdot I_0 \lambda_m.$$

Радиус волокна был равен 80 мкм. Заземление перфузионной камеры осуществляли с помощью виртуальной земли, т. е. использовали операционный усилитель, выдающий на выходе потенциал, пропорциональный току, протекающему в цепи виртуальной земли (см. рис. 6.1, б). Такой трансмембранный ток обозначен I_0 и показан на верхней записи рис. 6.2. Его величина равна 45,4 нА. Длительность подаваемой внутрь клетки ступеньки тока составляет 100 мс. Этот ток вызывал изменения потенциалов V_m , регистрируемых микроэлектродами на расстоянии 300 мкм (средняя запись) и 900 мкм (нижняя запись) от стимулирующего микроэлектрода, равных 5,44 и 4,05 мВ соответственно. Величину V_m в этих и других точках вдоль волокна можно отложить в логарифмическом масштабе как функцию расстояния от стимулирующего микроэлектрода (x). В этом случае можно применить линейный регрессионный анализ и получить прямую, экстраполирующую величину V_0 при пересечении прямой с осью ординат ($x=0$); V_0 оказалась рав-

ной 6,30 мВ. λ_m определена как расстояние x , при котором $V_m = V_0/e$, и она равна 2,03 мм. λ_m — время, в течение которого V_m достигает 84% от установившегося значения, измеряемого ближайшим к стимулирующему микроэлектроду. Она равна 26,8 мс (показано стрелкой на рис. 6.2). Используя эти данные, можно рассчитать, что $R_{bx} = 139$ кОм (6.20); $R_m = 1771$ Ом·см² (6.22); $R_i = 215$ Ом·см (6.23); $C_m = 15,1$ мкФ/см² (6.24). В результате действия ЛФХ V_0 изменился до 8,4 мВ и λ_m до 2,47 мм. Это означает, что $R_{bx} = 186$ кОм; $R_m = 2883$ Ом·см²; $R_i = 236$ Ом·см; $C_m = 12,0$ мкФ/см², т. е. все сопротивления увеличились, а емкость изменилась мало.

Справедливость допущения о линейности (или омичности) вольтамперных зависимостей проиллюстрировала на рис. 6.3, где показано изменение потенциала, регистрируемого ближайшим к точке стимуляции микроэлектродом при подаче гиперполяризующего или деполяризующего тока внутрь клетки, на одном и том же препарате до и после действия ЛФХ [48]. Слева приведены ненормированные кривые, отражающие относительную линейность вблизи потенциала покоя и явную нелинейность по мере приближения к потенциалу порога регенеративной реполяризации ($V_{пор}$). Длинное волокно Пуркине можно рассматривать как бесконечный кабель и в этом случае использовать для миокардиальной ткани [45, 48, 50, 53] предположение Cole, Kurtis, выдвинутое в 1941 г. [53], что позволит, таким образом, оценить плотность тока (i_m), где i_m может быть аппроксимирована величиной $I \cdot (dI/dV_m)$. Ток I может быть непосредственно измерен, а dI/dV_m определяется из тангенса наклона кривой зависимости V_m от I (см. рис. 6.3, а). На рис. 6.3, б величина V_m представлена как функция I_m . Такой расчет позволяет математически корректировать влияние кабельных свойств, стремящихся сгладить вольтамперные зависимости, и позволяет лучше аппроксимировать случай однородной деполяризации мембраны, при котором эта зависимость мембраны оказывается более крутой. Отрицательный наклон кривых на рис. 6.3, б может отражать внутрь направленное выпрямление, хотя не исключено, что по мере приближения к порогу увеличивается вклад входящих токов. Можно оценить наклонную проводимость мембраны (G_m), исходя из соотношения $G_m \approx dI/dV_m$ (см. рис. 6.3, а) или $G_m \approx di_m/dV_m$ (см. рис. 6.3, б). Как показано на рис. 6.3, а, в данном эксперименте ЛФХ не влиял ни на потенциал покоя (V_n), ни на пороговый потенциал ($V_{пор}$). На обоих фрагментах кривая, полученная при действии ЛФХ, имеет большую крутизну и оказывается смещенной влево при деполяризующих токах, приводя к пересечению этих двух кривых. Это приводит к тому, что при действии ЛФХ гиперполяризующий ток данной величины вызывает большое изменение V_m , что отражает снижение наклонной проводимости или увеличение обратной ей величины — наклонного сопротивления. Вольтамперные зависимости, полученные в контроле и при действии ЛФХ, хорошо аппроксимируются идентичными кривыми, что свидетельствует о незначительном влиянии ЛФХ на нелинейность вольтамперной зависимости.

Многомерные кабельные цепи и нелинейная теория

Постулат 9: Действительность требует использования нелинейной теории в трех измерениях. Такая математическая задача является трудно-разрешимой, а аналитический подход — громоздким. Преимущество упрощенной линейной одномерной модели заключается в легкости вычислений, но при этом происходит потеря части информации и точности. Компьютерные методы позволяют применять более сложные модели для анализа экспериментальных данных.

Несомненно, одномерные кабельные цепи и линейная теория были полезны для анализа данных, полученных в строго контролируемых экспериментальных условиях. Однако очевидно, что препарат имеет три измерения и что вольтамперные зависимости нелинейны. Возникает проблема разработки математической и аналитической теорий, пригодных для описания экспериментальных данных, полученных на двух- или трехмерном препарате. Подробное рассмотрение различных подходов выходит за рамки этой главы. Читателям, интересующимся этим вопросом, мы рекомендуем ознакомиться с [8]. Однако можно сделать еще несколько замечаний.

Боле 20 лет назад Woodbury, Grill [54] опубликовали наблюдение о том, что распределение электротонического потенциала при точечном источнике тока в двухмерном слое клеток не совпадает с экспоненциальным спадом, предполагаемым по одномерной кабельной теории, а скорее согласуется с функцией Бесселя. Эти авторы также обнаружили, что спад потенциала в клетках ткани предсердия крысы происходит значительно резче в направлении, перпендикулярном оси волокна, чем вдоль продольной оси, хотя оба распределения хорошо описываются функцией Бесселя. Spegelakis, McDonald [55] изучали сопротивление большой массы миокардиальной ткани и обнаружили, что продольное сопротивление значительно меньше поперечного. Результаты этих и других исследований позволили предположить, что внутренние контакты и сопротивление нексусов имеют важное значение для электротонического распространения тока и определяют входное сопротивление. Направление также должно влиять и действительно влияет на скорость проведения, что будет обсуждаться в этой главе ниже, в частности в разделах «Стоки, источники и распространение» и «Фактор безопасности».

АКТИВНЫЕ СВОЙСТВА МЕМБРАНЫ И ВОЗБУЖДЕНИЕ

Порог, пороговая длина и зависимости интенсивность — длительность и заряд — длительность

Постулат 10: При определенных условиях в возбудимых клетках стимул вызывает регенеративный ответ. Эти условия описываются с помощью терминов: «порог», «пороговый ток», «заряд» и «пороговая длина». Концепция пороговой длины указывает на важную роль пассивных свойств мембраны в возбудимости миокарда.

Мы рассмотрели пассивные свойства мембраны, изучаемые в условиях, когда пропускание тока вызывает пропорциональное изменение потенциала на мембране. Однако при достижении некоторого потенциала реакция возбудимой клетки становится регенеративной и ее величина уже непропорциональна величине стимула. Такой потенциал часто называют пороговым потенциалом: или просто порогом. Но при таком подходе концепция порога оказывается сильно упрощенной, так как в действительности он в данном волокне зависит от ряда дополнительных факторов.

Lapicque в 1907 г. [56] обнаружил, что ток, необходимый для достижения порога в нервном волокне, по амплитуде больше при коротких стимулах, чем при длинных. Минимальную амплитуду тока, способного вызвать регенеративный ответ независимо от продолжительности стимуляции, называют реобазой. Зависимость интенсивности порогового тока от длительности была описана Lapicque как:

$$I_{\text{пор}} = I_{\text{реоб}} / (1 - e^{-t/\tau}), \quad (6.25)$$

где $I_{\text{пор}}$ — амплитуда тока, необходимая для возникновения регенеративного ответа; $I_{\text{реоб}}$ — реобаза; t — длительность, приблизительно равная постоянной времени мембраны. Полученные данные позволили предположить, что пороговый заряд, равный $I_{\text{реоб}} \cdot t$, относительно постоянен, и зависимость интенсивность — длительность может быть объяснена с помощью простой RC-цепи при условии постоянства порога.

Однако Hodgkin, Huxley [57] обнаружили, что понятие порога является довольно сложным даже для нервного волокна. Оказалось необходимым описание натриевой проводимости с помощью параметров активации и инактивации, зависящих от потенциала и времени (см. следующий раздел). Noble, Stein [58], Cooley, Dodge [59] и другие исследователи пришли к выводу, что порог достигается в такой ситуации, когда входящий деполяризующий ток равен выходящему гиперполяризующему току, причем кинетика первого из них быстрее, чем второго.

Dominguez, Fozzard [42] применили метод внутриклеточного пропускания тока и регистрации внутриклеточных потенциалов для изучения зависимости интенсивность — длительность в проводящих сердечных миоцитах овцы. Они обнаружили, что постоянная времени кривой интенсивность — длительность значительно меньше, чем постоянная времени мембраны. Более того, они обнаружили, что потенциал, определяемый в качестве порогового, изменяется с изменением длительности стимула. Fozzard, Schoenberg [16] изучили зависимость интенсивность — длительность в коротких и в длинных волокнах Пуркинье и пришли к выводу, что характеристики этой зависимости, описанные Dominguez, Fozzard, являются следствием кабельных свойств волокон Пуркинье. Для объяснения результатов, полученных на коротких и длинных волокнах, они использовали понятие «пороговая длина», предложенное впервые Rushton [60] для нервов. Для одномерного кабеля пороговой длиной называется такая длина препарата, потенциал которой необ-

ходимо поднять выше порогового для того, чтобы входящие деполяризующие токи, возникающие в этом участке, превосходили реполяризующее влияние окружающих тканей. В силу описанных выше причин, при точечной стимуляции возбуждение труднее вызвать в трехмерной ткани, чем в плоской, а в плоской труднее, чем в обычной кабеле. Сложные расчеты пороговой длины и зависимости интенсивности — длительности на основе понятия пороговой длины можно найти в работе [16]. В этом разделе целесообразнее просто привести соответствующее уравнение, так как оно позволяет показать, что влияет на пороговую длину и достижение порога в миокардиальной ткани:

$$\text{Пороговая длина} = \frac{0,855Q_{\text{пор}}}{2\pi^{3/2}aC_M\lambda_M V_{\text{пор}}}, \quad (6.26)$$

где $Q_{\text{пор}}$ — пороговый заряд; a — радиус волокна; другие обозначения те же, что и в приведенных выше уравнениях. Этот результат показывает, что кабельные свойства имеют значение не только при описании поведения пассивной клетки, но и в значительной степени определяют те условия, при которых может возникать регенеративная деполяризация.

Быстрый и медленный ответы

Постулат 11: В некоторых миокардиальных тканях, как например, в ткани предсердий, в тканях проводящей системы и в ткани рабочего миокарда желудочков, фаза 0, или регенеративная деполяризация, зависит от быстрого натриевого тока (I_{Na}). В других тканях, таких как SA- и АВ-узлы, фаза 0 потенциала действия в норме зависит от медленного входящего тока (I_{Si}). Эти ткани соответственно называются тканями с «быстрым ответом» и «медленным ответом». Их характеристики суммированы в табл. 6.1.

Характеристики таких ответов более подробно описаны в других главах этой книги, а также в ряде последних обзоров [2, 5, 61, 62 и др.]. Регенеративный потенциал действия в некоторых тканях зависит от внезапного входа ионов натрия (I_{Na}) по каналам, обладающим быстрой кинетикой и блокируемыми тетродотоксином (ТТХ), в то время как в других тканях он зависит от развития смешанного $Ca^{2+}-Na^{+}$ -тока (медленного входящего тока, i_{Si} через канал, с более медленной кинетикой и практически не блокирующийся ТТХ, по который может быть блокирован такими соединениями, как Д-600 и верапамил. Первый из этих потенциалов действия называется «быстрым ответом», второй — «медленным». Электрофизиологические свойства тканей, потенциалы действия которых являются быстрым или медленным ответом, приведены в табл. 6.1.

ТКАНИ С БЫСТРЫМ ОТВЕТОМ

Постулат 12: В волокне, потенциал действия которого зависит от I_{Na} , смещение V_M в сторону более положительных потенциалов от нормального потенциала покоя приводит к уменьшению I_{Na} по нескольким механизмам. К ним относятся уменьшение движущей силы ($V_M - E_{Na}$ меньше пор-

Таблица 6.1. Характеристики миокардиальной ткани с «быстрым» и «медленным» ответом

	Ткани с «быстрым» ответом	Ткани с «медленным» ответом
Пассивные свойства мембраны		
Нормальный потенциал покоя (V_p)	Приблизительно от -80 до -90 мВ	Приблизительно от -40 до -65 мВ
Проводимость мембраны в подпороговом диапазоне	Калиевая проводимость, в частности g_{K1}	По-видимому, некоторые виды g_K
Активные свойства мембраны		
Пороговый потенциал ($V_{пор}$)	Приблизительно от -60 до -75 мВ	Приблизительно от -40 до -60 мВ
Ток, ответственный за развитие фазы 0	I_{Na}	I_{s1} (смешанный ток, переносимый ионами Ca^{2+} и Na^+)
Кинетика активации и инактивации канала, ответственного за фазу 0 или быструю деполяризацию	Быстрая	Медленная
Максимальная скорость нарастания потенциала действия (\dot{V}_{max})	300—1000 В/с	1—50 В/с
Максимальный овершут	Приблизительно от $+20$ до $+40$ мВ	От -5 до $+20$ мВ
Общая амплитуда потенциала действия	Приблизительно $+90$ — $+135$ мВ	Приблизительно $+30$ — $+70$ мВ
Рефрактерность и реактивация	Частичная реактивация в течение фазы 3, полная реактивация в нормальной ткани через 40—50 мс после возврата к V_p	Частичная и полная реактивация наступает после возврата к V_p (>100 мс)
Скорость проведения	0,5—5 м/с	0,01—0,1 м/с
Условия, приводящие к редирекции	Только при инактивации натриевых каналов	Возможна даже в нормальной ткани
Автоматизм	Да	Да
Автоматизм угнетается при повышении $[K^+]_o$ в физиологическом диапазоне	Да	Нет
Расположение в миокарде	Рабочий и специализированный миокард предсердий, специализированная проводящая система (волокна Пуркинье), миокард желудочков	СА- и АВ-узлы, возможно клапаны, коронарный синус, поврежденная ткань, в которой фаза 0 определяется уже не I_{Na} , а I_{s1} .

мы), снижение максимальной натриевой проводимости, закрытие части инактивационных ворот, а также изменение других характеристик, как например, кабельных свойств и пороговой длины.

Ткани с быстрым ответом, зависящим от I_{Na} , выявлены в предсердии, в волокнах Пуркинье специализированной проводящей системы и в рабочем миокарде желудочков. Потенциал покоя (V_p) в норме находится в пределах от -80 до -95 мВ. Поведение натриевой тока достаточно хорошо описывается уравнениями Ходжкина — Хаксли, в которые входят параметры активации и инактивации, зависящие от времени и потенциала. Для более удобного описания регуляции натриевого тока в терминах проводимости и движущей силы полезно модифицировать уравнение (6.5). Для первого волокна Hodgkin, Huxley [57] использовали следующее соотношение:

$$i_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h (V_m - E_{Na}), \quad (6.27)$$

где i_{Na} — плотность натриевого тока на единицу площади мембраны; \bar{g}_{Na} — максимальная натриевая проводимость; m и h — безразмерные параметры активации и инактивации, которые, как будет сказано ниже, можно представить как активационные и инактивационные ворота соответственно; E_{Na} — равновесный потенциал для ионов Na^+ . Для сердечной мышцы было предложено несколько модификаций этого уравнения [63].

В качестве первого приближения уравнение (6.27) описывает натриевую проводимость как функцию двух переменных, зависящих от потенциала. Параметр активации (m) с быстрой кинетикой можно представить себе в виде ворот, включающих ток, а параметр инактивации (h) с более медленной кинетикой — как ворота, выключающие ионный ток. При деполяризации m -ворота открываются, а h -ворота закрываются, но кинетика m -ворот является более быстрой, чем кинетика h -ворот. Если деполяризация волокна происходит достаточно быстро, то при достижении порога m -ворот быстро открываются и ионы Na^+ устремляются внутрь клетки, что приводит к развитию быстрого нарастания (фаза 0) потенциала действия. Максимальная скорость нарастания фазы 0 потенциала действия часто обозначают как \dot{V}_{\max} , и ее нормальная величина находится в диапазоне $200-1000$ В/с. \dot{V}_{\max} изменяется в сторону E_{Na} , равного $+40$ мВ. h -ворота имеют более медленную кинетику, поэтому при быстрой деполяризации они закрываются очень медленно и незначительно влияют на поступление ионов Na^+ через мембрану при пороговом потенциале. Однако после достижения максимума потенциала действия и в течение фазы плато существует достаточно времени для полного закрытия h -ворот. При этом система натриевого канала инактивируется независимо от состояния m -ворот. Такая инактивация является причиной существования рефрактерного периода, который может быть абсолютным или относительным. Если ткань деполяризована в результате повреждения, гиперкалиемии или вследствие некоторой другой причины, то h -ворота могут быть частично закрыты, что приводит к частичной инактивации натриевых каналов. Если мембрану деполяризо-

нить постоянным или медленно нарастающим током, то при этом будет достаточно времени для закрывания h-ворот, и натриевые каналы частично или полностью инактивируются. Этот тип потенциалозависимой инактивации системы натриевых каналов называется «каккомодацией». Биологическими эквивалентами постоянного или медленно нарастающего тока могут быть токи повреждения и токи, ответственные за медленную диастолическую деполяризацию пейсмекерных клеток. Это в свою очередь влияет на скорость проведения, как будет показано ниже. При помощи ранее существовавших методов было трудно непосредственно регистрировать I_{Na} , поэтому часто в качестве меры натриевой проводимости использовали величину \dot{V}_{\max} (что будет обсуждаться в разделе «Источник»). Однако в последнее время использование одноклеточных препаратов или препаратов малых размеров позволило осуществлять прямую регистрацию натриевого тока [64—67].

Постулат 13: Процесс реполяризации в ткани с быстрым ответом зависит от баланса между несколькими токами.

Реполяризация в тканях с быстрым ответом является регенеративным процессом. Фаза 1 зависит от инактивации g_{Na} и, по крайней мере в волокнах Пуркинье, от инактивации входа отрицательно заряженных ионов. В течение фазы 2 происходит увеличение входящего смешанного Ca^{2+} , Na^{+} -тока (I_{si}) вследствие того, что потенциал мембраны положителен. Так как I_{si} является входящим током, переносимым положительными ионами, он оказывает деполяризующее действие и способствует поддержанию плато. Калиевая проводимость уменьшается и проявляется эффект выпрямления, т. е. ионы K^{+} легче проникают в клетку, чем освобождаются из нее. Этот механизм также способствует поддержанию фазы плато. Развитие реполяризации (фазы 3 потенциала действия), представляющее собой быстрый возврат потенциала на мембране к потенциалу покоя, является следствием инактивации I_{si} , исчезновения явления внутрь направленного выпрямления и активации реполяризующих выходящих калиевых токов. По-видимому, существует некоторый «порог», находящийся в волокнах Пуркинье около -30 мВ, при котором начинается развитие фазы 3. В течение этой фазы происходит реактивация значительной части натриевых каналов, так что с помощью электрической стимуляции можно вызвать следующий потенциал действия. Как будет показано ниже, нарушение нормального процесса реполяризации влияет на возбудимость и распространение.

Другие характеристики ткани с быстрым ответом приведены в табл. 6.1.

ТКАНИ С МЕДЛЕННЫМ ОТВЕТОМ

Постулат 14: Фаза 0 потенциала действия ткани с медленным ответом зависит от I_{si} и потенциал покоя в клетках такой ткани менее отрицателен по сравнению с таковым у ткани с быстрым ответом. Кроме того, для такой ткани характерна меньшая величина \dot{V}_{\max} , меньшая скорость проведения, а процесс реактивации зависит от времени (см. табл. 6.1).

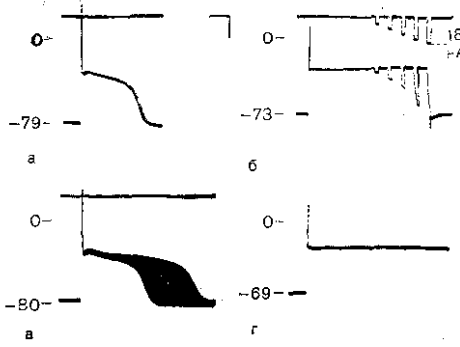


Рис. 6.4. Два устойчивых состояния мембраны, возникающие при действии ЛФХ, при которых не проявляется спонтанная активность. Также показана нормализация потенциала действия под влиянием лидокаина. Калибровка по вертикали — 2 мВ, по горизонтали — 100 мс.

а — запись в контроле; длительность потенциала действия 290 мс. Потенциал покоя (V_p) равен -79 мВ; б — через 30 мин действия ЛФХ возникают два устойчивых состояния; одно достигается при потенциале -73 мВ, что немного более положительно, чем V_p ; другое — при потенциале плато. Внутривенное пропускание гиперполяризующего тока ($t=100$ мс) возрастающей амплитуды

приводит к достижению «порога» реполяризации при величине тока 18 нА, и мембранный потенциал возвращается к V_p . Если не гиперполяризовать мембрану с помощью пропускания тока, то она будет находиться при потенциале плато бесконечно долго; в — добавление в перфузат лидокаина приводит к исчезновению второго устойчивого состояния и постепенному уменьшению длительности потенциала действия, которая возвращается к своему нормальному значению (300 мс), а V_p становится более отрицательным (-80 мВ). Гиперполяризация скорее всего является следствием увеличения калиевой проводимости мембраны; г — отмывание лидокаина при постоянной перфузии препарата раствором с ЛФХ снова приводит к возникновению двух устойчивых состояний. Обратите внимание, что V_p также становится менее отрицательным (Sawicki, Arnsdorf, неопубликованные данные).

В СА- и АВ-узлах фаза 0 деполяризации зависит не от I_{Na} , а от медленного входящего тока I_{si} . Как уже было сказано, такой смешанный $Ca^{2+} - Na^{+}$ -ток проходит через каналы, на которые мало влияют такие блокаторы быстрого натриевого канала, как ТТХ, и кинетика которых медленнее кинетики натриевых каналов. Потенциал покоя волокон с медленным ответом менее отрицателен и лежит около -60 мВ. При таком потенциале система натриевых каналов практически полностью инактивирована. Реактивация I_{si} зависит от времени и в реальных условиях захватывает часть фазы диастолы.

Это свойство играет существенную роль в уменьшении количества импульсов, которое может пропустить АВ-узел, что защищает желудочки при фибрилляции и трепетании предсердий.

Если в ткани, потенциал действия которой в норме зависит от I_{Na} , система натриевых каналов инактивирована либо вследствие деполяризации клетки в состоянии покоя, либо в результате нарушения нормального процесса реполяризации, то в такой ткани могут развиваться потенциалы действия, зависящие от I_{si} . Впечатляющий пример такого явления, возникающего при нарушении нормального процесса реполяризации, показан на рис. 6.4 [49]. Другие характеристики тканей с медленным ответом приведены в табл. 6.1.

Практические следствия

Постулат 15: С практической точки зрения изменение возбудимости может быть следствием сложных изменений пассивных и активных свойств мембраны, определяющих возбудимость.

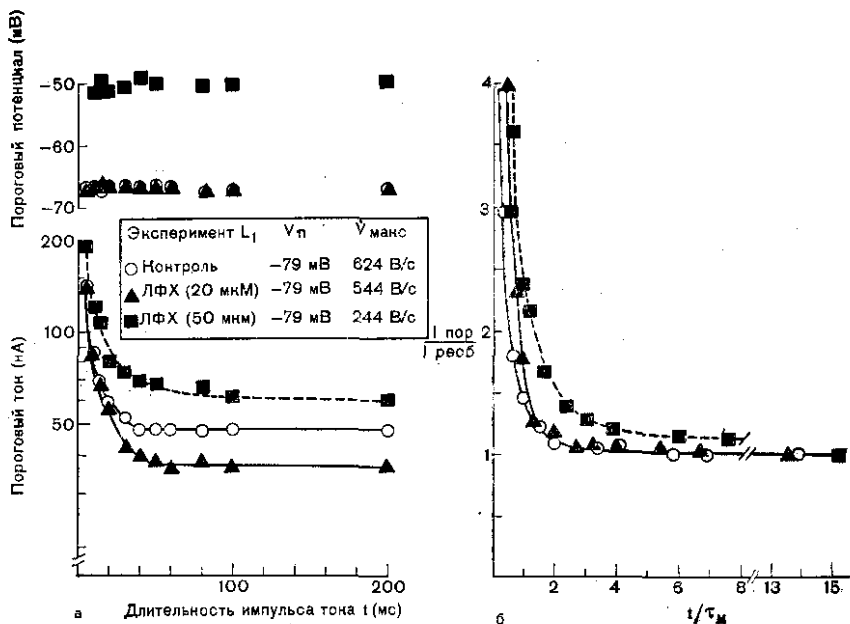


Рис. 6.5. Ненормированные (а) и нормированные (б) кривые интенсивность — длительность в контроле и при действии ЛФХ на волокно Пуркинье. По [48].

На рис. 6.5 и 6.6 показаны зависимости интенсивность — длительность, полученные нами в последних исследованиях действия ЛФХ. Использован тот же экспериментальный препарат, результаты для которого были приведены на предыдущих рисунках. На рис. 6.5, а показаны три кривые зависимости интенсивность — длительность: контроль (светлые кружки) и при действии ЛФХ в концентрации 20 мкМ (темные треугольники) и 45 мкМ (темные квадраты). По сравнению с контролем ненормированные кривые интенсивность — длительность при действии низкой концентрации ЛФХ сдвигаются вниз, указывая на то, что для достижения порога требуется меньшая интенсивность тока при любой его длительности, т. е. в классическом смысле это означает увеличение возбудимости. Эти две кривые сходятся вместе при длительности стимула, составляющей меньше 60 мс. Интересно отметить, что $\dot{V}_{\text{макс}}$ снижается с 624 до 544 В/с без существенного изменения потенциала покоя ($\dot{V}_п$) или порогового потенциала ($V_{\text{пор}}$) (см. вставку на рис. 6.5). Следовательно, возбудимость увеличивается, несмотря на угнетение системы натриевых каналов, что отражается уменьшением $\dot{V}_{\text{макс}}$. Это свидетельствует о том, что в этом случае снижение требований к интенсивности тока связано скорее с изменением пассивных, а не активных свойств мембраны. Нормировку кривых интенсивности — длительности осуществляли путем деления порогового тока на величину реобазы, а длительности стимулирующего

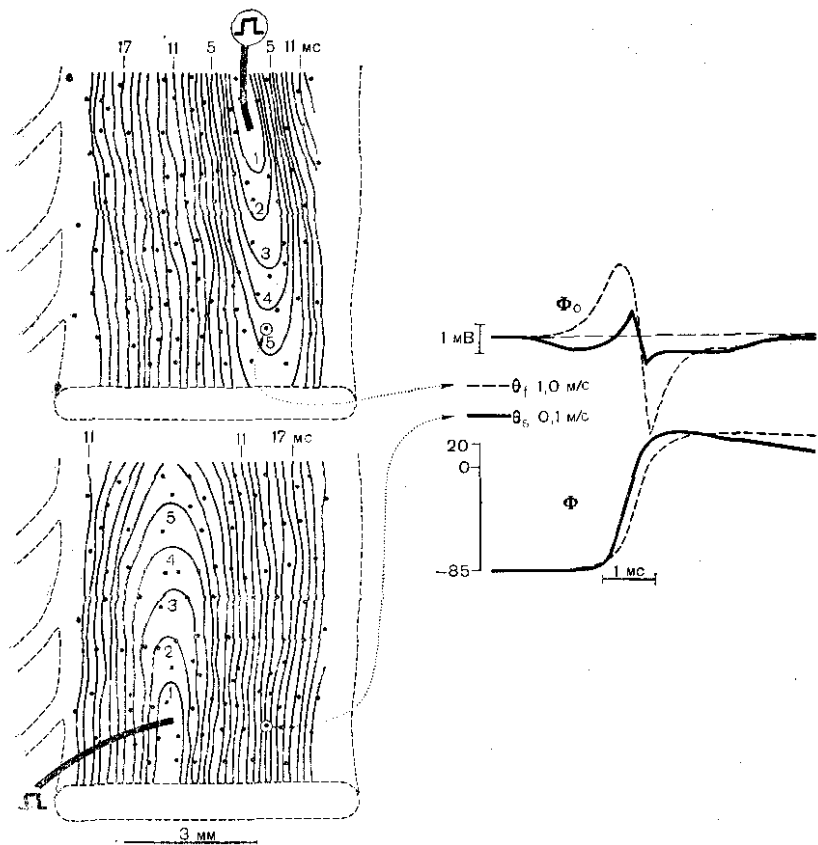


Рис. 6.6. Влияние направления на распространение потенциала действия в терминальном гребне. Точка стимуляции отмечена прямоугольной ступенькой, места внеклеточных регистраций потенциала обозначены точками. Внутриклеточные (Φ) и внеклеточные (Φ_0) записи потенциала, показанные справа, были зарегистрированы в местах, обозначенных кружками, при распространении возбуждения в продольном направлении (слева вверху) и в поперечном (слева внизу). На основании внеклеточных регистраций были построены карты изоخرон, причем в качестве момента возбуждения в данной точке принят момент достижения, когда производная достигает минимального значения. Скорость проведения рассчитывали, исходя из расстояния, проходимого волной возбуждения по нормали к изохронам за единицу времени. Обратите внимание, что скорость проведения ниже в поперечном направлении (Q_2), в то время как \dot{V}_{\max} имеет большую амплитуду, а t_{tot} короче, чем аналогичные величины, рассчитанные для более быстрого проведения в продольном направлении (Q_1). По [83].

импульса тока — на постоянную времени. Нормированные кривые интенсивность — длительность показаны на рис. 6.5, 6. Обратите внимание, что кривые, полученные в контроле и при действии ЛФХ (20 мкМ), практически совпадают для величин, больших или равных 1,25, и расходятся при меньших значениях. Нормировка уменьшает различия в форме кривых, являющихся следствием из-

менения пассивных кабельных свойств, но не маскирует и даже подчеркивает различия, связанные с изменением активных свойств генератора тока мембраны. Основываясь на кривых, можно также предположить, что повышение возбудимости обусловлено в основном изменением пассивных, а не активных свойств, несмотря на уменьшение $V_{\text{макс}}$ распространяющегося потенциала действия. Был проведен анализ кабельных свойств и построены вольтамперные зависимости на основе данных, полученных на этом препарате. В этом эксперименте наблюдалось увеличение R_m , которое сначала повышалось под действием 10 мкМ ЛФХ и начало уменьшаться вследствие увеличения R_i , а на вольтамперной зависимости было обнаружено увеличение хордовой и наклонной проводимости в подпороговом диапазоне (см. рис. 6.3). Все эти наблюдения являются следствием изменения пассивных свойств мембраны и свидетельствуют о том, что для достижения порога требуется меньшая интенсивность тока, несмотря на некоторое угнетение системы натриевых каналов.

При более высоких концентрациях ЛФХ (темные кружки на рис. 6.5, а) кривая интенсивность — длительность сместилась вверх, V_n не изменяется, $V_{\text{пор}}$ становится менее отрицательным, а $V_{\text{макс}}$ еще больше уменьшается. Кривая интенсивность — длительность показывает, что ткань в этой ситуации стала менее возбудимой. Нормированная кривая интенсивность — длительность не совпадает с кривыми, полученными в контроле или при низкой концентрации ЛФХ. Это свидетельствует о том, что снижение возбудимости преимущественно связано с изменением активных свойств генератора тока мембраны.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ

Локальные токи

Постулат 16: Влияние локальных токов на возбудимость зависит от интенсивности источника и характеристик стока. Если выполнены требования, связанные с предельной длиной, возникает регенеративный распространяющийся потенциал действия. Если эти требования не выполнены, то наблюдается местный электротонический ответ.

При достижении уровня порога в волокне с быстрым ответом ионы Na^+ начинают поступать внутрь по электрохимическому градиенту и заряжают внутренность клетки положительно по отношению к ее окружению. Эти положительные заряды замещают отрицательные заряды, расположенные на внутренней поверхности мембраны, что приводит к деполяризации. Так как натриевая проводимость g_{Na} мембраны возрастает при изменении потенциала на мембране в положительную сторону, то деполяризация вызывает дальнейшее увеличение g_{Na} . V_m в некотором локальном участке мембраны оказывается положительным по отношению к окружающим частям клетки, поэтому в миоплазме образуется движущая сила, вызывающая возникновение тока, проходящего в продольном

направлении. K^+ являются основными переносчиками такого продольного тока внутри клеток и между клетками. Величина этого тока зависит в основном от сопротивления и емкости межклеточных контактов и в меньшей степени от импеданса миоплазмы. Ток, текущий в продольном направлении, вытесняет отрицательные заряды с внутренней поверхности окружающих участков мембраны, деполяризует эти участки до уровня порогового потенциала и, таким образом, увеличивает g_{Na} мембраны. Цепь замыкается емкостным током, проходящим через мембрану, и, наконец, током внеклеточного пространства. Если величина местного электротонического тока, возникающего при электрической стимуляции или по окончании потенциала действия, оказывается достаточной для выполнения требования пороговой длины для регенеративной деполяризации, зависящей от g_{Na} , то потенциал следующего элемента становится выше порога и происходит распространение потенциала действия.

Источники, стоки и распространение

Постулат 17: Выполнение требований пороговой длины или достижение порога можно рассматривать как начало процесса распространения, а возникающий при этом потенциал действия является местной реакцией. Такой подход подчеркивает значение источников и стоков.

Fozzard [6] предположил, что деполяризацию до уровня порога, вызываемую локальным током, можно рассматривать как начало процесса распространения, а потенциал действия является местной реакцией мембраны. Если рассматривать проведение с этой точки зрения, то становится ясной взаимосвязь между активными свойствами генератора тока мембраны (источник) и пассивными свойствами мембраны (сток).

Источник

Постулат 18: Соотношения между плотностью входящего тока и \dot{V}_{\max} , а также \dot{V}_{\max} и скоростью проведения являются проблематичными. Интересно отметить, что пропорциональная связь между \dot{V}_{\max} и скоростью проведения наблюдается достаточно часто.

Возникновение и развитие быстрого потенциала действия в элементарной единице мембраны (например, в элементе А—В на рис. 6.1) обсуждалось в разделе «Ткани с быстрым ответом» и обобщено в уравнении (6.25). Такой генератор можно рассматривать как источник тока или батарею, подающие ток в соседние элементы. Если приять размеры элемента очень малыми, то мы получим случай простейшей мембраны, и максимальная скорость нарастания фазы 0 потенциала действия (\dot{V}_{\max} или dV_m/dt_{\max}) будет пропорциональна ионному току. Если соединить несколько таких элементов вместе, то связь между \dot{V}_{\max} и трансмембранным током в данном элементе становится менее определенной, так как на нее теперь влияют соседние участки мембраны и величины

продольных сопротивлений. Принимая модель одномерного кабеля и предполагая, что ответ распространяется вдоль однородного кабеля с постоянной скоростью проведения (θ , м/с), получим, что распределение трансмембранного потенциала в пространстве должно быть пропорционально его распределению во времени, т. е.:

$$\frac{\partial^2 V_M}{\partial x^2} = \left(\frac{1}{\theta^2} \right) \frac{\partial^2 V_M}{\partial t^2}. \quad (6.28)$$

Если это соотношение подставить в основное кабельное уравнение (6.7), то мы получим:

$$\frac{1 d^2 V_M}{r_i \theta dt^2} = c_m \frac{dV_M}{dt} + \frac{V_M}{r_m}. \quad (6.29)$$

Вспоминая из уравнения (6.3), что V_M/r_m — ионный ток, приведем уравнение (6.29) к следующему виду:

$$\frac{1 d^2 V_M}{r_i \theta dt^2} = c_m \frac{dV_M}{dt} + i_i. \quad (6.30)$$

В рассматриваемом случае основным ионным током является входящий натриевый ток, а в тканях с медленным ответом им будет медленный входящий ток.

Как уже было сказано, несколько лет назад было трудно непосредственно регистрировать натриевый ток, и в качестве косвенного показателя этого тока использовали $\dot{V}_{\text{макс}}$. Так как $\dot{V}_{\text{макс}}$ является максимальной скоростью нарастания фазы 0, т. е. максимумом dV_M/dt , то $d^2 V_M/dt^2$ в этот момент времени обращается в нуль. И уравнение (6.30) тогда принимает вид:

$$\dot{V}_{\text{макс}} = i_i / c_m. \quad (6.31)$$

Если предположить, что C_m постоянна, а i_i соответствует натриевому току, то можно ожидать, что $\dot{V}_{\text{макс}}$ будет коррелировать с плотностью натриевого тока.

Довольно трудной проблемой было аналитическое описание взаимосвязи между $\dot{V}_{\text{макс}}$ и θ , хотя можно было бы ожидать, что увеличение входящего ионного тока будет сопровождаться увеличением θ , а с учетом уравнения (6.31) — увеличением $\dot{V}_{\text{макс}}$. Hunter и соавт. [68] нашли аналитическое решение, из которого следует, что скорость проведения слабо зависит от максимальной натриевой проводимости и приблизительно пропорциональна квадратному корню из значения $\dot{V}_{\text{макс}}$. Singer и соавт. [69] обнаружили корреляцию между $\dot{V}_{\text{макс}}$ и θ в волокнах Пуркинье при разных уровнях мембранного потенциала покоя.

Принимая во внимание все допущения одномерной кабельной теории и трудность распространения линейной теории на многомерную систему, интересно отметить, что пропорциональная связь между $\dot{V}_{\text{макс}}$ и θ очень часто оказывается справедливой. Снижение скорости проведения обычно наблюдается в таких условиях, когда происходит изменение движущей силы, например, при изменении трансмембранного потенциала и равновесного потенциала (см. «Клеточная мембрана: структура и функция»), или когда инакти-

вируется часть натриевых каналов (см. «Ткани с быстрым ответом»), или же при других типах нарушений нормальной работы натриевых каналов, как например, при воздействии определенных веществ.

Возбуждение в тканях с медленным ответом (как уже обсуждалось ранее) зависит от так называемого медленного входящего тока, смешанного кальций-натриевого тока, который определяется работой канала с медленной кинетикой, отличающегося от канала, проводящего ток, ответственный за возбуждение в ткани с быстрым ответом. В такой ткани $\dot{V}_{\text{макс}}$ имеет малую величину и проведение происходит очень медленно. Однако незначительная величина $\dot{V}_{\text{макс}}$ не является определяющим признаком ткани с медленным ответом, так как при угнетении работы натриевых каналов в ткани с быстрым ответом могут также наблюдаться низкие величины $\dot{V}_{\text{макс}}$ и медленное проведение.

Сток: подножие потенциала действия

Постулат 19: Кабельная теория непрерывного распространения возбуждения позволяет до некоторой степени предугадать взаимосвязь между скоростью проведения, подножием потенциала действия, кабельными свойствами (см. «Ткани с быстрым ответом») и другими воздействиями на нормальную работу натриевых каналов, которые обычно вызывают уменьшение скорости проведения.

Локальный потенциал действия или источник оказывает влияние на окружающие ткани путем электротонического взаимодействия. Электротоническое распространение тока в первую очередь заряжает емкость соседних сегментов, находящихся в покое, что проявляется как медленное экспоненциальное нарастание трансмембранного потенциала, предшествующее фазе быстрой деполяризации распространяющегося потенциала действия. Это явление называется «подножием» (foot — англ.) потенциала действия [70]. Так как нарастание потенциала во времени происходит экспоненциально, то можно построить график зависимости потенциала от времени в полудогарифмической шкале, что позволит определить постоянную времени для этого процесса (τ_{foot}). Решение уравнения (6.29) дает две экспоненты, и взяв положительный корень и упростив выражение, получаем:

$$\tau_{\text{foot}} = \left(\frac{\lambda_M}{\theta} \right)^2 \cdot \frac{1}{c_M} \quad (6.32)$$

или в терминах кабельного уравнения:

$$\tau_{\text{foot}} = \frac{1}{\theta^2 r_1 c_M} = \frac{a}{2\theta^2 R_1 C_M} \quad (6.33)$$

Величины радиуса волокна (a), r_1 , τ_{foot} и θ можно определить экспериментально, что позволяет рассчитать емкость. Для кабеля подобного волокну Пуркинье, ошибка такого метода расчета н

превышает 5%. Если этот способ рассуждения является правильным, то скорость проведения должна обратно пропорционально коррелировать с τ_{foot} . Dominguez, Fozzard [42] показали, что это действительно наблюдается в волокнах Пуркинье сердечной мышцы овцы.

Сток: кабельная теория для непрерывного распространения

Нами уже были получены уравнения, описывающие влияние пассивных кабельных свойств на скорость проведения в одномерном кабеле. Проще всего это показать, преобразовав уравнение (6.33):

$$\theta^2 = \frac{1}{\tau_{foot} \Gamma_1 C_M} = \frac{a}{2 \tau_{foot} R_1 C_M} \quad (6.34)$$

Вопрос межклеточных взаимодействий был достаточно подробно описан в начале этой главы. Было предположено, что продольное сопротивление в основном определяется сопротивлением нексусов и Γ_1 может сильно изменяться в зависимости от состояния структур, соединяющих соседние клетки. В экспериментальных условиях довольно трудно проверить влияние Γ_1 на θ непосредственно. Del Castillo, Moor [71] изменяли Γ_1 нервного волокна, вводя металлическую проволочку в аксоплазму, и обнаружили, что в таких условиях θ может изменяться в широком диапазоне. В миокардиальной ткани наблюдали потерю способности передавать возбуждение при изменении Γ_1 различными способами [21, 26]. Liebergman и соавт. [72] считали, что ухудшение электрического сопряжения между клетками ткани сердца цыпленка в культуре является причиной уменьшения скорости проведения. Diaz и соавт. [73], Jouner [74] недавно провели моделирование влияния электрического сопряжения на распространение. Влияние экспериментального изменения проводимости внеклеточной среды на распространение было недавно показано в ткани предсердий [75] и в волокнах Пуркинье [76].

На основании уравнения (6.34) можно также сделать вывод, что θ должна возрастать пропорционально радиусу волокна. Несомненно, при этом предполагаются постоянство внутриклеточной проводимости, большие размеры внеклеточного пространства и неизменность проводимости и емкости мембраны. Draper, Mu-Tu [77] обнаружили некоторую взаимосвязь между диаметром и скоростью проведения. Schoenberg и соавт. [39] не выявили никаких отличий скорости проведения в волокнах Пуркинье, диаметр которых находился в диапазоне 50—250 мкм. Анализ кабельных свойств в этих исследованиях показал, что волокна Пуркинье большого диаметра имеют более высокое сопротивление R_1 , что может маскировать влияние изменения собственно диаметра волокна на скорость проведения. В волокнах Пуркинье большого диаметра важную роль начинают играть свойства межклеточных щелей, и в этом случае пренебрежение сопротивлением τ_0 привело бы к неточ-

ности. Было бы интересно обсудить вопрос о том, что влияние изменений $r_0 + r_1$ маскирует влияние изменения диаметра.

Goldstein, Rall [78] провели моделирование изменений скорости проведения при изменении геометрии волокна или при ветвлении. Они обнаружили, что при ступенчатом уменьшении диаметра скорость проведения возрастает, а при ступенчатом увеличении — снижается. Это связано с изменением доли тока, теряемой в стоке. В случае разветвления при подходе к месту разветвления скорость распространения возбуждения снижается, так как разветвления образуют сток большей емкости, а при прохождении этого участка в ветвях меньшего диаметра она возрастает. Иногда скорость распространения уменьшается ниже критического уровня и распространение прекращается, а иногда наблюдается эффект отражения волны возбуждения («эхо»). Линейная теория была использована для моделирования распространения возбуждения в более сложных двух- и трехмерных системах, что позволило частично объяснить быстрое падение потенциала вблизи точки стимуляции и важное значение продольного сопротивления и геометрии в определении скорости проведения. Эти факторы, по-видимому, играют более важную роль, чем влияние ионных проводимостей мембраны и движущих сил.

Сток: разрывное распространение

Постулат 20: Кабельная теория непрерывного распространения возбуждения и следующие из нее предположения, упомянутые в постулате 19, не всегда хорошо согласуются с экспериментальными данными. Исследования последних лет позволили предположить, что в миокардиальной ткани важную роль может играть разрывное скачкообразное распространение.

Модели, основанные на кабельной теории непрерывного распространения, не полностью учитывают структурные неоднородности. Sommer, Dolber [79] описали в миокарде «элементарные единицы», содержащие по 2—15 клеток, соединяющихся друг с другом через каждый 0,1—0,2 мм. Эти элементарные единицы образуют отделенные друг от друга соединительной тканью пучки, соединяющиеся между собой на некотором расстоянии, зависящем, по мнению Dolber [80], от диаметра пучка. В свою очередь эти пучки группируются в макроскопические тяжи со сложными и нерегулярными внутренними контактами. Поэтому не удивительно, что скорости распространения возбуждения в разных направлениях могут различаться [81—84]. Spach и соавт. [83, 84] обнаружили, что распространение в ткани предсердий и желудочков происходит разной скоростью в зависимости от угла направления распространения по отношению к ориентации клеток. Более того, они установили, что в условиях постоянства пассивных и активных свойств мембраны не только наблюдается большая скорость распространения возбуждения вдоль длинной оси клеточной структуры, по сравнению с распространением в поперечном направлении, но, что довольно неожиданно, распространение в продольном направлении происходит при меньшей величине V_{\max} и большей τ_{tot} , чем рас-

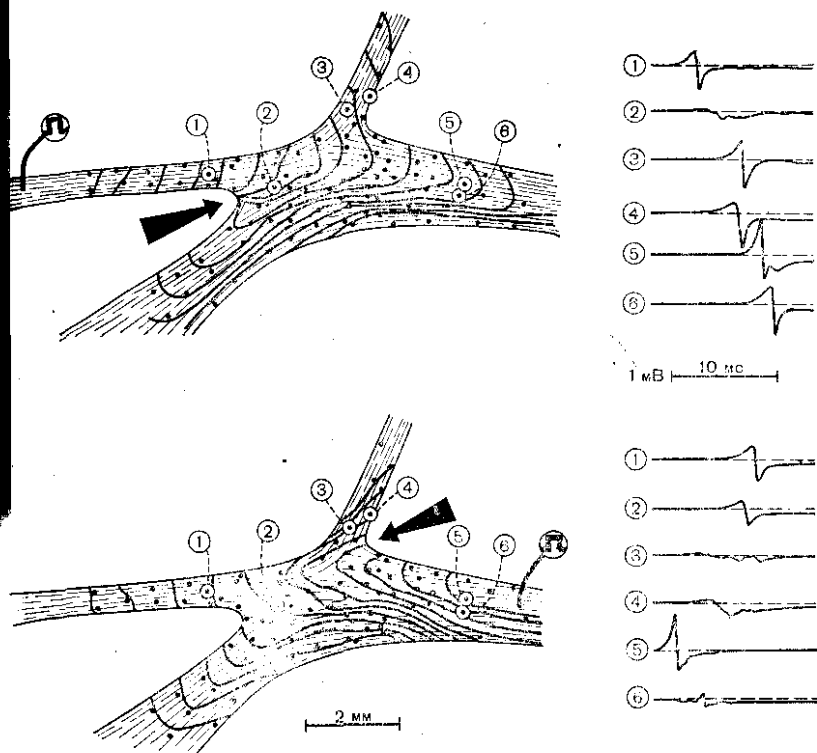


Рис. 6.7. Зависимость скорости проведения и внеклеточных потенциалов от направления в области разветвления. Рисунки слева показывают последовательность активации для двух различных точек стимуляции (прямоугольные ступеньки) в пучках миокарда терминального гребня. Точками (1—6) на препарате отмечены места регистрации внеклеточных потенциалов, на основе которых были построены карты активации. Изменения внеклеточных потенциалов, зарегистрированных в этих точках, показаны справа. По [84].

пространение в поперечном направлении (см. рис. 6.6). В силу обсуждавшихся ранее причин, следующих из уравнений (6.31) и (6.32), такие результаты невозможно предвидеть на основе кабельной теории непрерывного распространения. Sprach и соавт. [84] также выявили зависимость скорости распространения внеклеточных потенциалов в местах ветвления и на участках более сложных мышечных контактов от направления распространения (рис. 6.7). И в этом случае на основе кабельной теории непрерывного распространения невозможно предположить такую зависимость от угла и направления.

Sprach и соавт. [83, 84] предположили, что разрывы в структуре миокарда могут быть ответственными за наблюдаемые «скачки» распространения. Такой подход был учтен при создании ими так называемой « \bar{R}_a -гипотезы». \bar{R}_a — эффективное аксиальное сопротивление, представляющее собой сопротивление в направлении рас-

пространения, а не просто сопротивление вдоль длинной оси волокна. Этот термин учитывает влияние геометрической формы клеток, внутриклеточного и внеклеточного сопротивления, клеточной упаковки, а также эффекты, связанные с сопротивлением, степенью развития и распределением контактов между клетками и других структурных единиц. Если вместо r_1 в кабельное уравнение подставить значение R_a и учесть геометрическую форму клеток, чтобы иметь дело с мембранным током на единицу длины, то мы получим:

$$\frac{\pi a^2}{R_a} \frac{\partial^2 V_M}{\partial x^2} = c_M \frac{\partial V_M}{\partial t} + i_1. \quad (6.35)$$

Преобразуя это уравнение, можно рассчитать аксиальные токи и скорость распространения. И хотя модель все еще остается очень грубой, рассчитанная с ее помощью форма волны возбуждения во внеклеточном пространстве вблизи участка соединения двух однородных кабелей с различными R_a действительно воспроизводит результаты, экспериментально наблюдаемые в местах контактов внутри миокардиальной ткани.

Sprach и соавт. уделили много внимания обсуждению вопроса о связи полученных ими результатов с существованием так называемых предпочтительных путей распространения возбуждения в предсердиях и в тканях с медленным ответом. Читателям, интересующимся этим вопросом, мы рекомендуем ознакомиться с работами [83, 84].

ФАКТОР БЕЗОПАСНОСТИ

Из концепции пороговой длины (которая уже обсуждалась ранее в этой главе) следует, что для преодоления реполяризирующего влияния окружающих тканей и возникновения распространяющегося потенциала действия необходимо пропускание через ткань некоторого количества тока (т. е. важно произведение тока на время или заряд). Термин «фактор безопасности» обозначает избыток активирующего тока или заряда по отношению к величине, минимально необходимой для возникновения регенеративного распространяющегося ответа — т. е. превышение возможностей источника над потребностями стока. Клиницисты хорошо знают, что некоторые типы миокардиальной ткани, как например, АВ-узел, имеют низкий фактор безопасности и там часто происходит блокирование проведения; другие ткани, как волокна Пуркинье или специализированная проводящая система предсердно-желудочкового пучка, имеют высокий фактор безопасности, и в таких тканях редко происходит нарушение проведения. Ниже будет рассмотрен фактор безопасности в терминах источников и стоков.

Источник. Hodgkin [85] рассчитал связь между плотностью натриевых каналов и скоростью проведения в немиелизированном нервном волокне. Следует напомнить, что работа натриевых каналов регулируется воротными зарядами. Повышение плотности натриевых каналов приведет к увеличению максимального натриевого

тока и будет способствовать распространению возбуждения, но при этом на мембране увеличится и плотность воротных зарядов, которые создают нечто вроде дополнительной емкости, что вызовет уменьшение скорости распространения. Первое явление увеличивает фактор безопасности, второе — уменьшает его. Hodgkin рассчитал оптимальную плотность каналов и получил значение, соответствующее экспериментальным данным. На миокарде аналогичные исследования не проводились, но разумно предположить, что и в этом случае можно использовать те же общие принципы.

В нормальных условиях в ткани, возбуждение которой определяется быстрым натриевым током, например в предсердиях, проводящей системе и в миокарде желудочков, движущая сила ионов, а значит и ионный ток, имеют большую величину, а реактивация каналов происходит быстрее, чем в ткани, возбуждение которой определяется смешанным $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -током (I_{st}), что справедливо для SA- и АВ-узлов, а также для поврежденной ткани. В силу описанных выше причин деполяризация способна частично инактивировать систему натриевых каналов, что должно привести к снижению фактора безопасности.

Таким образом, характеристики источника предположительно соответствуют нарушению проводимости, часто наблюдаемому в АВ-узле, и редкости такого блока проведения в ткани с быстрым ответом — в предсердиях, проводящей системе Гиса — Пуркинье и желудочках.

Сток. Многие характеристики стока, которые должны вызывать уменьшение или увеличение фактора безопасности, уже были рассмотрены ранее. Они следуют из уравнения (6.34) классической кабельной теории и уравнения (6.35) недавней модификации этой теории Spach и соавт. [83, 84]. В некоторых случаях изменения внеклеточного сопротивления также способны уменьшить фактор безопасности, что наблюдалось в экспериментальных работах, проведенных Anzelevitch, Jalife, Moe и соотр. [76]. Если читатель усвоил принципы, обсуждавшиеся в разделе «Распространение потенциала действия», то этот вывод для него очевиден. Теоретически ясно, что в случае двух- и трехмерных структур сток будет иметь большую емкость в тканях с большим количеством ветвлений (АВ-узел) по сравнению с похожими на обычный кабель волокнами Пуркинье, поэтому в первом случае фактор безопасности будет больше, а во втором — меньше.

Значительно менее очевидными являются некоторые результаты, полученные Spach и соавт. [83, 84]. Как уже было сказано, они наблюдали, что скорость распространения вдоль длинной оси клеток выше, чем в поперечном направлении, что, как считали раньше, обусловлено различием электрического сопряжения. Используя метод преждевременной стимуляции и варьируя интервал сцепления с основным стимулом в ритмическом ряду, цитируемые авторы показали, что в направлении, в котором исходно скорость проведения была высокой, однородное распространение сначала затухает, и затем и совсем прекращается, в то время как возбуждение продолжает распространяться в направлении с исходно меньшей ско-

ростью проведения. В таких экспериментах в структурах с «разрывами» свойств фактор безопасности был выше при меньшей скорости проведения и наоборот, что противоречит наблюдаемому в структурах с «непрерывными» свойствами, как например, в кабеле при изменении активных и пассивных свойств мембраны.

НАРУШЕНИЯ РИТМА И АНТИАРИТМИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

Вопросы, связанные с нарушениями ритма и механизмами действия антиаритмических препаратов будут специально рассмотрены в других главах этой книги (главы 20 и 21), и частично в других разделах. Однако в этой главе было бы целесообразно привести несколько наблюдений, имеющих отношение к концепциям кабельных свойств и распространению возбуждения, рассмотренных выше.

В течение многих лет врачи и физиологи связывали аритмогенез с нарушением нормальной генерации потенциала действия и аномалиями проведения. Современные данные позволяют предположить, что автоматизм сердца следует рассматривать как часть более общей категории: поддерживаемой ритмической активности [62]. Результаты исследований нарушений возбудимости миокарда, проведенных в настоящее время, невозможно точно отнести ни к одной из этих категорий [16, 42—46, 86]. Часто такие механизмы существуют вместе и взаимодействуют друг с другом.

Рециркуляция

Постулат 21: В принципе возникновение или исчезновение рециркуляции возбуждения зависит от взаимоотношения анатомических характеристик, рефрактерности и скорости проведения. Электрофизиологические характеристики зависят в свою очередь от активных и пассивных свойств, определяющих возбудимость, которые обсуждались ранее в этой главе.

Термин «рециркуляция» продолжает использоваться исследователями, так как он относится к довольно результативной концепции и является общеупотребляемым, хотя в ряде работ [62] он был подвергнут серьезной критике. Созданная более полувека назад модель Шмитта — Эрлангера продолжает оставаться разумной отправной точкой для обсуждения такого явления. Модификация этой модели показана на рис. 6.8. В некоторых сегментах развивается однонаправленный блок проведения вследствие локального повреждения ткани, изменения рефрактерности и других нарушений в системе источника-стока. Этот сегмент должен быть функционально изолирован от окружающей ткани и возбуждение в нем должно оставаться достаточно долго, чтобы возбужденная окружающая ткань успела реактивироваться и могла быть вновь возбуждена. В принципе наиболее простой метод расчета длины петли рециркуляции описывается следующей формулой:

$$L_{\text{ц}} = \Theta \cdot RP_{\text{ц}},$$

(6.36)

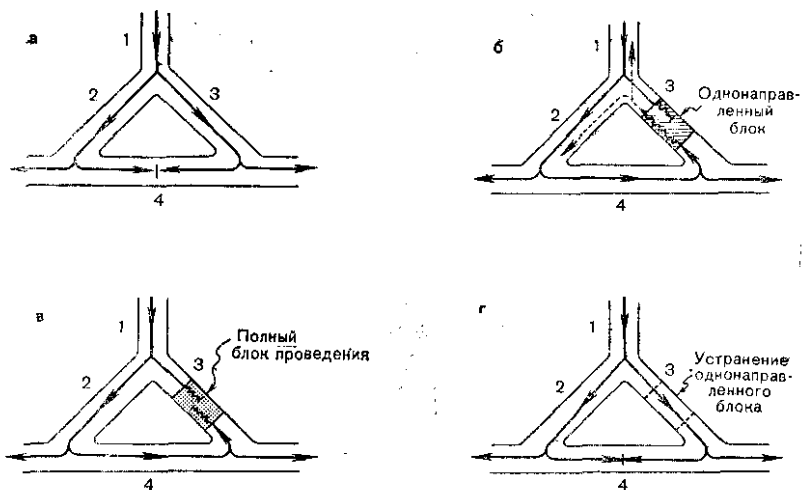


Рис. 6.8. Схема однонаправленного блока проведения с рециркуляцией возбуждения.

а — нормальное проведение: возбуждение распространяется от основного волокна Пуркинью (1) по двум ветвям (2, 3) и активирует желудочек (4), приводя к возникновению комплекса QRS; б — однонаправленный блок с рециркуляцией; ишемическое повреждение угнетает возбудимость в некотором сегменте ветви 3, вызывая однонаправленный блок проведения. Возбуждение нормально распространяется по ветви 2, активирует желудочек с возникновением комплекса QRS, после чего оно медленно распространяется в ретроградном направлении через сегмент ветви 3 с угнетенной возбудимостью. Если возбудимость ткани в месте бифуркации успевает восстановиться к моменту прихода возбуждения через сегмент с угнетенной возбудимостью, то волна возбуждения может повторно проникнуть в ветвь 2 и вызвать рециркуляцию возбуждения. Пушкитрыми стрелками показано, что возбуждение может распространиться как по ветви 2 в сторону миокарда желудочков, что вызовет возникновение экстрасистолы, так и в ретроградном направлении по основному волокну Пуркинью (1). Если такая цепь рециркуляции окажется устойчивой, то образуется поддерживаемая желудочковая тахикардия. В этом случае возможность рециркуляции определяется скоростью проведения по ткани с нормальной и угнетенной возбудимостью, длительностью рефрактерного периода ткани, которая была возбуждена ранее, а также другими пассивными и активными электрофизиологическими свойствами, играющими важную роль в возбудимости миокарда. В сегменте с однонаправленным блоком источником может быть либо частично угнетенный интравентрикулярный ток, либо медленный входящий ток. Последний обычно является источником в ткани СА и АВ-узлов; в — возникновение полного блока; цепь рециркуляции возбуждения прерывается при превращении однонаправленного блока в полный блок проведения; г — устранение однонаправленного блока проведения.

где L_c — длина цепи рециркуляции; θ — наиболее медленная скорость проведения; RP_c — длительность рефрактерного периода ткани, в которой развивается рециркуляция. Для нормального быстрого потенциала действия волокон Пуркинью θ приблизительно равна 3 м/с, а RP_c — около $1/3$ с, так что L_c должна составлять около 1 м, что невозможно с точки зрения анатомии сердца. Если θ снижена до 0,01 м/с или еще меньше, то L_c попадает в миллиметровый диапазон, что вполне допустимо. Такая цепь рециркуляции может охватывать ткани предсердий, АВ-узла и желудочков. Цепь может иметь большую длину, как в случае рециркуляции по ножкам предсердно-желудочкового пучка, или маленькую, как в случае отраженной в одном волокне Пуркинью.

Как уже было сказано, потенциал действия СА- и АВ-узлов развивается по типу медленного ответа, и поэтому в этих тканях и в норме скорость проведения мала. По этой причине при рецирку-

ляторных одиночных экстрасистолах и при постоянной рециркуляторной автоматии волна возбуждения обычно захватывает АВ-узел. Рециркуляторная пароксизмальная суправентрикулярная тахикардия, захватывающая АВ-узел, является наиболее частым случаем тахикардий у больных без ишемии миокарда. Реже рециркуляторные аритмии захватывают СА-узел.

Скорость проведения в ткани с быстрым ответом подробно обсуждалась выше, и было показано, что она зависит как от источника, так и от стока. Максимальная натриевая проводимость может снизиться вследствие разрушения каналов, блокирования каналов, изменения кинетики параметров активации и инактивации, ингибирования ионных насосов или аккомодации. По-видимому, наиболее существенным является влияние свойств стока, в частности изменения g_o , g_1 и \bar{N}_a , которые обсуждались в разделе «Распространение потенциала действия». Особенно интересно сообщение Sprach и соавт. [84] о возникновении рециркуляции при скачкообразном распространении. На рис. 6.4 показано также, что нарушение процесса реполяризации замедляет или блокирует проведение, так как это влияет на источник и ионную проводимость мембраны как в данной точке, так и в окружающих тканях.

Автоматизм

Постулат 22: Нормальный и аномальный автоматизм может оказывать влияние на проведение, изменяя состояние активации системы натриевых каналов путем электротонических взаимодействий. Иногда это может вызывать блокирование проведения в некоторых типах тканей.

Нормальный автоматизм и аномальный автоматизм, включая триггерную ритмическую активность, могут самостоятельно нарушать ритм либо же могут влиять на проведение возбуждения. Медленно нарастающий пейсмейкерный потенциал (фаза 4) может вызвать постепенное закрытие инактивационных ворот (аккомодация), что приведет к локальному блоку распространяющегося потенциала действия. Считают, что по такому механизму развиваются некоторые типы блока проведения в ножках предсердно-желудочкового пучка, возникающие при брадикардии. Современные исследования *in vitro* показывают, что медленное проведение может осуществляться по механизму электротонического взаимодействия [76] и источником такого электротона может быть некоторый автоматический фокус. Ferrigier [87] четко показал, что при токсической концентрации дигиталиса прохождение потенциала действия от папиллярной мышцы через волокно Пуркинье в ткань стенки желудочка может быть заблокировано осцилляторным следовым потенциалом, развивающимся в волокне Пуркинье.

Нарушение возбудимости

Постулат 23: Показано, что некоторые воздействия изменяют соотношение между количеством заряда, необходимого для инициации регенеративного потенциала действия, и величиной V_{max} потенциала действия, даже если порог активации остается неизменным.

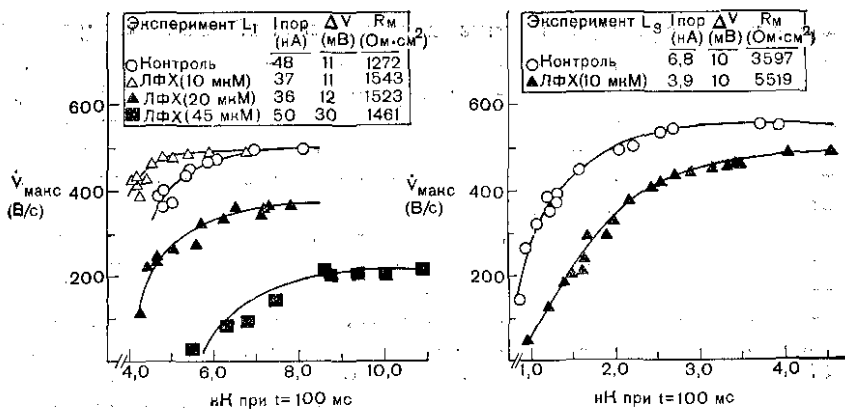


Рис. 6.9. Зависимость \dot{V}_{\max} от заряда при $t=100$ мс в контроле и при действии ЛФХ, полученные в двух независимых экспериментах (а, б). По [48].

Как было сказано выше, результаты некоторых недавних исследований возбудимости трудно соотнести с какой-либо определенной категорией аномальной генерации возбуждения или нарушения проведения. На рис. 6.9 показан пример, полученный нами при исследовании действия ЛФХ [49]. В этом случае оценивали величину \dot{V}_{\max} как функцию заряда при внутриклеточном пропускании тока длительностью 100 мс до действия ЛФХ и на фоне его влияния. Вставки на графиках показывают величину тока, необходимую для достижения порога ($I_{пор}$), величину разности между пороговым потенциалом и потенциалом покоя (ΔV), а также величину R_m . Обратите внимание на изменение соотношения между \dot{V}_{\max} и зарядом при действии ЛФХ. Такие изменения свойств источника обязательно будут влиять на скорость проведения в ткани.

Антиаритмические препараты

Постулат 24: Действие антиаритмических препаратов на электрофизиологические свойства нормальной ткани и ткани, в которой возникают нарушения ритма, является сложным и многосторонним. Общее влияние их на возбудимость миокарда зависит от относительного вклада аритмогенных факторов и действия антиаритмического препарата на активные и пассивные свойства миокарда, определяющие возбудимость. Влияние перечисленных выше факторов на источник и ствол меняется во времени. Использование методики микроструйной регистрации потенциала в нескольких точках и быстрый анализ данных с помощью компьютера позволяют выявить механизм действия и взаимодействия.

В течение многих лет наше представление о механизме действия антиаритмических препаратов выражалось в терминах действия этих веществ на фундаментальные электрофизиологические свойства миокарда [61, 88, 98]. Большинство антиаритмических препаратов угнетает систему натриевых каналов. Многие авторы называли такое действие «местным анестетическим» или «мембра-

ностабилизирующим», «прямым мембранным» действием. В настоящее время стало ясно, насколько неточными являются эти термины. Ингибирование системы натриевых каналов приведет к снижению скорости проведения в результате воздействия на источник и может разорвать цепь рециркуляции, вызывая полный блок проведения в участке с однонаправленным блоком. Блокаторы кальциевых каналов будут оказывать аналогичное действие, если источником в участке с однонаправленным блоком является медленный входящий ток. Некоторое внимание было уделено влиянию препаратов на реполяризацию и на активность вегетативной нервной системы. Однако очень мало изучено действие антиаритмических препаратов на другие характеристики миокарда, определяющие возбудимость, например, на пороговую длину, величину порогового тока или заряда, пассивные свойства мембраны и другие параметры «стока».

Что в действии антиаритмических препаратов является более важным, их влияние на источник, на сток или другие компоненты? В действительности мы не знаем ответа на этот вопрос, но, по-видимому, важное значение имеет воздействие препарата на все эти компоненты, а их относительное значение может зависеть от состояния ткани. Единственное, что можно сказать определенно, что препараты воздействуют значительно сильнее источника. Несколько лет назад мы изучали действие прокаинамида и лидокаина в концентрациях, соответствующих их уровню в плазме крови больных при антиаритмической терапии, на параметры, определяющие возбудимость нормальных волокон Пуркинье [44, 45]. На рис. 6.10 показаны кривые интенсивность — длительность, полученные в этом исследовании. Обратите внимание, что под воздействием обоих препаратов ненормированная кривая сдвигается вверх, что указывает на снижение возбудимости ткани в классическом понимании этого термина, так как для достижения уровня порогового потенциала требуется большая величина $I_{пор}$ при любой длительности импульса тока. Хотя изменения $I_{пор}$ были похожи при действии этих препаратов, механизмы действия отличаются тем, что прокаинамид снижает возбудимость, повышая уровень $V_{пор}$ в сторону деполяризации (этот параметр зависит от натриевой проводимости), в то время как лидокаин мало влияет на $V_{пор}$, но снижает сопротивление мембраны в подпороговом диапазоне потенциалов. Анализ кабельных свойств показывает, что прокаинамид увеличивает, а лидокаин уменьшает постоянную длины, так что оба препарата по-разному влияют на свойства стока. Исследования показали также, что действие лидокаина на натриевые каналы в значительной степени зависит от потенциала покоя и эффект более сильно выражен на деполяризованной ткани.

Более сложный пример взаимодействия аритмогенных факторов с антиаритмическим препаратом получен нами при исследованиях ЛФХ и лидокаина. Как уже говорилось в разделе «Практические следствия», существует мнение, что ЛФХ является одним из метаболитов, образующихся при ишемии, вызывающей нарушения ритма. Мы обсудили некоторые сложные воздействия ЛФХ на ак-

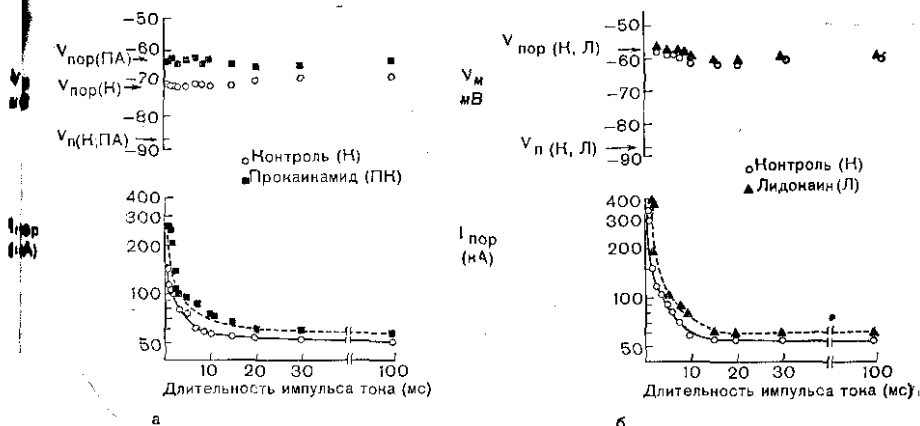


Рис. 6.10. Влияние прокаинамида (подгруппа I) (а) и лидокаина (подгруппа II) (б) на ненормированные кривые интенсивность — длительность. В верхней части каждого рисунка показаны зависимости потенциала порога от длительности ступеньки тока. В нижней части показаны кривые интенсивность — длительность, где так называемый пороговый ток $I_{пор}$, т. е. ток, при котором выполняются требования пороговой длины и возникает регенеративный распространяющийся потенциал действия, показан как функция длительности ступеньки тока (t). По сравнению с контролем при действии обоих препаратов происходит сдвиг ненормированных кривых вверх, что указывает на увеличение порогового тока при таком воздействии, т. е. миокард становится менее возбудимым в классическом смысле. Обратите внимание, что ни один из препаратов не влияет на потенциал покоя (V_n), но прокаинамид вызывает сдвиг $V_{пор}$ в сторону более положительных потенциалов, а лидокаин мало влияет на $V_{пор}$. По [86].

тивные и пассивные свойства клеточной мембраны. При проведении наших исследований ЛФХ и лидокаина большую помощь оказало использование системы компьютерного анализа данных, так как изменения, вызываемые ЛФХ, и влияние на них лидокаина необходимо выявлять очень быстро, чтобы можно было считать, что экспериментальные условия, в которых исследуются различные препараты, являются одними и теми же. Ненормированные и нормированные кривые зависимости интенсивность — длительность для типичного эксперимента приведены на рис. 6.11. Как показано на рис. 6.11, а, под действием ЛФХ (треугольники) кривая смещается вниз, т. е. препарат становится более возбудимым в классическом смысле слова, так как для инициации распространяющегося потенциала действия в этом случае необходим импульс тока меньшей амплитуды ($I_{пор}$) при любой длительности импульса. Обратите внимание, что это происходит, несмотря на уменьшение $V_{макс}$ от 816 до 693 В/с, т. е. несмотря на угнетение системы натриевых каналов. Такое повышение возбудимости опосредовано преимущественно увеличением R_m и наклонной проводимостью во всем подпороговом диапазоне потенциалов, что определяется при анализе кабельных свойств и вольтамперных зависимостей соответственно. R_m увеличивается от 1242 до 1528 Ом·см². Лидокаин угнетает воз-

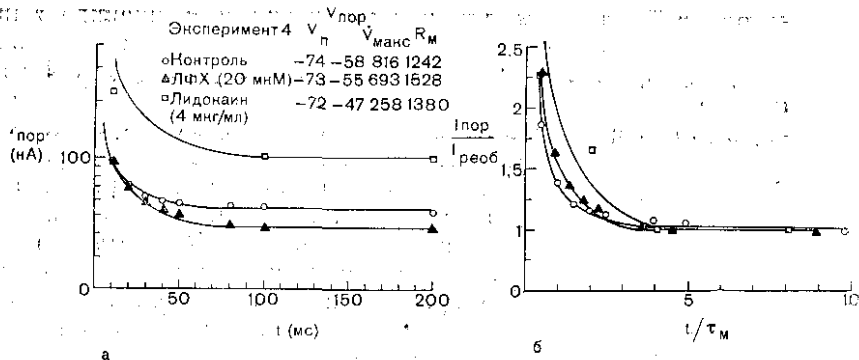


Рис. 6.11. Влияние ЛФХ и лидокаина на фоне ЛФХ на кривые интенсивность — длительность для волокна Пуркинье. (Sawicki, Arnsdorf, неопубликованные данные).

будимость, повышенную при действии ЛФХ, на что указывает сдвиг ненормированной кривой зависимости интенсивность — длительность вверх. Действие лидокаина опосредовано двумя различными механизмами: а — дальнейшим угнетением системы натриевых каналов в дополнение к вызванному действием ЛФХ; б — прямым противодействием влиянию ЛФХ на сопротивление мембраны в покое и в подпороговом диапазоне потенциалов и вольтамперных зависимостей. Дополнительное угнетение системы натриевых каналов приводит к падению $V_{макс}$ с 693 до 258 В/с, и $V_{пор}$ становится менее отрицательным. Противодействие влиянию ЛФХ на мембрану выражается в уменьшении R_m с 1528 до 1380 Ом·см². Как аритмогенный фактор, так и антиаритмический препарат влияют и на источник, и на сток: итоговое действие на возбудимость миокарда зависит от относительного влияния их на активные и пассивные свойства.

Постулат 25: В литературных источниках часто подчеркивают такие эффекты антиаритмических препаратов, как укорочение или удлинение потенциала действия и рефрактерного периода. Более сложные эффекты описывают термином «нормализация потенциала действия», имеющего два устойчивых состояния. Такие потенциалы действия будут влиять на проведение и иногда могут привести к возникновению anomального автоматизма. Нормализация потенциала действия восстанавливает нормальное проведение и устраняет потенциалозависимый anomальный автоматизм.

Действие антиаритмических препаратов на реполяризацию обычно обсуждается в терминах укорочения или удлинения потенциала действия и рефрактерных периодов. Однако в реальных условиях их влияние может быть значительно более сложным. Если снова обратиться к рис. 6.4, то на фрагменте в можно видеть, что лидокаин возвращает потенциал действия, обладающий двумя устойчивыми состояниями, практически к нормальному ответу с нормальными параметрами. Отмывание лидокаина вновь приводит к возникновению двух устойчивых состояний (фрагмент г). Если деполяризация ткани, развившаяся по этому типу, создает участок

с однонаправленным блоком, включенным в цепь рецркуляции, то нормализация потенциала действия, вызванная препаратом, способна прервать рецркуляторную аритмию путем устранения участка с однонаправленным блоком (см. рис. 6.8, г). Мы выявили ряд препаратов, «нормализующих» такие потенциалы действия [90].

Нарушение реполяризации может также привести к развитию электрической активности по типу медленного ответа. Например, мы установили [49], что нормальная быстрая деполяризация в начале потенциала действия способна вызвать поддерживаемую ритмическую активность на уровне фазы плато. Такая триггерная активность проводится по миокарду с низкой скоростью, что показано на рис. 6.12. В контроле (см. рис. 6.12, а, б) вызванный электрической стимуляцией потенциал действия с уровня $V_p = -83$ мВ выпускает медленную осцилляторную активность, которая превращается в спонтанные поддерживаемые потенциалы действия. Поддерживаемая вызванная ритмическая активность сохранялась до тех пор, пока через 45 мин не нанесли внутриклеточный импульс гиперполяризующего тока амплитудой 7 нА (стрелка вниз), что позволило достичь «порога» реполяризации и вернуть мембрану к потенциалу покоя (рис. 6.12, б). В этом волокне также имеются два предпочтительных устойчивых уровня потенциала: первый — уровень нормального V_p в покое и второй — несколько более высокий уровень V_m , который оказывается достаточным для развития поддерживаемого аномального автоматизма. При действии лидокаина V_p стал более отрицательным (-87 мВ), потенциал действия нормально достигал порога реполяризации, длительность потенциала действия при межстимуляционном интервале 1200 мс составляла 550 мс, а V_{\max} потенциала действия равнялась 510 В/с. Таким образом, под действием лидокаина сохранился лишь один устойчивый уровень потенциала. При отмывании лидокаина вновь быстро возникла поддерживаемая ритмическая активность (см. рис. 6.12, д, е) и препарат можно было перевести из состояния с ритмической активностью к уровню V_p путем внутриклеточного пропускания гиперполяризующего тока (стрелка на рис. 6.12, е). Механизм развития реполяризации еще остается неясным и, возможно, обусловлен одновременным уменьшением входящего фонового тока и увеличением выходящего тока.

Взаимодействие аритмогенных факторов и антиаритмических препаратов и их влияние на активные и пассивные свойства миокардиальных клеток, имеющие отношение к возбудимости и проводимости, только начали изучаться. Большинство механизмов такого взаимодействия еще не выяснены, исключения составляют результаты, полученные в исследованиях с помощью нескольких микроэлектродов, позволявших проводить дозированную электрическую стимуляцию клеток и одновременно регистрировать внутриклеточные потенциалы действия в разных участках миокарда, причем эти результаты необходимо обрабатывать с помощью быстродействующей компьютерной системы. К описанным выше воздействиям аритмогенных факторов и антиаритмических препаратов необходимо добавить их влияние на внутриклеточные активности разных ионов.

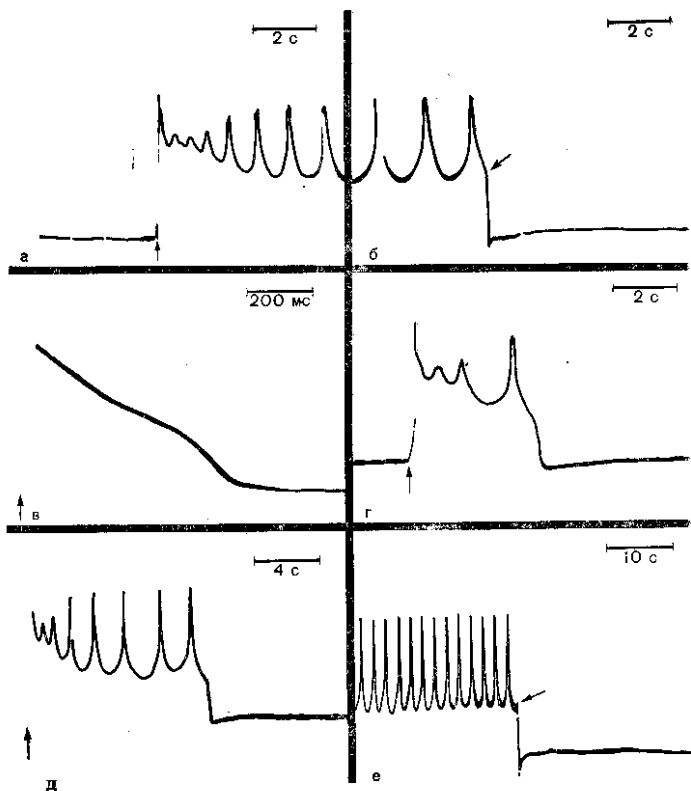


Рис. 6.12. Влияние лидокаина на триггерную самоподдерживающую ритмическую активность (ТСПА) в волокне Пуркинье в контроле (а, б), вызванный электрической стимуляцией потенциал действия запускает медленную осцилляторную активность, которая усиливается, и возникают спонтанные самоподдерживающиеся потенциалы действия. ТСПА может продолжаться в течение неопределенно длительного времени, пока не будет прекращена внутриклеточным пропусканием гиперполяризующего тока, позволяющим достичь «порога» реполяризации и вернуть потенциал мембраны к V_n . Гиперполяризующий ток подавали через 45 мин после запуска ТСПА (стрелкой показано на рис. б). Лидокаин вызывал практически мгновенное достижение «порога» реполяризации и «нормализацию потенциала действия» (в). При отмывании лидокаина (г—е) ТСПА быстро возникали вновь. По [91].

Наличие нескольких участков действия антиаритмических препаратов затрудняет их классификацию. Любую классификацию, включая предложенную нами [61, 88, 89], следует рассматривать как одну из точек зрения, которую можно использовать в качестве рабочей гипотезы для достижения более разумного понимания действия препаратов. При этом следует учитывать, что наши знания относительно изменений свойств кардиомиоцитов, отвечающих за возбудимость при действии аритмогенных факторов, очень скудны. Следует скептически относиться к любым категорическим заявлениям в литературе.

З а к л ю ч е н и е

Возбудимость сердца зависит от характеристик источника и стока, которые в свою очередь определяют распространение потенциала действия. Характеристики источника зависят от свойств активного генератора тока мембраны; характеристики стока определяются пассивными свойствами мембраны, с учетом строения ткани и геометрического расположения клеток. Несмотря на то что источник оказывает существенное влияние на возбудимость сердца и проведение потенциала действия, исследования последних лет показали, что характеристики стока имеют такое же, если не большее, значение.

Рассмотрение биофизической теории может показаться утомительным. Однако понимание ее необходимо для того, чтобы оценить, разумная ли гипотеза проверяется в экспериментальных исследованиях и целесообразна ли экстраполяция результатов на клинические условия. В силу обсуждавшихся выше причин, нам кажется, что большая часть экспериментальных исследований возбудимости сердца, проведения возбуждения, аритмогенеза и действия антиаритмических препаратов не способна адекватно учитывать следствия биофизической теории. Тем не менее определенные термины, такие как «мембраностабилизирующее действие» и «местноанестетическое действие», используются для описания действия препаратов и стали общепринятыми в экспериментальной и клинической литературе, несмотря на то что они имеют довольно мало смысла. Вероятно, эти термины привлекают своей простотой и приняты клиницистами в качестве обозначения механизма действия препаратов и достаточного объяснения антиаритмического влияния. В действительности любое воздействие этих препаратов на активные и пассивные свойства мембраны может быть как притмогенным, так и антиаритмическим, что можно оценить только при глубоком понимании фундаментальных электрофизиологических принципов.

Как было сказано во «Введении», данная глава была написана с целью на базе биофизической теории заложить у читателя некоторые основы, позволившие бы ему самостоятельно определить, какие вопросы в настоящее время уже решены, приемлемы ли современные гипотезы, и критически оценить экстраполяции, выводимые для клинической ситуации из фундаментальных лабораторных исследований. Если эта цель была достигнута, то читатель будет способен оценить всю глубину вопроса, поставленного Платоном в IV книге «Республики»: «Когда человек не знаком с основными принципами, из которых он исходит, и когда все выводы и промежуточные рассуждения базируются на том, что ему также не известно, то как может он полагать, что эта ткань условностей способна когда-либо превратиться в науку?» В настоящее время нам известны немногие из основных принципов и некоторые промежуточные результаты и мы можем осмелиться сделать лишь несколько выводов.

ным привести здесь краткое описание некоторых аспектов методики регистрации ЭКГ, перечислить условности, связанные с ее регистрацией, остановиться на таких характеристиках электрокардиографического сигнала, как комплексы, а также коротко описать, в какой форме полученная информация предстает перед исследователем.

Электроды и усилители

Схема регистрации ЭКГ с поверхности тела приведена на рис. 7.2. На рисунке показаны три места расположения электродов: на левой руке (ЛР), на левой ноге (ЛН) и на правой ноге (ПН). Функция усилителя (усил.) состоит в усилении разности потенциалов между электродами ЛН и ЛР приблизительно в 500 раз, так что на экран (Э) или на самописец можно вывести сигнал большей амплитуды. В большинстве реальных усилителей это достигается путем получения разности потенциалов между электродами ЛН и ПН, разности потенциалов между электродами ЛР и ПН и вычитания последней разности из первой. Такой подход используется для уменьшения влияния внешнего шума.

Даже в простейшей конфигурации, как показано на рис. 7.2, существует ряд проблем, связанных с регистрацией ЭКГ на поверхности тела. К ним относятся следующие: электрические характеристики места контакта электрода с кожей можно (не совсем точно) описать с помощью эквивалентной цепи, показанной на рис. 7.3. Электрическое взаимодействие между электродом и

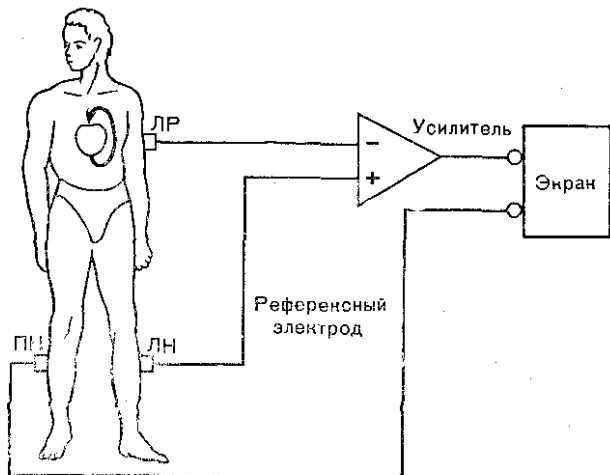


Рис. 7.2. Идеализированное подсоединение электродов для регистрации ЭКГ. Функция усилителя состоит в увеличении приблизительно в 500 раз разности потенциалов между электродами на левой руке (ЛР) и левой ноге (ЛН). Потенциал электрода, расположенного на правой ноге (ПН), используется в качестве нулевого потенциала. Сигнал выводится на экран осциллографа. Реальные усилители обычно отличаются по способу подсоединения электродов к большему от показанных здесь для достижения большей безопасности, уменьшения шума и по другим причинам.

тканью кожи приводит к возникновению потенциала, обозначенного батареей (В). Сопротивление кожи может быть представлено резистором R, расположенным между подкожной тканью и усилителем. Считают, что импеданс в месте контакта зависит от частоты сигнала, поэтому в схему включена емкость С. Один из стандартов для проверки ЭКГ-устройств имеет следующий набор номинальных значений: $R=62 \text{ МОм}$ и $C=47 \text{ пФ}$ [6].

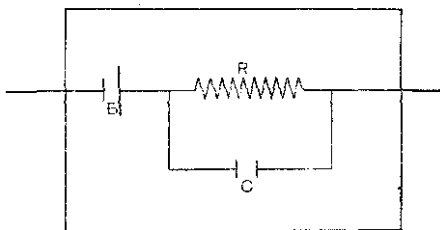


Рис. 7.3. Эквивалентная схема области контакта электрода с кожей. Эта область может быть приблизительно представлена с помощью источника напряжения (В), сопротивления (R) и емкости (С).

Хотя напряжение батареи В невелико по сравнению с обычными потенциалами, геперируемыми в теле человека, оно может быть большим по сравнению с амплитудой ЭКГ. Наличие разности потенциалов в месте контакта электрода с кожей может иметь ряд важных последствий. Во-первых, напряжение батареи В изменяется по величине до 100 мВ и зависит от конкретных условий на электроде, состава электродной пасты и состояния кожи. Более того, оно может изменяться со временем, например, при нарушении влажности кожи. Наконец, напряжение батареи может сильно флюктуировать в результате физического движения электрода. Переменный потенциал, возникающий в месте контакта электрода с кожей, накладывает как принципиальные, так и практические ограничения на точность сопоставления потенциалов, полученных в одном и том же отведении в различные моменты времени, и оказывает особенно существенное влияние при сравнении потенциалов от различных электродов. В принципе, если два электрода с совершенно одинаковыми характеристиками подсоединены к усилителю, один к положительному входу, а другой — к отрицательному, напряжения от них должны уничтожить друг друга и выходной сигнал будет равен нулю. Такая точность недостижима на практике, как можно видеть на экране ЭКГ мониторов при достаточно низкой частоте пропускания, на котором часто наблюдается сильное смещение нулевой линии ЭКГ. Для уменьшения влияния смещения по постоянному току ЭКГ-усилители практически всегда соединяются с пациентом по переменному току. Следствием такого соединения по переменному току является то, что даже в тех условиях, когда могут существовать и иметь определенное значение очень медленные изменения потенциала, как например, в случае ишемии и инфаркта, их практически невозможно зарегистрировать электрокардиографическими методами.

Согласно данным литературы, величины сопротивления R (см. рис. 7.3), измеренные в диапазоне электрокардиографических частот, находятся в диапазоне от нескольких тысяч до нескольких сотен тысяч Ом [7, 8]. Такая большая величина сопротивления

Глава 7

ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАММА И ЕЕ СВЯЗЬ С ВОЗБУЖДЕНИЕМ СЕРДЦА

Р. К. BARR (R. C. BARR)

ВВЕДЕНИЕ

Если регистрировать разность потенциалов между двумя электродами, расположенными на поверхности тела, как функцию времени, то при достаточно чувствительном усилителе можно обнаружить, что она изменяется во времени и периодичность этих изменений совпадает с частотой сердечного ритма. Около 1900 г. А. D. Waller [1] и другие исследователи, показали, что такая разность потенциалов является следствием электрической активности сердца. Точность регистрации электрокардиограмм (ЭКГ) была значительно усовершенствована при изобретении Einthoven струнного гальванометра [2]. Несмотря на громоздкость, это был первый прибор, позволяющий воспроизводить электрокардиограммы, качество которых сравнимо с получаемыми в настоящее время.

В замечательной серии экспериментов Lewis [3] измерял последовательность электрического возбуждения в предсердиях и желудочках сердца собаки. Он одновременно регистрировал ЭКГ на поверхности тела и форму сигнала, записываемого предсердными и желудочковыми электродами. Таким образом, ему удалось установить некоторые детали временной связи возбуждения предсердий и желудочков, а также его соотношение с различными частями ЭКГ.

Примеры записей ЭКГ-сигналов показаны на рис. 7.1. Принято обозначать отклонения, или зубцы, входящие в периодически повторяющийся комплекс на ЭКГ, с помощью алфавитной последовательности букв *P*, *QRS* и *T*, как показано на рисунке (рис. 7.1. внизу). Зубец *P* является следствием электрического возбуждения предсердий, комплекс *QRS* целиком отражает электрическое возбуждение желудочков, а зубец *T* возникает как отражение реполяризации желудочков. Обозначения *P*, *QRS* и *T* представляют собой способ описания наблюдаемой ЭКГ, а не метод интерпретации. Форма ЭКГ-сигнала сильно изменяется у одного и того же человека в зависимости от расположения места регистрации на поверхности тела (сравните на рис. 7.1 верхнюю и нижнюю части), а также у разных людей. Поэтому имеется специальная номенклатура для описания ЭКГ-сигналов различной формы [4].

Калибровка амплитуды на рис. 7.1 указывает, что порядок величины *P*-зубца составляет 100 мкВ, а значение комплекса *QRS* и *T*-зубца приводится в милливольтках, на отдельных регистра-

циях можно обнаружить значительные вариации амплитуды сигнала. Часто, например, на записях наблюдается некоторый шум, уровень которого достигает 30 мкВ от пика до пика, даже если при получении этих записей уделяли особое внимание электродам и их контакту с кожей. В плохо контролируемых условиях уровень шума обычно составляет 100 мкВ или больше (к сожалению). Так как измеряемый уровень шума сравним по величине с амплитудой ЭКГ-зубцов,

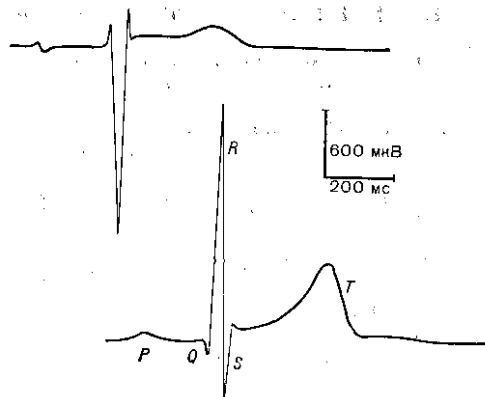


Рис. 7.1. Формы ЭКГ-сигнала. Калибровки времени и потенциала относятся к обоим записям. Видно явное отличие формы в этих 2 случаях.

наличие шума накладывает теоретическое и практическое ограничение на количество информации, которое может быть получено при интерпретации ЭКГ-сигналов.

В отсутствие шума при регистрации ЭКГ с поверхности тела можно было бы обнаружить некоторые другие зубцы, отражающие работу сердца, которые могли бы дать очень ценную информацию. Например, можно было бы зарегистрировать потенциалы, возникающие при активации проводящей системы сердца. О регистрации таких потенциалов сообщалось из ряда исследовательских лабораторий, в которых удалось снизить уровень шума путем цифрового усреднения нескольких последовательных комплексов или благодаря использованию нескольких усилителей [5]. Более того, можно было бы регистрировать низкоамплитудные зубцы, возникающие при возбуждении желудочков при некоторых типах нарушений ритма, которые в настоящее время не удается обнаружить.

РЕГИСТРАЦИЯ ЭКГ

Понимание того, что представляет собой электрокардиограмма, явилось результатом длительной разработки более совершенных методов получения высококачественных регистраций и неустанных попыток выяснить природу этих регистраций. Полное и качественное описание электрических явлений, происходящих на поверхности тела, дает возможность глубже понять их природу. И наоборот, ограничения количества и качества измерений, накладываемые такими факторами, как характеристики электродов, внешний шум или количество возможных отведений, затрудняют на практике проведение некоторых видов анализа ЭКГ, которые можно было бы, по крайней мере в принципе, осуществлять, если бы таких ограничений не было. Поэтому нам представляется важ-

ным привести здесь краткое описание некоторых аспектов методики регистрации ЭКГ, перечислить условия, связанные с ее регистрацией, остановиться на таких характеристиках электрокардиографического сигнала, как комплексы, а также коротко описать, в какой форме полученная информация предстает перед исследователем.

Электроды и усилители

Схема регистрации ЭКГ с поверхности тела приведена на рис. 7.2. На рисунке показаны три места расположения электродов: на левой руке (ЛР), на левой ноге (ЛН) и на правой ноге (ПН). Функция усилителя (усил.) состоит в усилении разности потенциалов между электродами ЛН и ЛР приблизительно в 500 раз, так что на экран (Э) или на самописец можно вывести сигнал большей амплитуды. В большинстве реальных усилителей это достигается путем получения разности потенциалов между электродами ЛН и ПН, разности потенциалов между электродами ЛР и ПН и вычитания последней разности из первой. Такой подход используется для уменьшения влияния внешнего шума.

Даже в простейшей конфигурации, как показано на рис. 7.2, существует ряд проблем, связанных с регистрацией ЭКГ на поверхности тела. К ним относятся следующие: электрические характеристики места контакта электрода с кожей можно (не совсем точно) описать с помощью эквивалентной цепи, показанной на рис. 7.3. Электрическое взаимодействие между электродом и

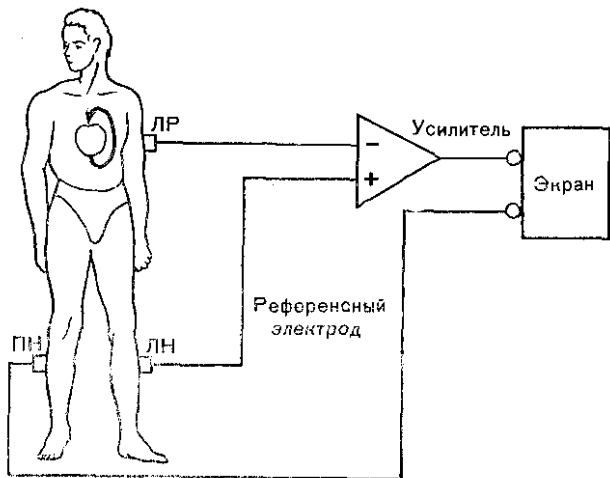


Рис. 7.2. Идеализированное подсоединение электродов для регистрации ЭКГ. Функция усилителя состоит в увеличении приблизительно в 500 раз разности потенциалов между электродами на левой руке (ЛР) и левой ноге (ЛН). Потенциал электрода, расположенного на правой ноге (ПН), используется в качестве нулевого потенциала. Сигнал выводится на экран осциллоскопа. Реальные усилители обычно отличаются по способу подсоединения электродов от показанных здесь для достижения большей безопасности, уменьшения шума и по другим причинам.

тканью кожи приводит к возникновению потенциала, обозначенного батареей (В). Сопротивление кожи может быть представлено резистором R, расположенным между подкожной тканью и усилителем. Считают, что импеданс в месте контакта зависит от частоты сигнала, поэтому в схему включена емкость С. Один из стандартов для проверки ЭКГ-устройств имеет следующий набор номинальных значений: $R=62$ МОм и $C=47$ пФ [6].

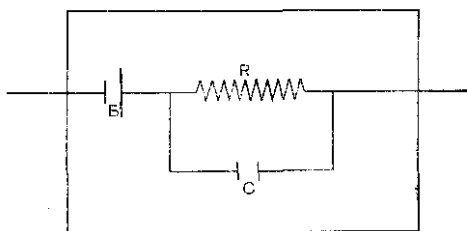


Рис. 7.3. Эквивалентная схема области контакта электрода с кожей. Эта область может быть приблизительно представлена с помощью источника напряжения (В), сопротивления (R) и емкости (С).

Хотя напряжение батареи В невелико по сравнению с обычными потенциалами, генерируемыми в теле человека, оно может быть большим по сравнению с амплитудой ЭКГ. Наличие разности потенциалов в месте контакта электрода с кожей может иметь ряд важных последствий. Во-первых, напряжение батареи В изменяется по величине до 100 мВ и зависит от конкретных условий на электроде, состава электродной пасты и состояния кожи. Более того, оно может изменяться со временем, например, при нарушении влажности кожи. Наконец, напряжение батареи может сильно флюктуировать в результате физического движения электрода. Переменный потенциал, возникающий в месте контакта электрода с кожей, накладывает как принципиальные, так и практические ограничения на точность сопоставления потенциалов, полученных в одном и том же отведении в различные моменты времени, и оказывает особенно существенное влияние при сравнении потенциалов от различных электродов. В принципе, если два электрода с совершенно одинаковыми характеристиками подсоединены к усилителю, один к положительному входу, а другой — к отрицательному, напряжения от них должны уничтожить друг друга и выходной сигнал будет равен нулю. Такая точность недостижима на практике, как можно видеть на экране ЭКГ мониторов при достаточно низкой частоте пропускания, на котором часто наблюдается сильное смещение нулевой линии ЭКГ. Для уменьшения влияния смещения по постоянному току ЭКГ-усилители практически всегда соединяются с пациентом по переменному току. Следствием такого соединения по переменному току является то, что даже в тех условиях, когда могут существовать и иметь определенное значение очень медленные изменения потенциала, как например, в случае ишемии и инфаркта, их практически невозможно зарегистрировать электрокардиографическими методами.

Согласно данным литературы, величины сопротивления R (см. рис. 7.3), измеренные в диапазоне электрокардиографических частот, находятся в диапазоне от нескольких тысяч до нескольких сотен тысяч Ом [7, 8]. Такая большая величина сопротивления

также обуславливает значительные последствия. Например, для его компенсации усилители, используемые для регистрации ЭКГ, должны иметь очень высокое входное сопротивление (т. е. им не-обходим очень маленький входной ток). При современной техноло-гии легко создать такие усилители. Однако усилители такого типа необычайно чувствительны как к самому электрокардиографиче-скому сигналу, так и особенно к шуму в диапазоне частот 50—60 Гц, который наводится на провода, идущие от больного, в ре-зультате емкостной или индуктивной связи. Шум наводится че-любой находящейся вблизи линии питания, в результате чего на-записи ЭКГ наблюдается шум с частотой 60 Гц (50 Гц). Для-уменьшения этого шума провода, идущие от усилителя к пациен-ту, обычно существенно укорачивают и располагают как можно-ближе друг к другу. Более полное обсуждение источников «навод-ки» с частотой 60 Гц (50 Гц) на записях ЭКГ и мер, которые-можно предпринять в борьбе с ними, приведено в работе [9].

Фильтры

Электрокардиографические усилители часто имеют фильтры-верхних частот, обрезающий низкочастотные сигналы, возникаю-щие вследствие флюктуаций потенциала на границе между элект-родом и кожей, и фильтр нижних частот, обрезающий высокоча-стотные сигналы несердечной природы (как например, от радио-передач). Иногда фильтры используются для подавления сетевой-«наводки». Они могут быть построены в виде аналоговых электри-ческих цепей или в виде цифровых фильтров в составе оборудо-вания для обработки ЭКГ-сигналов. В любом случае такие филь-тры следует применять с особой осторожностью, так как они мо-гут незаметно, но значительно, влиять на форму регистрируемого-ЭКГ-сигнала. Например, последовательный анализ спектра-ЭКГ-сигнала, проводящийся точно с частотой сердечного ритма-1 удар в 1 с, не может выявить никаких компонентов ЭКГ-сигна-ла, имеющих частоту ниже 1 Гц. Тем не менее фильтр верхних-частот с частотой обрезания 1 Гц может существенно изменить-регистрируемую ЭКГ. Эти изменения могут быть следствием по-больших колебаний амплитуды компонентов с частотой выше-1 Гц или фазовых сдвигов для частот в диапазоне 1—10 Гц. Ана-логичные соображения применимы для фильтров нижних частот-применяемых для удаления высокочастотного шума.

Фильтры с частотой сети (50 Гц) также до некоторой степени-изменяют форму ЭКГ-сигналов, так как компоненты с такой ча-стотой возникают и при электрической активности сердца. Более-того, все фильтры необходимо тщательно проверить на отсутст-вие склонности вызывать колебание нулевой линии, так называе-мый «звон», через десятки или сотни миллисекунд после резкого-изменения сигнала (например, после *QRS*-комплекса). При вы-боре фильтра для обработки электрокардиографических сигналов-следует помнить, что большинство из них разработано для ана-лиза сигналов, полученных у человека; в таких сигналах час-

значимыми являются только наибольшие по амплитуде компоненты. Однако наличие и положение во времени небольших зубцов на сердечных ЭКГ или на ЭКГ, полученных с поверхности сердца, часто имеют большое значение.

Соображения безопасности

Так как процесс регистрации ЭКГ требует хорошего электрического контакта между регистрирующим прибором и пациентом, предусмотрительность требует оценки риска поражения электрическим током. Такие соображения особенно необходимы в условиях, когда могут осуществляться другие электрические отведения прямо от сердца, как при катетеризации сердца. Электрокардиографический комитет Американской ассоциации по изучению сердца выдвинул для рассмотрения ряд рекомендаций для стандартизации электрокардиографического оборудования, особенно касающихся безопасности больного [10].

СИСТЕМА ОТВЕДЕНИЙ

Стандартные отведения

Так как потенциалы ЭКГ возникают между любыми двумя точками на поверхности тела с произвольно выбранной полярностью, сравнение результатов, полученных в одной лаборатории, с другими результатами, или регистраций, полученных у одного пациента, с таковыми у другого требует использования единого протокола измерения. Это понимали уже первые исследователи в области электрокардиографии. Через некоторое время появился набор измерений, называемый «стандартные отведения». В него входят три отведения от конечностей, предложенные Einthoven: отведение I — когда потенциал измеряется между левой рукой (положительный) и правой рукой; отведение II — когда потенциал измеряется между левой ногой (положительный) и правой рукой; отведение III — когда потенциал измеряется между левой ногой и левой рукой. «Прекардиальными отведениями» называется набор из шести отведений, осуществляемых от стандартных анатомически определенных областей, расположенных горизонтально с левой стороны грудной клетки [11]. Потенциал в каждой из этих областей измеряется по отношению к «центральной клемме Вильсона». Центральная клемма Вильсона образуется путем присоединения электродов от правой руки, левой руки и левой ноги к одной общей клемме через высокоомные резисторы. Грудные отведения часто называют «униполярными». Кроме того, иногда используются три «усиленных униполярных отведения из конечностей» [12]. В усиленных отведениях правая рука, левая рука и левая нога используются в качестве одного из положительных электродов соответственно, а измерения осуществляются по отношению к средней точке, составленной из двух других электродов.

Они обозначаются: aV_R , aV_L и aV_F . Три отведения из конечностей, три грудных отведения и три усиленных монополярных отведения от конечностей вместе называются стандартной ЭКГ с 12 отведениями.

Не следует придавать обозначению «стандартная ЭКГ с 12 отведениями» больше смысла, чем в него реально заложено, так как в некоторых случаях используется меньше электродов, в некоторых — больше, а иногда практикуют и другие расположения электродов. Например, векторкардиограмма (ВКГ) является особой формой ЭКГ, основанной на представлении об электрическом диполе, эквивалентном электрической активности внутрисердечных источников (см. ниже). ВКГ получают с помощью специального набора отведений. Например, «отведения Франка» [13] используются для регистрации векторкардиографии Франка.

Полная система отведений

Наиболее важным вопросом, возникающим при регистрации ЭКГ, является следующий: сколько различных отведений необходимо для получения полной информации о состоянии сердца с поверхности тела? На этот вопрос не так просто ответить, так как на каждом новом месте помещения электрода получаются в чем-то различные записи ЭКГ. И, наоборот, если два электрода поместить друг к другу, особенно в частях тела, относительно удаленных от сердца, то они дадут записи ЭКГ, весьма похожие друг на друга.

Один из путей выяснения этого вопроса состоит в определении для возможного нового отведения V_N , не является ли потенциал, зарегистрированный в этом отведении, линейной комбинацией потенциалов, наблюдаемых в других, уже используемых отведениях. Предположим, что два используемых отведения V_1 и V_2 сравниваются с новым отведением V_N . Проверка сводится к тому, существуют ли такие константы a_1 и a_2 , что

$$V_N(t) - [a_1 V_1(t) + a_2 V_2(t)] \leq N, \quad (7.1)$$

где N — амплитуда шума. Если величины a_1 и a_2 могут быть установлены, то уравнение (7.1) будет удовлетворяться для любого времени t , так что V_N может быть рассчитано на основе V_1 и V_2 с точностью до уровня шума; следовательно, нет необходимости использовать для измерений отведение V_N . Тот же подход может быть применен для сравнения нового отведения с 12 стандартными отведениями. (Интересно отметить, что если этот тест использовать для проверки необходимости добавления отведения III к отведениям I и II, то в ответе она будет отрицаться. Эта избыточность среди отведений от конечностей хорошо известна, но ею случайно проглядели.)

Если множество из 150—250 отведений сравнить друг с другом с помощью теста, аналогичного описываемому уравнением (7.1) то результат будет следующий: 20—40 отведений от нового будут достаточно для получения полного распределения потенциа-

ла на поверхности тела в зависимости от конкретного уровня шума [14, 15]. (Если константы a_1 , a_2 и т. д. подбирать путем ретроспективного анализа большого количества отведений у одного и того же больного, то всего может понадобиться лишь 3—10 независимых отведений).

ВРЕМЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оценка частотного спектра ЭКГ-комплекса полезна для выяснения требований к оборудованию, необходимому для регистрации ЭКГ. Более значительным является возможность использовать изменения частотного спектра в качестве указателя на нарушения состояния сердца, лежащего в основе изменений спектра [16]. Оценка частотного спектра зарегистрированной ЭКГ показывает, что большая часть мощности сигнала заключена при частотах ниже 100 Гц. По мере увеличения частоты мощность соответствующего компонента падает, частично вследствие наличия шума в регистрации.

Трудно (и рискованно) определить такую максимальную частоту, выше которой отсутствуют компоненты сердечного происхождения. Трудность возникает в результате того, что даже малые зубцы на записи ЭКГ, близкие по амплитуде к уровню шума, тем не менее могут иметь большое значение. Например, весь зубец P в терминах «мощности» вносит очень немного в полный ЭКГ-комплекс по сравнению со значительно большим по амплитуде комплексом $QRS-T$, генерируемым желудочками. Тем не менее несомненно важно точно регистрировать зубец P , отражающий электрическую активность предсердий. Кроме того, в некоторых исследованиях и более тонкие структуры большого QRS -комплекса, такие, как зарубки или, наоборот, сглаживания, связывали с гипертрофией или инфарктом.

Скорость отбора данных

Существующая неопределенность в отношении частотного спектра ЭКГ-сигнала аналогичным образом отражается и при цифровой регистрации. Обычно при регистрации ЭКГ с помощью оцифровки с постоянной частотой используются частоты выборки в диапазоне 200—1000 выборок в 1 с. В особых условиях применяют частоты больше или меньше указанных. Некоторые примеры записей ЭКГ, воспроизведенные после цифровой регистрации с различными скоростями выборки, приводят в работе [17].

ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАММЫ

Определение электрической активности на поверхности тела на основании электрической активности сердца называют «прямой задачей» электрокардиографии. Многие фундаментальные этапы

ее решения уже хорошо установлены [18]. Некоторые из них кратко суммированы в этом разделе (более полно электрофизиология сердца рассматривается в других главах книги).

В тканях сердечной мышцы имеется множество электрически активных клеток. Когда они находятся в состоянии покоя, в каждой из них существует разность потенциалов между цитоплазмой и внеклеточной жидкостью, равная 90 мВ, причем внутриклеточный объем заряжен более отрицательно. В ходе нормального сердечного сокращения происходит спонтанная деполяризация некоторых клеток в области СА-узла (т. е. потенциал внутри клетки становится менее отрицательным по сравнению с потенциалом вне клетки). После этого в виде цепной реакции наступает деполяризация предсердий, АВ-узла, проводящей системы желудочков и, наконец, рабочего миокарда желудочков. Через некоторое время возбужденные клетки спонтанно реполяризуются (т. е. потенциал внутри клетки снова становится относительно более отрицательным по сравнению с потенциалом вне клетки). Электрические характеристики всего сердца в большой степени определяются тем, что внутриклеточные объемы соседних клеток электрически соединены друг с другом через относительно небольшое сопротивление [19]. Поэтому о миокарде желудочков часто говорят, что он ведет себя как «электрический синцитий».

Электрическая деполяризация сопровождается прохождением тока как внутри, так и снаружи каждой возбужденной клетки. Внеклеточный ток распространяется через «объемный проводник», как называют обладающую электрическим сопротивлением среду между поверхностью сердца и поверхностью тела. Основным фактором, определяющим связь между возбуждением сердца и электрограммой на поверхности тела, является геометрическое расположение сердца в грудной клетке, так как это расположение определяет характеристики объемного проводника между отдельными участками сердца и точками на поверхности тела. На рис. 7.4 показан обвод контуров на фотографии поперечного сечения человеческого тела [20]. Из других выявленных на этом рисунке признаков особенно заметно отсутствие симметрии между расположением правого и левого желудочка по отношению к правой и левой сторонам тела и эксцентричное положение самого сердца в грудной клетке. Большую часть объемного проводника составляет ткань легких, имеющая немного более низкую проводимость, чем миокард или слой скелетных мышц, обладающие значительной анизотропией проводимости (т. е. проводимость слоя мышц отличается в различных направлениях).

Токи, проходящие внутри клеток и во внеклеточном пространстве

Схемы прохождения тока позволяют понять, каким образом возбуждение сердечных клеток позволяет зарегистрировать ЭКГ-сигналы на поверхности тела. Одна из таких схем показана на рис. 7.5. В растворе, проводящем электрический ток и играю-

щем роль объемного проводника в этом примере, расположены два «сердечных» волокна А и Б. На поверхности объемного проводника закреплены два электрода E_1 и E_2 . Аналогичная пара электродов C_1 и C_2 находится внутри объемного проводника, и, наконец, пара электродов I_1 и I_2 находится в волокне А. Измерительный прибор М определяет разность потенциалов между любой парой электродов, причем электрод с индексом 1 считается положительным.

Допустим, что в волокне А слева направо распространяется волна возбуждения, как показано на рисунке стрелкой; после этого начинается распространение возбуждения в волокне Б в противоположном направлении. Предположим, волна возбуждения в волокне А достигла середины волокна. Рассмотрим в этот момент разность между электродами I_1 и I_2 внутри волокна. Сравнение внутриклеточных потенциалов между правым и левым концами волокна А (разность потенциалов между I_1 и I_2) покажет, что правый конец заряжен отрицательно по сравнению с левым. То, что эта разность потенциалов действительно имеет

место, можно понять, учитывая следующее: левая сторона волокна А, в которой уже распространилась волна возбуждения, будет деполяризована по отношению к внеклеточному объему. Правая сторона волокна А, еще не возбужденная, остается поляризованной. Разность потенциалов во внеклеточном объеме относительно мала. Поэтому между двумя концами этого волокна будет существовать разность потенциалов около — 90 мВ.

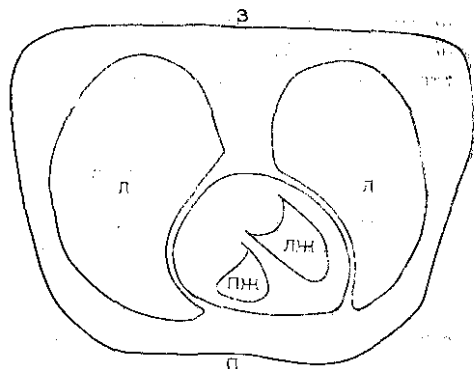


Рис. 7. 4. Схематическое изображение поперечного сечения туловища взрослого мужчины, полученное на основе томограммы. Для отведения контуров была использована фотография 26 из [20].

П — передняя поверхность; З — задняя поверхность; Л — легкие; ПЖ, ЛЖ — полости правого и левого желудочков соответственно.

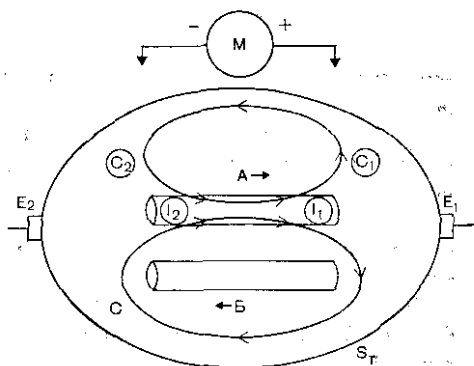


Рис. 7.5. Распространение тока внутри и снаружи идеализированных пучков А и Б. Предполагается, что в пучке А ток течет направо, а в пучке Б — налево.

I_1 и I_2 , C_1 и C_2 , E_1 и E_2 — пары регистрирующих электродов, расположенные внутриклеточно, внутри объемного проводника С и на поверхности тела соответственно; М — измеритель потенциала.

Вследствие такой внутриклеточной разности потенциалов внутри волокна будет проходить электрический ток из области с относительно высоким потенциалом к области с относительно низким потенциалом. Благодаря процессу разряда емкости мембраны и транспорту ионов через мембрану, ток, текущий внутри клетки, будет проникать также через мембрану, т. е. течь между внутриклеточным и внеклеточным объемом. Картина текущих токов может быть приблизительно представлена в виде больших замкнутых цепей, как схематично показано на рис. 7.5. Наибольшая плотность тока будет вблизи того участка мембраны, где в данный момент происходит деполяризация; однако ток меньшей плотности будет проходить через весь объем. (Полезно заметить, что взаимосвязь внутриклеточного и внеклеточного токов может быть детально проанализирована и представлена количественно [24]).

Если ввести электроды во внеклеточный объем и измерять разность потенциалов в точке C_1 по отношению к точке C_2 , тогда в момент прохождения волны возбуждения через середину волокна A C_1 будет иметь положительный потенциал по сравнению с C_2 . Обратите внимание, что полярность между внеклеточными точками C_1 и C_2 обратна полярности между внутриклеточными точками I_1 и I_2 . Можно понять, почему C_1 будет положительным по отношению к C_2 , если заметить, что ток проходит от области вблизи C_1 к области вблизи C_2 и что для объемного проводника, обладающего сопротивлением, применим закон Ома.

Электроды E_1 и E_2 соединены с объемным проводником на его поверхности. В тот момент, когда волна возбуждения проходит через середину волокна A , электрод E_1 будет иметь положительный потенциал по отношению к E_2 , точно так же, как электрод C_1 имеет положительный потенциал по отношению к электроду C_2 , т. е. распространение возбуждения к электроду E_1 (и, следовательно, от E_2) будет заряжать E_1 положительно по отношению к E_2 .

Теперь рассмотрим (гипотетическую) запись потенциала в зависимости от времени, которая бы могла быть получена, если возбуждение распространяется сначала в волокне A слева направо, а затем в волокне B справа налево (рис. 7.6). Потенциал на E_1 по отношению к E_2 нанесен на график по вертикальной оси, а время показано по горизонтальной оси. Сигнал содержит отклонения в положительную и в отрицательную стороны. Отклонения в положительную сторону обусловлено распространением возбуждения по волокну A , как было сказано выше. Отклонения в отрицательную сторону обусловлено распространением возбуждения по волокну B в противоположном направлении. На записи показан суммарный эффект от возбуждения обоих волокон. Такая запись дает информацию, например, о времени распространения возбуждения по волокну A , которому соответствует ширина отклонения в положительную сторону.

Реальную ЭКГ можно понять (качественно) на основании концепций, представленных на рис. 7.5 и 7.6. Поверхность объема раствора соответствует поверхности тела, электрически возбуди-

мые волокна соответствуют электрической активности сердечной мышцы, а запись на рис. 7.6 и является «электрокардиограммой». Естественно, трактовка реальной ЭКГ таким способом является чрезмерным упрощением, так как структура сердца сложна и в отношении геометрической формы, и в отношении электрических свойств, когда несколько различных участков сердца могут активироваться одновременно. Кроме того, в действительности объем ткани между сердцем и поверхностью тела не является однородным в отношении проводимости и анизотропии. Тем не менее одним из наиболее замечательных фактов, касающихся связи электрокардиограммы с возбуждением сердца, состоит в том, что такая упрощенная концепция действительно часто обеспечивает качественное объяснение экспериментальных и клинических наблюдений.

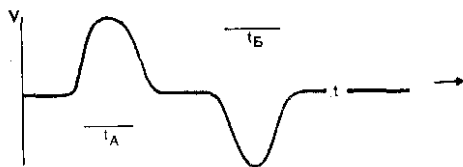


Рис. 7.6. Гипотетическая форма сигнала, который мог бы быть зарегистрирован при возбуждении сигнала пучка А, а затем пучка В.

V — потенциал; t — время; А (В) — время, в течение которого возбужден пучок А (В).

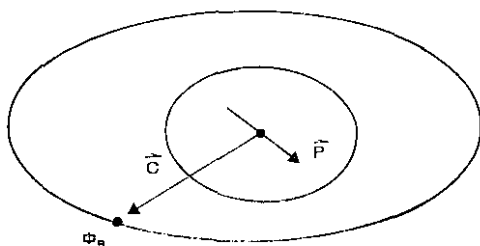


Рис. 7.7. Модель эквивалентного диполя.

Вектор \vec{p} представляет собой диполь, генерирующий электрический ток, «эквивалентный» всей сердечной мышце, если наблюдение проводить по поверхности тела. Вектор отведения \vec{c} связывает \vec{p} с конкретной точкой b на поверхности тела. Потенциал $\Phi(b)$ измеряется в точке b .

Однодипольная модель

Математически более строгий подход к концептуально упрощенному представлению сердца как простого источника тока, расположенного внутри однородного объемного проводника, представлен на схеме на рис. 7.7. На рисунке электрические свойства сердца представлены в виде «вектора среды» \vec{p} . Геометрическая взаимосвязь между источниками тока в сердце и точкой регистрации на поверхности тела описывается «вектором отведения» \vec{c} [22]. В этой модели потенциал в точке b на поверхности тела $\Phi(b)$ вычисляется как скалярное произведение векторов \vec{c} и \vec{p} :

$$\Phi(b) = \vec{c} \cdot \vec{p} = c_x p_x + c_y p_y + c_z p_z. \quad (7.2)$$

\vec{p} = вектор сердца = (p_x, p_y, p_z) ; \vec{c} = вектор отведения = (c_x, c_y, c_z) . Изменения, происходящие во внутрисердечных источниках электрических сигналов, соответствуют изменениям вектора сердца \vec{p} .

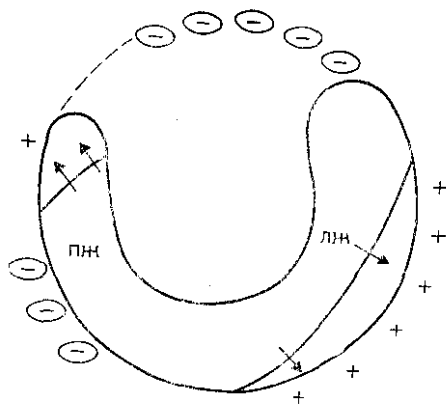
Электрическая и геометрическая взаимосвязь между дипольным источником в сердце и конкретной точкой на поверхности тела описывается вектором отведения \vec{s} .

Особое удобство этой модели состоит в том, что она позволяет выявить и разделить изменения ЭКГ, происходящие вследствие нарушения последовательности распространения возбуждения в сердце или других отклонений электрофизиологической активности сердца, которые возникают в результате изменений в месте прикрепления электродов к поверхности тела или других нарушений в объемном проводнике. Различные последовательности распространения возбуждения в сердце соответствуют различным последовательностям изменений вектора \vec{p} , причем все векторы отведений \vec{s} остаются без изменений. И, наоборот, та же последовательность электрических событий в сердце, наблюдаемая в различных точках на поверхности тела, соответствует изменению вектора отведения \vec{s} без изменения в последовательности переходов вектора сердца \vec{p} .

Важно понимать, что вектор сердца \vec{p} представляет собой суммарное действие всех электрически активных участков сердца в любой момент времени. Они могут иметь разную интенсивность электрического сигнала и быть сложно распределены в пространстве. Вектор сердца \vec{p} , состоящий из влияния всех этих областей, не является физической реальностью; также его величину невозможно измерить непосредственно. Аналогично этому каждый вектор отведения сложным образом зависит от свойств объемного проводника, расположенного между воображаемым вектором сердца и конкретной точкой на поверхности тела. А в этом случае на вектор отведения влияет не только геометрическое расстояние от точки регистрации до вектора сердца, но также и электрические свойства объемного проводника, находящегося между ними.

Одно время некоторые исследователи считали, что результаты регистрации электрической активности сердца с поверхности тела могут быть количественно описаны с помощью однодипольной модели. Полученные в настоящее время серии экспериментальных результатов позволили выяснить, что такая точка зрения является ошибочной. Электрокардиографические явления, происходящие на поверхности тела, слишком сложны, чтобы их можно было полностью объяснить с помощью такой простой модели. Более того, принципиальная невозможность определить вектор сердца на основе прямых регистраций электрических потенциалов внутри и вокруг сердца уменьшила в последние годы популярность этой модели, так как легче оказалось понять результаты прямых регистраций потенциалов сердца. Тем не менее однодипольная модель остается полезной для наиболее простого обобщения большого количества разнообразной информации, получаемой из ЭКГ, регистрируемой с поверхности тела, достаточной для получения

Рис. 7.8. Схематическое изображение поперечного сечения миокарда правого и левого желудочка сердца без межжелудочковой перегородки. Сплошные линии, проведенные в миокарде левого и правого желудочков, обозначают изохроны, а знаки «+» и «-» обозначают знак потенциала, регистрируемого на замкнутой поверхности вокруг возбужденного сердца.



первоначальной оценки основных характерных черт проведенной регистрации ЭКГ. Эта модель является основой векторкардиографии.

Изохроны и распределение потенциалов в сердце

Наиболее адекватный способ изучения электрических явлений, происходящих в сердечной мышце, и их регистрации на ЭКГ на поверхности тела состоит в записи последовательности возбуждения сердца с помощью эпикардиальных и интрамиокардиальных электродов [23, 24] и измерении распределения потенциалов внутри и на поверхности самого сердца [25]. На рис. 7.8 схематично показаны результаты, которые могут быть получены при таких измерениях. На схеме (см. рис. 7.8) сплошными линиями в областях левого и правого желудочков отмечен гипотетический фронт волны возбуждения, каким он мог бы быть в один из моментов времени. Полная последовательность возбуждения сердца может быть описана в виде серии таких линий, называемых часто «изохронами», так как каждая линия изображает фронт волны возбуждения в сердце путем соединения всех точек, в данный момент времени начинается возбуждение. Предполагается (см. рис. 7.8), что широкий фронт волны возбуждения распространяется через стенку левого желудочка, а более узкий фронт распространяется по стенке правого желудочка.

Величины потенциалов, измеренные перед продвигающимися фронтами возбуждения, обычно положительны, а потенциалы электродов, находящихся за фронтами волны возбуждения, обычно имеют отрицательную величину. Полярность обозначена знаками «+» и «-» вокруг границ фигуры. Однако следует осторожно оценивать величины потенциалов, во-первых, потому, что реальный фронт волны возбуждения распространяется в трех измерениях, и потому, что потенциал в каждой точке зависит от положения обоих фронтов. Пиковые значения потенциалов, измеренных на эпикардиальной поверхности сердца, находятся в диа-

пазоне от нескольких милливольт до нескольких десятых милливольт.

Представление возбуждения сердца в виде распределения потенциалов имеет существенные преимущества. Например, то, что информация собирается от всех точек регистрации во время всего сердечного цикла, а не ограничивается каким-либо одним моментом времени. Таким образом, распределения потенциалов пригодны для описания электрических событий, происходящих при реполяризации, а также для описания случаев частичного перекрывания событий, происходящих при реполяризации, с событиями, происходящими при предшествующей деполяризации. Более того, они позволяют измерить электрические явления, происходящие при патологии сердечной мышцы, когда она не способна к быстрой и полной деполяризации.

Математические модели, позволяющие связать потенциалы сердца с потенциалами на поверхности тела

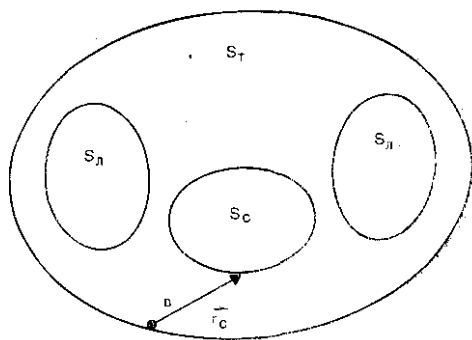
Если происходящие в сердце события описаны в терминах потенциалов сердца, их связь с потенциалами, регистрируемыми в различных точках внутри объемного проводника или на поверхности тела, может быть описана математически с невысокой точностью. Miller, Geselovitz [26] разработали компьютерную модель, которая исходит непосредственно из внутриклеточных потенциалов. Другие методы расчетов могут основываться на уравнении 7.3, интегральном уравнении, связывающем потенциалы в точке наблюдения $\Phi(r)$ с распределением потенциалов на замкнутой поверхности вокруг сердца, вокруг легких и вокруг поверхности тела.

$$\begin{aligned}
 \Phi(r) = & -\frac{\sigma_L}{4\pi\sigma_T} \int_{S_C} \Phi_C \frac{\vec{r}_C \cdot \vec{n}_C}{r_C^2} dS_C \\
 & -\frac{\sigma_L}{4\pi\sigma_T} \int_{S_C} \Phi_C \frac{\nabla \Phi_C \cdot \vec{n}_C}{r_C} dS_C \\
 & +\frac{\sigma_L - \sigma_M}{4\pi\sigma_T} \int_{S_L} \Phi_L \frac{\vec{r}_L \cdot \vec{n}_L}{r_L^2} dS_L \\
 & +\frac{\sigma_M}{4\pi\sigma_T} \int_{S_T} \Phi_T \frac{\vec{r}_T \cdot \vec{n}_T}{r_T^2} dS_T
 \end{aligned} \tag{7.3}$$

На рис. 7.9 схематично показаны описанные выше замкнутые поверхности. Точка наблюдения В показана на границе поверхности S_T , представляющей собой поверхность тела. Внутрисердечные источники электрического тока заключены внутри поверхности S_C . Предполагается, что вокруг «легких» можно провести ограничивающие поверхности S_L и разграничить однородные об-

рис. 7. 9. Схематическое изображение поперечного сечения туловища человека, на котором показаны границы между областями с различными электрическими свойствами (см. уравнение 7.3 и сравните с рис. 7.4).

M_T — граница раздела между поверхностью тела и воздухом; S_L — границы, окружающие легкие; C — граница, окружающая активные источники в сердце. Для упрощения считают, что внутри каждой области электрические свойства ткани не изменяются.



части с разной проводимостью внутри и снаружи ограничивающих поверхностей. Потенциалы на поверхностях сердца, легких и тела обозначены φ_C , φ_L и φ_T соответственно. Проводимость в областях легких, областях мышц и в точке наблюдения обозначены символами l , m и t . Прямые, проведенные из точки наблюдения к сердцу, легкому и поверхности тела, обозначены r_C , r_L и r_T соответственно.

Активные внутрисердечные источники. Изучение уравнения (7.3) показывает, как различные величины влияют на потенциал в точке наблюдения В. Два первых интеграла в уравнении (7.3) берутся по поверхности S_C , окружающей активные внутрисердечные источники тока. Но эти два интеграла зависят от потенциалов на поверхности S_C (φ_C), градиентов потенциала на этой поверхности ($\nabla\varphi_C$), связанных с прохождением тока через ограничивающую поверхность, и расстоянием r_C от места расположения наблюдателя до каждого из сегментов на поверхности сердца. Интегрирование по поверхности необходимо, так как на потенциал в одной точке на поверхности грудной клетки влияет распределение потенциалов по всему сердцу. Большие значения имеют потенциалы тех точек на S_C , которые расположены ближе к В, поэтому подынтегральное выражение разделено на r_C .

Легкие и другие неоднородные структуры. Третий интеграл берется по поверхности, отделяющей область легких с низкой проводимостью от области мышц с высокой проводимостью. Заметьте, что этот интервал влияет на величину потенциала, измеряемую в точке В на поверхности тела, даже в том случае, если она находится не внутри легких, не на их поверхности и если все источники электрического тока расположены внутри поверхности S_C .

Влияние поверхности тела. Наконец, четвертый интеграл берется по поверхности тела. На необходимость этого интеграла указывает то обстоятельство, что форма и размеры всей поверхности раздела между телом и воздухом влияют на потенциал, измеренный в любой конкретной точке на поверхности тела.

Компьютерные модели. Интегрирование уравнения (7.3) слишком сложно, чтобы его можно было осуществить вручную, особенно учитывая неправильную геометрическую форму всех упомянутых структур, поэтому в ряде исследований для проведения та-

ких расчетов были использованы компьютерные модели. В общем случае такие расчеты требуют замены интегрирования на числовое суммирование и приближения непрерывного распределения потенциалов набором их величин в некоторых конкретных точках рассматриваемой поверхности.

Основным результатом проведения таких расчетов было выявление следующих моментов [27]: 1. Измеренное экспериментально распределение потенциалов на эпикардальной поверхности действительно может быть использовано для расчета потенциалов на поверхности тела, основываясь на концепциях уравнения (7.3). Если рассчитанные потенциалы сравнить с потенциалами, регистрируемыми на поверхности тела, то наблюдается одна и та же качественная последовательность событий. 2. Рассчитанное распределение потенциалов количественно аппроксимирует измеряемое распределение потенциалов на поверхности тела с точностью первого порядка в том (и только в том) случае, если учитывается влияние поверхности тела. 3. Наблюдается систематическое количественное расхождение между рассчитанными и измеренными распределениями потенциалов на поверхности тела, если при расчетах принято однородное распределение проводимости в объемном проводнике, имеющем правильные размеры и форму. Эти расхождения уменьшаются, если учитывать при расчетах внутренние неоднородности таких структур, как легкие [28], хотя и без этого можно провести достаточно убедительное моделирование. Особенно важное значение может иметь взаимодействие влияний легких и скелетных мышц.

Сравнение с дипольной моделью. Некоторое представление о существовании значительно отличающихся моделей, используемых при оценке взаимоотношения между электрическими событиями в сердце и на поверхности тела, можно получить при сравнении рис. 7.7 и рис. 7.9 или при сравнении уравнения (7.2) и уравнения (7.3). В первом случае простая модель, легко представляемая, вполне достаточна для подразделения изменений ЭКГ на вызванные событиями, происходящими в сердце, и зависящие от расположения точки наблюдения на поверхности тела. Эта простая модель дает способ объединить всю массу регистраций с поверхности тела. Однако она совершенно неудовлетворительна для количественного описания распределения потенциалов на поверхности тела и слишком неточна относительно способности описывать электрические события внутри сердца, если они происходят в разных его участках. Кроме того, в ней предполагается нереальный случай однородного объемного проводника.

И наоборот, модель и математическое описание с помощью уравнения (7.3) являются более реальными. В нее можно вводить сложные электрические события в сердце. По крайней мере в принципе учитываются сложные свойства объемного проводника. Существует более тесная связь между величинами, рассчитываемыми на математической модели, и физически реальными, измеряемыми величинами. Однако ограничением этой более сложной модели является то, что повышенная сложность затрудняет

оценку ее результатов вручную или умозрительно; для того, чтобы преодолеть эти трудности, необходимо использование компьютерных численных методов моделирования. Более того, хотя уравнение (7.3), сложнее уравнения (7.2), оно тем не менее включает в себя различные упрощающие предположения по отношению к реальным сердцам и реальным объемным проводникам. Например, предполагается, что может быть построена простая поверхность раздела, отделяющая однородную область «легких» от однородной области «мышц».

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАММ

Определение электрических событий в сердце на основании регистраций, осуществляемых на поверхности тела, называется «обратной задачей» электрокардиографии.

Цели и фундаментальные ограничения

Получение характеристик возбуждения сердца по ЭКГ служит самым различным целям: ЭКГ используются для мониторинга работы нормального сердца (у космонавтов), для выявления и классификации аритмий, проводящихся в течение нескольких часов или дней (мониторирование аритмий), для выявления ИБС, вызванной коронарным атеросклерозом (электрокардиограммы при нагрузке), как метод классификации других видов заболеваний сердца, необязательно имеющих электрофизиологическое происхождение (анализ формы ЭКГ в покое), для предсказания величин электрических событий в сердце, которые могут быть измерены, в целях исследования и в клинике (как в случае хирургического лечения WPW-синдрома). Как и следовало ожидать, основные принципы и специальные процедуры, используемые в каждом из этих случаев, могут заметно отличаться друг от друга.

Разумеется, невозможен подход, допускающий «практически такое же число интерпретаций, сколько существует специалистов по электрокардиографии», как сказал Miller [29], однако действительно имеют место принципиальные трудности, связанные с интерпретацией ЭКГ. Самая основная из них состоит в том, что «хотя знание биоэлектрических источников потенциала, формы тела и проводимости тканей однозначно определяет (по крайней мере в принципе) потенциалы на поверхности тела, обратное утверждение неверно...» [30]. Это физическое ограничение означает, что даже в принципе невозможно выяснить свойства электрических источников в сердце, генерирующих ЭКГ, на основе одной лишь этой ЭКГ. Вместо этого ЭКГ следует использовать вместе с другой, дополнительной информацией, ограничивающей диапазон возможных интерпретаций. Такой дополнительной информацией может быть физическая модель электрических источников в сердце, подборка ранее зарегистрированных ЭКГ у того же

большого, состояние сердца которого было установлено независимыми методами, или же какая либо другая информация.

Эта фундаментальная трудность дополняется еще одной, связанной с первой: теория электрических цепей утверждает, что по мере того, как наблюдатель удаляется от любой группы электрических источников, картина электрических изменений, происходящих при движении вокруг этих источников, становится все менее отчетливой. В электрокардиографии вследствие этого явления различные последовательности возбуждения сердца, создающие совершенно различные распределения потенциалов на поверхности эпикарда, могут вызывать совершенно одинаковые распределения потенциалов на поверхности тела, где они не могут быть различены из-за наличия шума на регистрациях. (Например, при использовании многодипольных моделей сердца возбуждение правого желудочка путали с возбуждением перегородки.)

Типы утверждений

Разнообразные утверждения, принципиально отличающиеся по характеру, называются «интерпретациями» ЭКГ. Некоторые из этих утверждений просто идентифицируют характерные черты на зарегистрированной ЭКГ, такие как идентификация зубца *P* или комплекса *QRS*. В других интерпретациях приводятся численные величины, полученные на непосредственном основании зарегистрированных данных, например, интервал между зубцом *P* и комплексом *QRS*, длительность комплекса *QRS* и т. д.

В некоторых интерпретациях делается вывод о состоянии внутрисердечных источников тока, являющихся, вероятно, причиной электрических явлений, наблюдаемых на поверхности тела. В таких утверждениях используют формальную или неформальную модель взаимосвязи между электрическими событиями в сердце и на поверхности тела. Наконец, существуют интерпретации, связывающие вновь полученные ЭКГ с физиологическими изменениями или типами заболеваний сердца. Изменения, лежащие в основе возникновения наблюдаемых явлений, могут быть, а могут и не быть электрофизиологическими в первую очередь, но предполагается, что они приводят к изменению электрофизиологического состояния сердца; такие электрофизиологические изменения в последующем вызывают изменения на ЭКГ. Например, электрофизиологические отклонения происходят при острой гиперкалиемии [31]. Когда изменения на ЭКГ основаны на таких случаях, необходимо делать очень много предположений.

Понимание того, что интерпретации осуществляются с помощью утверждений различных типов, особенно важно при решении вопроса о справедливости интерпретации. Более конкретно, справедливость утверждений первых двух типов очень легко проверить, в то время как справедливость утверждений относительно электрических событий внутри сердца или физиологических изменений, вызывающих их, установить очень трудно.

Статистическая классификация

Наиболее распространенной основой для интерпретации ЭКГ является систематическое сравнение новых регистраций с коллекцией записей, полученных ранее на популяции больных с различными сердечными заболеваниями. Такая классификация может осуществляться с помощью формальной статистической процедуры или же это может быть неформальным процессом, происходящим в мозге опытного электрокардиографиста. В любом случае выбранная для сравнения популяция должна быть достаточно большой, чтобы можно было учесть наблюдаемую естественную вариабельность ЭКГ от индивидуума к индивидууму, как отмечали Ripberger [32] и другие авторы. Более того, требуется объективная независимая документация классификаций ЭКГ на популяции, используемой для сравнения. Если говорят, что у больного «блокада правой ножки предсердно-желудочкового пучка», то этот диагноз должен быть подтвержден при помощи некоторых других методов, а не только типичной для него картиной на ЭКГ. Статистическая классификация в настоящее время почти нигде не проводится вследствие разработки компьютерных программ, которые часто можно просто купить. Хорошо известна, например, программа ИБМ-Боннер. Целью такой программы является быстрая интерпретация ЭКГ с тем же качеством как если бы эту работу выполнял опытный специалист, т. е. программы не предназначены для разработки каких-либо новых принципов интерпретации.

На статистическую классификацию ЭКГ обычно прямо или косвенно влияют априорные вероятности различных результатов. Эти величины определяют вероятность того, что еще до момента регистрации ЭКГ «правильный диагноз» будет попадать в одну из возможных категорий, входящих в классификацию. Априорные вероятности зависят от конкретной ситуации: так, большое число ЭКГ, зарегистрированных в популяции в целом при помощи метода случайной выборки, отличается по этому показателю от многочисленных ЭКГ, зарегистрированных в больнице, в блоке интенсивной терапии. В обоих случаях будет иметь место отличие от ЭКГ, зарегистрированных в детской кардиологической клинике. Методика использования априорных вероятностей и способы расчета их значений остаются спорным вопросом.

Физический и физиологический анализ

ЭКГ можно анализировать, основываясь на нашем понимании электрических взаимосвязей между электрическими событиями в сердце и ЭКГ, зарегистрированной на поверхности тела, принимая во внимание ограниченный круг электрических событий, которые возможны, учитывая электрофизиологию сердца. Существует несколько подходов получения такой интерпретации, связанных с особой методикой проведения измерений на поверхности тела.

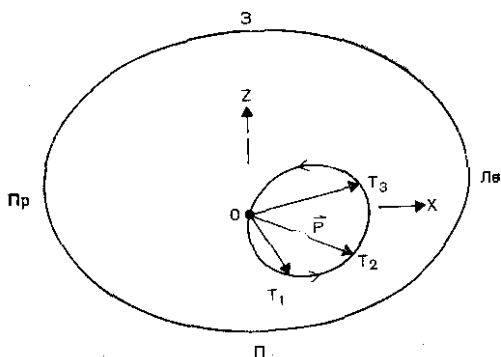
Формы записей ЭКГ. Записи ЭКГ, содержащие изменение потенциала во времени, особенно полезны для выявления и классификации временных признаков электрической активности сердца. Идентификация зубцов, возникающих при возбуждении желудочков (*QRS*-комплекс), относительно проста. Используя только эту информацию, можно выявить и классифицировать многие виды аритмий сердца.

Интерпретацию источника каждого компонента зубца на записи потенциала в зависимости от времени не очень просто получить. Отчасти это объясняется тем, что электрические источники в любом участке сердца вносят определенный вклад в изменения потенциала, зарегистрированные на единственной записи, полученной с поверхности тела. Поэтому нельзя некоторым простым способом выделить участки электрической активности в сердце, которые являются источниками событий, обнаруживающимися на конкретных записях ЭКГ с поверхности тела. (Относительно тщательной интерпретации формы записей ЭКГ, особенно в клинических условиях, существует множество литературных публикаций, рассмотрение которых выходит за рамки этой главы.)

Векторкардиограммы. Концептуальной основой векторкардиографии является представление электрической активности сердца в виде одного дипольного источника тока [см. рис. 7.6 и уравнение (7.2)]. Считают, что дипольный источник тока «эквивалентен» реальным источникам в сердце в том смысле, что такой источник обуславливает возникновение потенциалов на поверхности тела, близких к реально наблюдаемым. Преимущество векторкардиографии заключается в использовании информации с поверхности тела для определения и ясного представления о пространственной ориентации (или изменений пространственной ориентации) электрической активности сердца. (Такая информация о пространственной ориентации не представлена непосредственно на записи изменений потенциала во времени.) Однако, так как электрическое возбуждение и реполяризация являются распределенными в пространстве по всему объему электрически активной ткани предсердий и желудочков, источник тока в виде одного диполя не является «эквивалентным» реальным источником электрической активности сердца.

Векторкардиографическая система отведений измеряет и показывает электрическую активность сердца в терминах геометрических координат, например, вдоль осей x , y и z . На рис. 7.10 показана векторкардиографическая точка отсчета внутри овала представляющего собой горизонтальное поперечное сечение туловища. В моменты времени T_1 , T_2 и T_3 эквивалентное дипольное представление электрической активности сердца представлено в виде трех векторов p . Геометрическое место точек концов векторов образует петлю в горизонтальной плоскости, которая и называется векторкардиограммой (ВКГ) в плоскости. Часто приводят две или три векторные петли для демонстрации траектории эквивалентного диполя во всех трех геометрических плоскостях. При

Рис. 7.10. Идеализированная векторкардиографическая петля (в горизонтальной плоскости). Для моментов времени T_1 , T_2 и T_3 показаны три соответствующих вектора, выходящих из начала координат. Каждый такой вектор представляет собой проекцию эквивалентного диполя \vec{p} в данный момент времени на плоскость X—Z. При соединении концов таких векторов друг с другом получается петля (векторкардиограмма). Окружающий петлю овал обозначает поверхность тела.



стальное внимание уделяется и другим системам представления векторкардиографической информации, таким как полярокардиограммы.

Важным теоретическим основанием векторкардиографии являются уравнения Габора — Нельсона [33], показывающие как рассчитать x-, y- и z-компоненты эквивалентного вектора на основе информации, полученной на поверхности тела, но не указывающие места расположения этого вектора в объемном проводнике.

Одиночный движущийся диполь. При другом способе физического представления решения обратной задачи электрокардиографии основной упор делается на моменты времени, в которые, как считают, электрическая активность сосредотачивается в одном месте. В этих моделях также используется одиночный диполь для характеристики активности сердца, но при этом определяются также и расположение вектора. Расположение вектора выбирают так, чтобы получить наилучшее приближение изменений потенциалов, регистрируемых на поверхности тела, часто используя при этом уравнения многополюсного сдвига Гезеловица [34]. Эти уравнения описывают способ нахождения такого положения диполя внутри объемного проводника, при котором объясняется большая часть информации, полученной на поверхности тела. После этого можно провести сравнение рассчитанного положения диполя с независимыми измеренными реальными участками, на которых выявляется электрическая активность сердца. Например, положение диполя в ранней фазе возбуждения можно сравнить с участком, где в первую очередь возникает возбуждение, выявленное с помощью эпикардиальных или погруженных электродов [35, 36]. Такой подход ориентирован на относительно узкую область электрических событий в сердце, пространственно сосредоточенных в одном месте, и поэтому он обычно не применим к большинству случаев нормальных и аномальных последовательностей возбуждения и деполяризации сердца.

Распределения потенциалов и картирование поверхности тела.

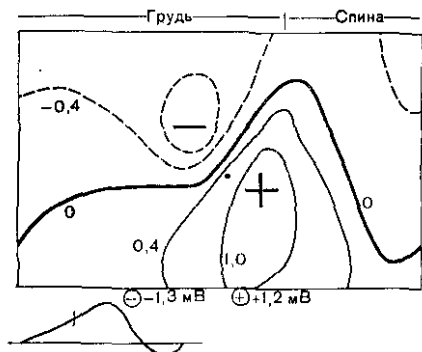


Рис. 7.11. Распределение потенциалов на поверхности тела (карта поверхности).

Приблизительно $\frac{2}{3}$ карты соответствуют грудной поверхности, а оставшаяся треть справа — спине. Распределение потенциалов показано для некоторого одного момента времени, отмеченного черточкой на комплексе QRS опорной ЭКГ, показанной внизу. Сплошными линиями отмечены изопотенциальные кривые для положительных потенциалов, прерывистыми — для отрицательных. Толстой линией отмечена кривая нулевого потенциала, совпадающего с потенциалом центральной терминали Вильсона. Значения наибольшего и наименьшего потенциалов, наблюдающиеся в данный момент времени, приведены снизу под картой, а положения максимума и минимума отмечены на карте большими зна-

ками «+» и «-». Возникновение такого распределения можно при грубом приближении объяснить, полагая, что области отрицательного потенциала сосредоточены на те участки стенки желудочков сердца, которые уже возбуждены, а положительные потенциалы на участки стенки, где продолжает развиваться возбуждение.

Электрические явления в сердце на поверхности тела можно описать в виде полного распределения потенциалов (часто называемого «карты поверхности»). Каждая такая «карта» дает зависимость потенциала от точки на поверхности тела, в основном на груди и спине. Например, на рис. 7.11 показано, как могла бы выглядеть карта поверхности, полученная через 25 мс после начала комплекса QRS. Левые $\frac{2}{3}$ площади карты отражают величины потенциала на груди, правая треть — на спине. Линии соединяют точки с равным потенциалом. Сплошными линиями показаны потенциалы, положительные по отношению к центральной клемме Вильсона, а пунктирными — отрицательные потенциалы. В показанный момент времени потенциалы в правой верхней части груди отрицательны, а потенциалы в левой части груди и вокруг нижней части туловища положительны. Таким образом могут быть представлены карты для всех моментов времени в течение всего сердечного цикла.

В большинстве случаев сбор и графическое изображение электрокардиографической информации на поверхности тела в такой форме очень трудно сделать вручную, если исключить длительные, кропотливые процедуры [37]. Поэтому развитие такой формы представления электрокардиографической информации началось лишь в последнее время, одновременно с появлением цифровых компьютерных методов для хранения, обработки и графического вывода этой информации [38].

Интерпретация электрической активности сердца, основанная на полных распределениях потенциалов, имеет несколько существенных преимуществ. Во-первых, имеется уверенность в том, что не упущены никакие значимые данные, которые могли бы быть получены при измерениях на поверхности тела в других точках; во-вторых, изучение всего распределения потенциалов помогает умозрительно коррелировать картину распределения потенциалов, наблюдаемую на поверхности тела, с существующей на по-

поверхности эпикарда, или с картиной прохождения тока, которая могла бы иметь место внутри миокарда и объемного проводника. Нет необходимости сводить представление к такой элементарной модели, как модель одного диполя. Таким образом, карты сами по себе естественным образом помогают интерпретировать локальные электрические явления в миокарде в соответствии с их реальным распределением по всему сердцу. Например, на рис. 7.11 наличие отрицательных потенциалов, проектирующихся на поверхность эпикарда правого желудочка, и положительных потенциалов, проектирующихся на эпикард левого желудочка, позволяет предположить, что в данный момент времени распространение возбуждения по правому желудочку в основном закончено, в то время как оно еще продолжается в левом желудочке.

Вследствие того что получение полного распределения потенциалов в действительности требует довольно сложного оборудования, по-видимому, маловероятно, чтобы такой метод регистрации заменил традиционные методы в повседневной работе. Однако в настоящее время системы для получения карт распределения потенциалов имеются в продаже и поставляются в числе другого лабораторного оборудования для регистрации и обработки данных, так что получение и графическое представление карт распределения потенциалов является простым техническим процессом.

С использованием распределений потенциалов связаны значительные теоретические преимущества в оценке электрических явлений в сердце, основанных на физических законах протекания электрического тока по объемному проводнику. Например, расчет результатов на основании уравнения (7.3) требует интегрирования по всей поверхности тела; осуществление этого интегрирования требует знания величин потенциалов в каждой точке на поверхности. Так же важно учитывать, что существуют фундаментальные трудности в оценке электрических явлений в сердце на основании измерений, проведенных на поверхности тела, и то, что существенные изменения внутри сердца могут вызывать лишь небольшие изменения на поверхности тела, поэтому дополнительная информация, получаемая из полного распределения потенциалов на поверхности тела (по сравнению с информацией, получаемой при векторкардиографии или с помощью стандартных отведений), может обеспечить возможность количественной дифференциальной диагностики при оценке потенциалов сердца.

Карты поверхности тела используются для определения электрических явлений в сердце с помощью нескольких типов его физических моделей. Например, Holt и соавт. провели обратные расчеты, используя многодипольную модель сердца [39]. В этой модели использовалось несколько диполей для представления электрической активности различных участков миокарда желудочков. Для каждого диполя рассчитывалась его активность как функция времени, интерпретировавшаяся как электрическая активность данного участка миокарда. Интегралы активности каждого вектора по времени использовались для оценки электрической активности вблизи каждого диполя. Например, одним из

тестов было определение наличия или отсутствия гипертрофии данной области миокарда. Так как активность диполей, представляющих каждый сегмент миокарда, невозможно непосредственно измерить, трудно проверить справедливость расчетов в экспериментах на животных.

Другие математические способы использовались для оценки реальных распределений потенциалов на поверхности эпикарда, исходя из его распределений на поверхности тела [40]. Распределение потенциалов на поверхности эпикарда сравнивали с распределениями потенциалов, зарегистрированными на поверхности эпикарда с помощью имплантируемых электродов. Расчетные распределения потенциалов оказались в основных чертах близки к реальным, полученным при измерениях. Легко распознаются изменения последовательности возбуждения сердца, возникающие при искусственной стимуляции сердца в различных точках. Однако рассчитанные и измеренные распределения потенциалов отличаются по многим второстепенным признакам. Частично эти отличия могут быть следствием упрощений, допущенных при расчетах для получения результатов. Например, в проведенных расчетах использовали упрощенные модели объемного проводника, который предполагается однородным и изотропным. В настоящее время остается неясным, до какой степени могут быть улучшены количественные оценки электрических явлений в сердце, если использовать улучшенные физические модели.

Заключение

Количество ЭКГ, регистрируемых ежегодно, по-видимому, превышает 50 000 000. Записи ЭКГ стало так просто и обычно получать, что многие верят, что их интерпретация в терминах электрических явлений, происходящих в сердце, уже давно полностью установилась.

Это далеко не так. Несмотря на то что установлено множество взаимосвязей между электрическими явлениями, происходящими на поверхности тела и в сердце, которые имеют фундаментальное значение, еще очень много неясного в отношении электрических явлений, наблюдаемых на поверхности тела. Частично это обусловлено малым количеством данных относительно электрической активности целого сердца. Особенно это ограничение относится к электрическим явлениям внутри стенок желудочков, которые очень непросто оценить с помощью электродов без существенного повреждения ткани, а также к случаям врожденных аномалий сердца. Следует ожидать, что понимание электрических явлений в сердце будет все больше расширяться по мере проведения новых измерений, в точности отражающих изменения, происходящие во время таких событий, как аритмии сердца. Благодаря усовершенствованию моделей прохождения тока по неоднородному объемному проводнику, каким является тело человека, и получению более точной информации об электрической активности сердца, возможно, вскоре изменится способ интерпретации электрокардио-

грамм, регистрируемых на поверхности тела, а также термины явлений, происходящих при возбуждении и реполяризации сердца.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Waller A. D.* On the electromotive changes connected with the beat of the mammalian heart and of the human heart in particular. — *Philos. Trans. R. Soc. [B]*, 1889, vol. 180, p. 169—194.
2. *Einthoven W., Fahr G., De waart A.* Über die Richtung und manifeste Grosse der Potentialschwankungen im menschlichen Herzen und über den Einfluss der Herzlage auf die Form des Electrocardiogramms. — *Pflüg. Arch. ges. Physiol.*, 1913, vol. 150, p. 275—315. Translated: *Amer. Heart J.*, vol. 40, p. 163—211.
3. *Lewis T., Rotschild M. A.* The excitatory process in the dog's heart. II. The ventricles. — *Philos. Trans. R. Soc. [B]*, 1915, vol. 206, p. 181—226.
4. *Goldman M. J.* Principles of clinical electrocardiography, 10th edn. Los Altos CA: Lange Medical.
5. *Flowers N. C., Shvartsman V., Kennelly B. M.* et al. Surface recording of His-Purkinje activity on an every-beat basis without digital averaging. — *Circulation*, 1981, vol. 63, p. 948—952.
6. *Association for the Advancement of Medical Instrumentation: Standard for diagnostic ECG devices.* Arlington VA: AAMI (1901 Nort Fort Meyer Drive, Suite 602, Arlington VA 22209).
7. *Spach M. S., Bart R. C., Havstad J. W., Long E. C.* Skin electrode impedance and its effect on recording cardiac potentials. — *Circulation*, 1966, vol. 34, p. 649—656.
8. *Schmitt O. H., Almasi J. J.* Electrode impedance and voltage offset as they affect efficacy and accuracy of VCG and ECG measurement. — In: *Proceedings of the 11th international vectorcardiography symposium.* Amsterdam: North-Holland, 1970.
9. *Huhra J. C., Webster J. G.* 60-Hz interference in electrocardiography. — *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 1973, vol. 20, p. 91—101.
10. *American Heart Association Committee on Electrocardiography: Electrical safety standards for electrocardiographic apparatus.* — *Circulation*, 1980, vol. 61, p. 669.
11. *Wilson F. N., Macleod A. G., Barker P. S.* The order of ventricular excitation in bundle branch block. — *Amer. Heart. J.*, 1932, vol. 7, p. 305—330.
12. *Goldberger E.* Unipolar lead electrocardiography and vector-cardiography. Philadelphia: Lea and Febiger, 1953.
13. *Frank E.* An accurate clinically practical system for spatial vectorcardiography. — *Circulation*, 1956, vol. 13, p. 737—749.
14. *Barr R. C., Spach M. S., Herman-Giddens G. S.* Selection of the number and positions of measuring locations for electrocardiography. — *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 1971, vol. 18, p. 125—138.
15. *Lux R. L., Smith C. R., Wyatt R. F., Abildskov J. A.* A limited lead selection for estimation of body surface potential maps in electrocardiography. — *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 1978, vol. 25, p. 270—276.
16. *Goldberger A. L., Bhargava V., Froelicher V., Covell J.* Effect of myocardial infarction on high-frequency QRS potentials. — *Circulation*, 1981, vol. 64, p. 34—42.
17. *Barr R. C., Spach M. S.* Sampling rates required for digital recording of intracellular and extracellular cardiac potentials. — *Circulat. Res.*, 1977, vol. 55, p. 40—48.
18. *McFee R., Baule G. M.* Research in electrocardiography and magnetocardiography. — *Proc. IEEE*, 1972, vol. 60, p. 290—322.
19. *De Mello W. C.* Intracellular communication in cardiac muscle. — *Circulat. Res.*, 1982, vol. 51, p. 1—9.
20. *Eycleshymer A. C., Schoemaker D. M.* A cross-section anatomy. New York: Appleton—Century—Crofts, 1911.
21. *Spach M. S., Barr R. C., Johnson E. A., Kootsey J. M.* Cardiac extracellular potentials: analysis of complex wave forms about the Purkinje network in dogs. — *Circulat. Res.*, 1973, vol. 33, p. 465—473.

22. *Burger H. C., Van Milian J. B.* Heart vector and leads. I, II, III. — *Brit. Heart. J.*, 1946, vol. 8, p. 157; 1947, vol. 154; 1948, vol. 10, p. 229.
23. *Scher A., Young A.* The pathway of ventricular depolarization in the dog. — *Circulat. Res.*, 1956, vol. 4, p. 461—469.
24. *Durrer D., Van Dam R., Freud M. G.* et al. Total excitation of the heart. — *Circulation*, 1970, vol. 41, p. 899—912.
25. *Spach M. S., Barr R. C., Lanning C. F., Tucek P. C.* Origin of body surface QRS and T wave potentials from epicardial potential distributions in the intact chimpanzee. — *Circulation*, 1977, vol. 55, p. 268—278.
26. *Miller W. T. II, Geselowitz D. B.* Simulation studies of the electrocardiogram II. Ischemia and infarction. — *Circulat. Res.*, 1978, vol. 43, p. 315—323.
27. *Ramsey M. III, Barr R. C., Spach M. S.* Comparison of measured torso potentials with those simulated from epicardial potentials for ventricular depolarization and repolarization in the intact dog. — *Circulat. Res.*, 1977, vol. 41, p. 660—672.
28. *Rudy V., Plonsey R.* A comparison of volume conductor and source geometry effects on body surface and epicardial potentials. — *Circulat. Res.*, 1980, vol. 46, p. 283—291.
29. *Meiler F. L.* In: A new coding system for electrocardiography. Amsterdam: Excerpta Medica, EO Robles de Medina, 1972.
30. *Plonsey R.* Bioelectric phenomena. New York: McGraw-Hill, 1969, p. 202—275.
31. *Hurst J. W., Logue R. B., Schlant, Wenger N. K.* The heart, 4th edn. New York: McGraw-Hill, 1978, p. 309.
32. *Pipberger H. V., Schneiderman M. A., Klingeman J. D.* The love-at-first-sight effect in research. — *Circulation*, 1968, vol. 38, p. 822—825.
33. *Gabor D., Nelson C. V.* Determination of the resultant dipole of the heart from measurements on the body surface. — *J. Auppl. Physiol.*, 1954, vol. 25, p. 413—416.
34. *Geselowitz D. B.* Two theorems concerning the quadrupole applicable to electrocardiography. — *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 1965, vol. 12, p. 164—168.
35. *Ideker R. E., Bandura J. P., Larsen R. A.* et al. Localization of heart vectors produced by epicardial burns and ectopic stimuli. — *Circulat. Res.*, 1975, vol. 36, p. 105—112.
36. *Savard P., Roberge F. A., Perry J. B., Nadeau R. A.* Representation of cardiac electrical activity by a moving dipole for normal and ectopic beats in the intact dog. — *Circulat. Res.*, 1980, vol. 46, p. 415—425.
37. *Taccardi B.* Distribution of heart potentials on the thoracic surface of normal human subjects. — *Circulat. Res.*, 1963, vol. 12, p. 341—352.
38. *Rush S., Lepeschkin.* Body surface mapping of cardiac fields. *adv. Cardiol.* 10, Karger, 1974.
39. *Holt J., Barnard A. C. L., Lynn M.* The study of the human heart as a multiple dipole source II. Diagnosis and quantization of left ventricular hypertrophy. — *Circulat. Res.*, 1969, vol. 40, p. 697—710.
40. *Barr R. C., Spach M. S.* Inverse calculations of QRS-T epicardial potentials from body surface potential distributions for normal and ectopic beats in the intact dog. — *Circulat. Res.*, 1978, vol. 42, p. 661—675.

Глава 8

МЕДЛЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ДЕЙСТВИЯ И СВОЙСТВА МЕДЛЕННЫХ КАНАЛОВ МИОКАРДИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

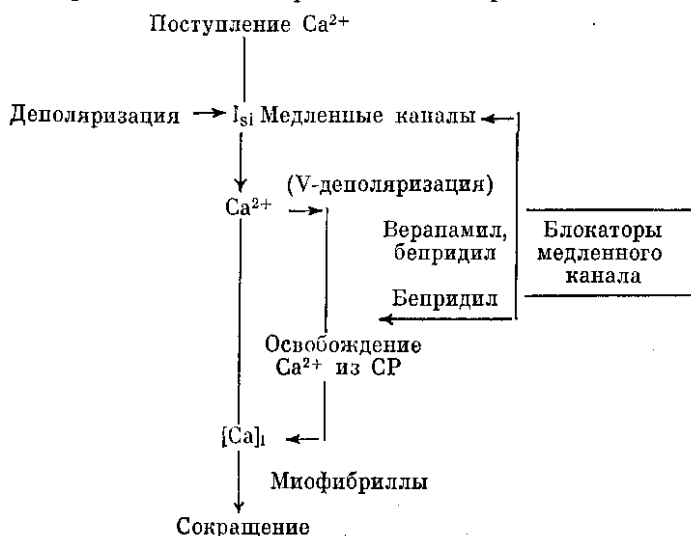
Н. СПЕРЕЛАКИС (N. SPERELAKIS)

МЕДЛЕННЫЕ КАНАЛЫ И ИХ РОЛЬ В ПОСТУПЛЕНИИ ИОНОВ Ca^{2+}

Гормоны и нейромедиаторы играют важную роль в регуляции силы сокращения сердца. Последняя регулируется поступлением ионов Ca^{2+} через клеточную мембрану во время потенциала действия (ПД) в процессе электромеханического сопряжения, что представлено на схеме 8.1. Поступление ионов Ca^{2+} в кардиомиоциты происходит через медленные каналы клеточной мембраны, открывание ворот которых зависит от потенциала и от времени. Вход Ca^{2+} вызывает повышение концентрации Ca^{2+} в миоплазме ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) до уровня, необходимого для активации сократительных белков (например, до 10^{-5} M), и стимулирует освобождение дополнительной порции Ca^{2+} из СР по механизму, предложенному

Схема 8.1. Основные стадии процесса электромеханического сопряжения при поступлении ионов Ca^{2+} через клеточную мембрану во время потенциала действия (ПД)

Электромеханическое сопряжение в миокардиальных клетках



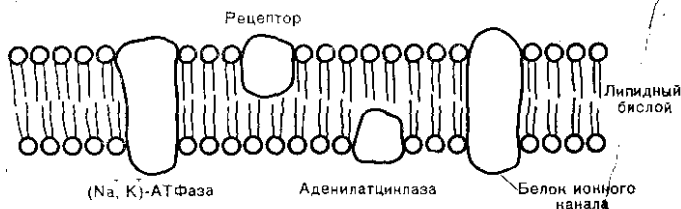


Рис. 8.1. Схематическая иллюстрация модели клеточной мембраны Сингера—Николсона, представляющая мембрану в виде липидного бислоя, в котором плавают молекулы белков. Некоторые белковые молекулы встраиваются только в один лепесток бислоя, к ним относятся рецепторы нейромедиаторов на внешней поверхности и аденилатциклазный комплекс — на внутренней. Некоторые крупные молекулы проходят через всю толщину мембраны, как например, белки, образующие ионные каналы. По [58].

Фабриато и Фабриато [53]. В этой главе вкратце суммируются и обсуждаются некоторые из важнейших свойств медленных каналов миокардиальных клеток, особенно их зависимость от метаболизма и регуляции их работы цАМФ. Кроме того, кратко обсуждаются медленные потенциалы действия и их возможная роль в возникновении аритмий сердца.

Кроме медленных каналов, в миокардиальных клетках имеют место и другие типы потенциалозависимых каналов, включая быстрые натриевые каналы и несколько типов калиевых каналов. Кроме того, существует по крайней мере, два типа потенциалозависимых каналов, зависящих от ионов Ca^{2+} , другой — избирательный для ионов K^+ ($g_{K(Ca)}$), другой — со смешанной проводимостью для Na^+ и K^+ ($g_{Na, K(Ca)}$). Ионный канал каждого из этих типов представляет собой особый белок, плавающий в липидном бислое матрикса клеточной мембраны (рис. 8.1). В каждом белке имеется заполненный водой центральный канал для прохождения ионов. Катион, проходящий через такой ионселективный канал, по-видимому, связывается с двумя или тремя отрицательно заряженными участками связывания во время своего прохождения через канал по направлению своего электрохимического (электрический плюс концентрационный) градиента. Потенциалозависимые быстрые натриевые каналы и медленные каналы имеют активационные ворота (A, m или d) в центральной части канала и инактивационные ворота (i, h или f) на внутренней поверхности мембраны (рис. 8.2).

По сравнению с быстрыми натриевыми каналами у медленных каналов более медленная кинетика, т. е. они ведут себя так как будто их ворота открываются, закрываются и восстанавливаются менее быстро. Кроме того, ворота медленных каналов функционируют в диапазоне менее отрицательных потенциалов, т. е. их пороговый потенциал и диапазон потенциалов инактивации находятся выше (менее отрицательны) (рис. 8.3). Эти два типа каналов, переносящие внутрь направленный (деполяризующий) ток, блокируются также разными веществами: тетродотоксин (TTX) блокирует быстрые натриевые каналы (связываясь в

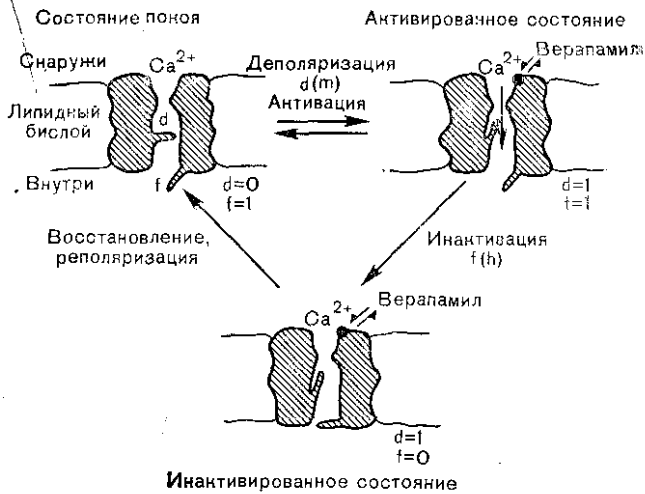


Рис. 8.2. Модель трех гипотетических состояний медленного канала, построенная по аналогии с теорией Ходжкина—Хаксли для быстрого натриевого канала. В состоянии покоя: $d(m)$ — ворота закрыты; $f(h)$ — ворота открыты ($d=0, f=1$). Деполаризация до уровня порогового потенциала переводит медленный канал в активное состояние, когда d -ворота быстро открываются, а f -ворота еще не успевают закрыться ($d=1, f=1$). Активированный канал спонтанно инактивируется, т. е. переходит в инактивированное состояние вследствие закрывания f -ворот ($d=1, f=0$). После реполяризации мембраны канал реактивируется, т. е. переходит из состояния инактивации в состояние покоя и снова может быть активирован. Показано, что ионы Ca^{2+} связываются во входном отверстии канала, и когда ворота открываются (активное состояние канала), они открываются от мест связывания и входят в канал по направлению электрохимического градиента. Показано также место предполагаемого связывания верапамила во входном отверстии медленного канала (темный кружок), находящегося в активном состоянии или в состоянии инактивации, который блокирует, таким образом, активированный канал или замедляет процесс реактивации, т. е. перехода из состояния инактивации в состояние покоя. По [2].

входном отверстии канала с внешней стороны мембраны и действует как обычная физическая пробка), но не влияет на медленные каналы; и наоборот, кальциевые антагонисты, такие как верапамил, нифедипин и дилтиазем, блокируют медленные каналы, практически не влияя на быстрые натриевые каналы.

В отношении ионной селективности медленные каналы делятся на три типа: Ca^{2+} , Na^+ и Ca^{2+}/Na^+ (рис. 8.4). Каналы Ca^{2+}/Na^+ -типа пропускают как ионы Ca^{2+} , так и ионы Na^+ , возможно с конкуренцией между ними. Медленные Ca^{2+}/Na^+ -каналы имеются в миокардиальных клетках взрослых особей морской свинки и у цыплят [1]. Наличие чисто Ca^{2+} -селективного медленного канала обнаружено в гладкомышечных клетках артерий [2] и в предсердных клетках морской свинки [3]. Примеры селективных почти исключительно для ионов Na^+ медленных каналов обнаружены в клетках тканей сердца двух-трехдневных эмбрионов цыплят [4]. Так как верапамил и D-600 (метоксильной производ-

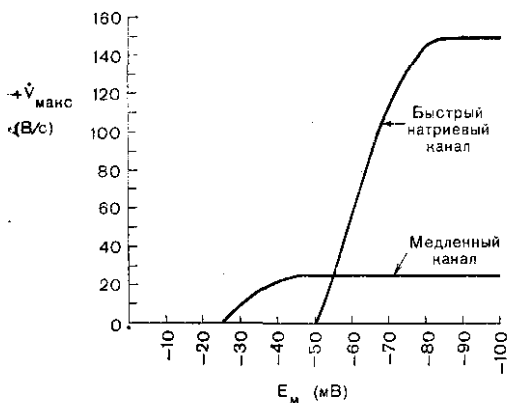


Рис. 8.3. График, отражающий различное поведение быстрых натриевых и медленных натрий-калиевых каналов в зависимости от потенциала. Показана максимальная скорость нарастания потенциала действия ($+V_{\text{макс}}$) в зависимости от потенциала покоя для нормального потенциала действия в миокарде (зависящем от тока, входящего по быстрым натриевым каналам) и для медленного потенциала действия (зависящем от медленного входящего тока), развивающегося в клетках в том случае, когда быстрые натриевые каналы блокированы с помощью ТТХ или при деполяри-

зации приблизительно до -45 мВ. $+V_{\text{макс}}$ является мерой плотности входящего тока (при условии, что все остальные свойства мембраны, как например, емкость, остаются неизменными), зависящей в свою очередь от числа каналов, способных активироваться при возбуждении. По [58].

водной верапамила) блокируют все три типа медленных каналов, то такие кальциевые антагонисты более уместно называть «блокаторами медленных каналов». Так как поступление ионов Ca^{2+} внутрь сердечных клеток во время возбуждения происходит через Ca^{2+} или медленные $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -каналы, кальциевые антагонисты часто называют «блокаторами поступления кальция». Так как поступление ионов Ca^{2+} в клетки определяет силу сокращения, кальциевые антагонисты частично или полностью разобщают возбуждение и сокращение. Медленные каналы обнаружены также в узловых клетках (СА- и АВ-узлах) и в волокнах Пуркинье, а также в клетках рабочего миокарда.

Lee, Tsien [5] в экспериментах по фиксации потенциала на dialизируемых изнутри одиночных кардиомиоцитах, изолированных из сердца взрослых особей (желудочка сердца морской свинки), показали, что реверсия тока, протекающего через медленные кальциевые каналы, происходит при деполяризующих ступеньках потенциала большой амплитуды и что выходящий ток через медленные каналы переносится ионами K^{+} (движение ионов Ca^{2+} в выходящем направлении также может осуществляться через медленные каналы). D-600 блокирует прохождение тока в любом направлении. Этот последний момент следует помнить при рассмотрении всех эффектов кальциевых антагонистов.

ДЕЙСТВИЕ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ, ГОРМОНОВ И ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ИНОТРОПНЫХ АГЕНТОВ

Ряд положительных инотропных агентов вызывает увеличение числа медленных каналов, имеющих в мембране миокардиальных клеток. Это действие может быть основным объяснением

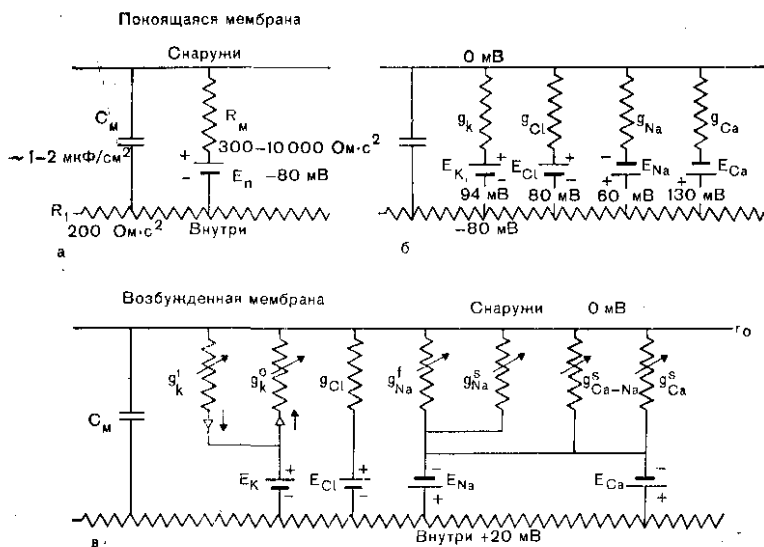


Рис. 8.4. Эквивалентные электрические схемы мембраны миокардиальной клетки в состоянии покоя (а, б), в возбужденном состоянии (в).

а — мембрана представлена в виде резистивно-емкостной цепи, причем сопротивление мембраны (R_M) включено параллельно емкости мембраны (C_M). Потенциал покоя (E_p) задается батареей с напряжением -80 мВ, включенной последовательно с сопротивлением мембраны R_M ; **б** — сопротивление мембраны подразделено на 4 компонента, каждый из которых определяется проводимостью для одного из 4 основных ионов: K^+ , Cl^- , Na^+ и Ca^{2+} . Эти компоненты представляют собой полностью независимые пути проникновения ионов через мембрану в состоянии покоя. Равновесный потенциал (например, E_K) зависит только от установившегося распределения ионов данного вида и рассчитывается на основании уравнения Нернста. Равновесные потенциалы для каждого вида ионов подключены последовательно соответствующей проводимости. Потенциал покоя, равный -80 мВ, определяется этими равновесными потенциалами и относительными проницаемостями; **в** — более полная эквивалентная цепь, учитывающая зависимость проводимостей от потенциала. Кроме того, цепь включает в себя по крайней мере два разных типа калиевой проводимости (обозначенных здесь как g_K^o и g_K^i). Треугольники, включенные в цепь последовательно с этими типами калиевой проводимости, обозначают выпрямительные устройства, причем вершина треугольника показывает направление наименьшего сопротивления ионному току. Существует также два различных типа натриевой проводимости. Одним из них является проводимость по быстрым натриевым каналам (g_{Na}^f), другим — проводимость по более медленным каналам (g_{Na}^s). Кроме того, имеется также путь медленной неспецифической проводимости, определяемой током как ионов Na^+ , так и ионов Ca^{2+} , которые, возможно, конкурируют друг с другом. Избирательная кальциевая проницаемость ($g(Ca)^s$) также является медленной. Стрелки, подчеркивающие сопротивления, отмечают переменные сопротивления, зависящие от мембранного потенциала и времени. По [58].

механизма увеличения сократимости сердца, так как количество ионов Ca^{2+} , поступающих в клетку через медленные каналы, определяет силу сокращения. Входящие ионы Ca^{2+} прямо увеличивают $[Ca^{2+}]_i$ (которая активирует миофибриллы) и приводят к дальнейшему увеличению $[Ca^{2+}]_i$ косвенно, запуская осво-

бождение Ca^{2+} из внутриклеточных запасов, хранящихся в саркоплазматическом ретикулуме (СР). Например, входящие в клетку ионы Ca^{2+} вызывают освобождение большего количества ионов Ca^{2+} согласно гипотезе вызванного ионами Ca^{2+} освобождения ионов Ca^{2+} , выдвинутой Fabiato, Fabiato [6]. Блокирование медленных каналов, а значит, и поступления ионов Ca^{2+} в клетки кальциевыми антагонистами (такими как верапамил, нифедипин, дилтиазем, Mn^{2+} , Co^{2+} и La^{3+}) угнетает или полностью блокирует сокращение без существенного влияния на нормальный быстрый ПД, т. е. сокращение разобщается с возбуждением.

К положительным инотропным агентам, влияющим на число медленных каналов, способных открываться при возбуждении, относятся: активаторы β -адренорецепторов (такие как изопротеренол и норадреналин), гистамин (H_2 -рецептор) и метилксантин (такие как кофеин, теофиллин и метилизобутилксантин). Действие этих веществ проявляется очень быстро, максимальный эффект часто развивается на 1—3-й минуте. Действие катехоламинов блокируется β -блокаторами, а действие гистамина блокируется блокаторами H_2 -рецепторов (но не антагонистами H_1 -рецепторов [7]). Кроме того, аналогичный эффект наблюдается при действии экзогенного дибутирил-цАМФ, но его действие развивается более медленно и максимальный эффект достигается к 1—3-й минуте [8]. Ангиотензин II также стимулирует медленные каналы миокардиальных клеток [9].

Reuter и соавт. недавно при помощи метода фиксации потенциала на фрагментах мембраны (patch-clamp) и регистрации активности одиночных медленных кальциевых каналов культивируемых клеток сердца зародышей крысы показали [10], что изопротеренол увеличивает среднее время открытого состояния канала и уменьшает интервалы между пачками активности (группировками открытых состояний канала); проводимость одиночного канала не увеличивается под действием изопротеренола. Следовательно, усиление общей максимальной проводимости по медленным каналам (g_{sl}), вызываемое изопротеренолом, может быть обусловлено наблюдаемым удлинением среднего времени жизни открытого состояния каждого канала, а также увеличением числа каналов, участвующих случайно в образовании проводимости.

РАЗВИТИЕ МЕДЛЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ

Один из методов определения влияния веществ на медленные каналы заключается, во-первых, в блокировании быстрых натриевых каналов и возбудимости тетродотоксином (ТТХ) или в их инаktivации потенциалом путем частичной деполяризации клеток (например, до -40 мВ) при повышении $[\text{K}^+]_0$ (например, 25 мМ). Если затем добавить, например, катехоламины, быстро увеличивающие число медленных каналов, способных к активации, то электрическая стимуляция приведет к возникновению мед-

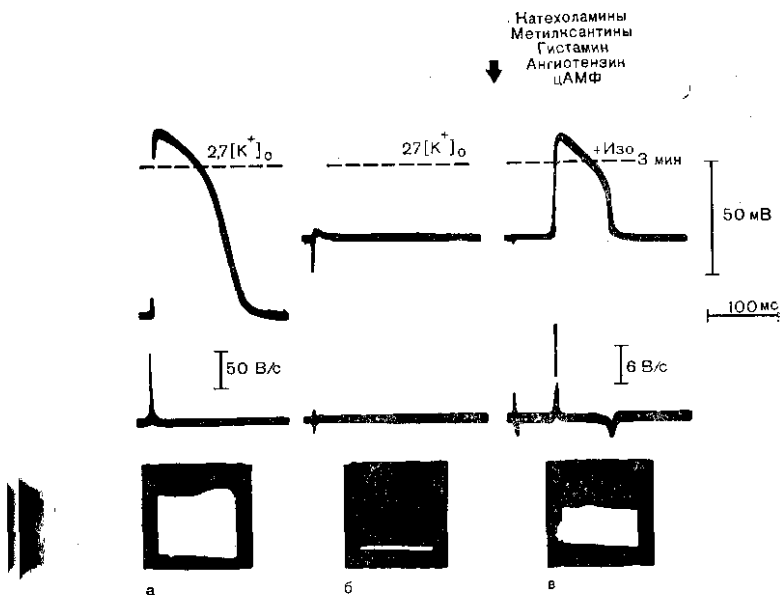


Рис. 8.5. Характеристики медленных ответов, зарегистрированных в тканях изолированного сердца морской свинки в условиях перфузии раствором, содержащим катехоламины, метилксантины, гистамин, ангиотензин II или циклический аденозинмонофосфат (цАМФ). Быстрые натриевые каналы инактивированы путем повышения концентрации K^+ (верхние записи). Внутриклеточные потенциалы (V от t), зарегистрированные в миокардиальных клетках стенки желудочка (средние записи). Первая производная потенциала по времени (dV/dt); амплитуда отклонения dV/dt вверх представляет собой максимальную скорость нарастания потенциала действия ($\dot{V}_{\text{макс}}$). В самом низу приведены непрерывные записи силы сокращения, зарегистрированные на самописце с медленной скоростью.

а — нормальный «быстрый» потенциал действия (перфузия раствором Рингера, содержащим 2,7 мМ K^+); б — перфузия раствором Рингера, содержащим 27 мМ K^+ вызывает деполяризацию клеток до -40 мВ и приводит к инактивации быстрых натриевых каналов. В этих условиях миокард невозможно возбудить даже при десятикратном повышении интенсивности электрической стимуляции по отношению к порогу в нормальном растворе; в — электрическая активность миокардиальных клеток быстро восстанавливается в виде медленных ответов (кальциевый потенциал действия с $\dot{V}_{\text{макс}} = 15$ В/с) при добавлении в раствор изопроterenола (Изо) (10^{-7} М), ибупрофена (3 мМ), гистамина (10^{-8} М) или ангиотензина II (10^{-7} М), причем максимальный эффект достигается через 1–3 мин. Дибутирил-цАМФ (10^{-4} М) также вызывает появление медленных ответов, сопровождающихся сокращением, но максимальный эффект достигается медленнее, через 15–30 мин. Такие медленные ответы всегда сопровождаются сокращением. Модифицировано из [55].

можно нарастающего ПД с овершутом более 0 мВ («медленный ответ»), который напоминает фазу плато нормального быстрого ПД [3, 8] (рис. 8.5). В генерации медленного ПД принимают участие как кальциевый, так и натриевый входящие токи (рис. 8.6), и этот ПД сопровождается сокращением, имеющим почти такую же величину, как и нормальное сокращение [11]. Медленный ПД блокируется теми же веществами, что и медленный входящий ток, включая Mn^{2+} , La^{3+} , верапамил, Д-600, нифедипин и дилтиазем [11, 12].

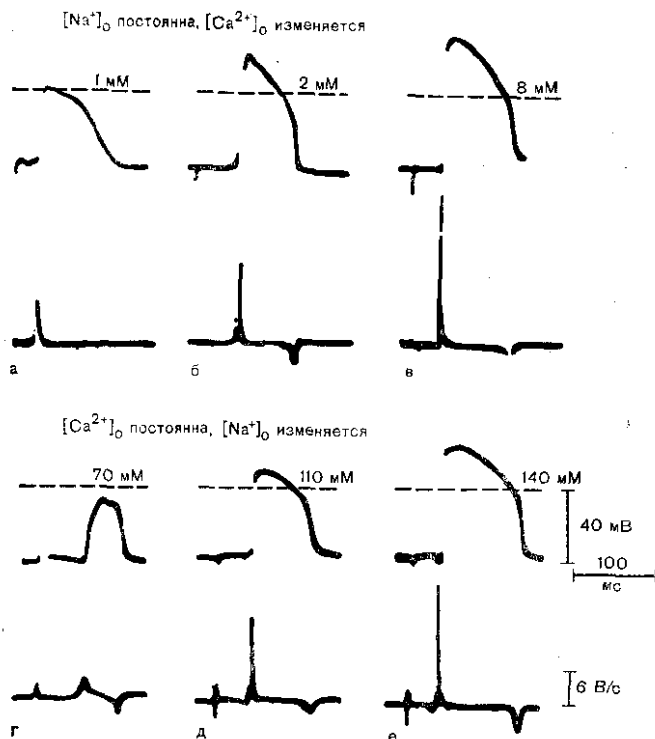


Рис. 8.6. Зависимость медленных ответов в миокарде желудочка сердца морской свинки от $[Na^+]_o$ и $[Ca^{2+}]_o$. Быстрые натриевые каналы инактивированы деполаризацией при добавлении 27 мМ K^+ в раствор Рингера. Медленные ответы вызывали на фоне изопроterenола ($10^{-6}M$).

а — в — изменение $[Ca^{2+}]_o$ при постоянной $[Na^+]_o = 140$ мМ. При повышении $[Ca^{2+}]_o$ от 1 мМ (а) до 2 мМ (б) увеличивается овершут и максимальная скорость нарастания ($\dot{V}_{\text{макс}}$ медленного ответа; г — е — изменение $[Na^+]_o$ при постоянной $[Ca^{2+}]_o = 2$ мМ. Снижение $[Na^+]_o$ со 140 мМ (е) до 110 мМ (д) и до 70 мМ (г) вызывало уменьшение амплитуды и $\dot{V}_{\text{макс}}$ медленного ответа. Нижняя запись на каждом фрагменте — dV/dt ; $\dot{V}_{\text{макс}}$ — на этих записях амплитуда отклонения кривой вверх. По [55].

ОСОБЫЕ СВОЙСТВА МЕДЛЕННЫХ КАНАЛОВ МИОКАРДИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Зависимость от цАМФ

Циклический АМФ некоторым образом принимает участие в работе медленных каналов (табл. 8.1) [8, 11, 13—15]. Впервые это было доказано в 1972 г. в работах Shigenobu, Sperelakis [8] и Tsien и соавт. [16]. Гистамин и β -адренергические агонисты после связывания с соответствующими специфическими рецепторами приводят к быстрой стимуляции аденилатциклазы, в результате чего повышается уровень цАМФ. Метилксантины проникают внутрь миокардиальных клеток и ингибируют фосфодиэстеразу,

Таблица 8.1. Механизмы регуляции входа Ca^{2+} в миокардиальные клетки и силы сокращения миокарда. Регуляция осуществляется изменением доли медленных каналов, находящихся в фосфорилированном состоянии. Дефосфорилированные каналы электрически неактивны

-
- I. Управление внешними воздействиями. Обычно передается через рецепторы сарколеммы и изменение активности аденилатциклазы.
- A. Вегетативная нервная система.
 1. Симпатические нервы: нейромедиатор — норадреналин.
 2. Парасимпатические нервы: нейромедиатор — ацетилхолин.
 - B. Циркулирующие гормоны и autacoids.
 1. Адреналин и норадреналин.
 2. Гистамин.
 3. Ангиотензин II.
 - B. Лекарственные препараты.
 1. Кальциевые антагонисты (блокаторы кальциевых каналов).
 2. Блокаторы β -адренергических рецепторов.
 3. Блокаторы H_2 -рецепторов гистамина.
 4. Метилксантины.
 5. Сердечные гликозиды.
- II. Управление внутренними факторами. Обычно активируются при ишемии.
- A. Зависимость медленных каналов от pH.
 - B. Зависимость медленных каналов от метаболической энергии АТФ.
 - B. Зависимость медленных каналов от цАМФ.
 - Г. Гипотеза кардиопротекции.
-

фермент, разрушающий цАМФ, приводя, таким образом, к повышению внутриклеточной концентрации цАМФ. Эти вещества, оказывая положительное инотропное действие, также быстро вызывают появление медленных ПД, которое происходит с той же скоростью, что и повышение внутриклеточной концентрации цАМФ. Механизм их действия скорее всего заключается в том, что в мембране появляется все больше медленных каналов, способных активироваться при возбуждении, и (или) в увеличении среднего времени их открытого состояния. Дибутирил-цАМФ также вызывает появление медленных ПД после длительной задержки около 15—30 мин (рис. 8.7), что и следует ожидать, учитывая либо его медленное проникновение через мембрану, либо медленное повышение внутриклеточной концентрации цАМФ.

Было проведено несколько проверок гипотезы участия в этом процессе цАМФ. В работе [17] показано, что аналог ГТФ (5'-гуанилимидодифосфат [GPP(NH)P], концентрация 10^{-5} — 10^{-3} М), который непосредственно активирует аденилатциклазу, вызывает появление медленных ПД в культивированных агрегатах клеток ткани сердца цыпленка в течение 5—20 мин (рис. 8.8), GPP(NH)P связывается с местом связывания ГТФ на регуляторной субъединице аденилатциклазного комплекса, но не может быть гидролизован АТФазой, поэтому он вызывает необратимую активацию аденилатциклазы и повышение уровня цАМФ в миоцитах. Показано также, что фореколин, высокоэффективный активатор аденилатциклазы, оказывает сильное положительное инотропное действие на изолированный миокард предсердий морской свинки [18].

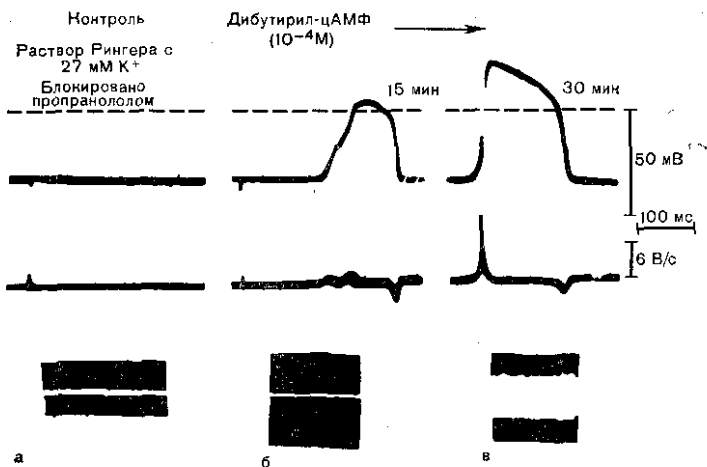


Рис. 8.7. Возникновение медленных потенциалов действия при перфузии сердца морской свинки раствором, содержащим дибутирил-цАМФ.

а — контроль при перфузии сердца раствором с 27 мМ К для деполаризации клеток до -35 мВ и инактивации быстрых натриевых каналов. Пропранолол (10^{-5} М) добавляли с целью подтверждения, что все наблюдаемые эффекты не связаны с активацией β -рецепторов; б, в — добавление дибутирил-цАМФ (10^{-4} М) начиная с 15-й минуты приводит к появлению медленных ответов (б); эффект достигает максимума приблизительно к 30-й минуте (в). По [55].

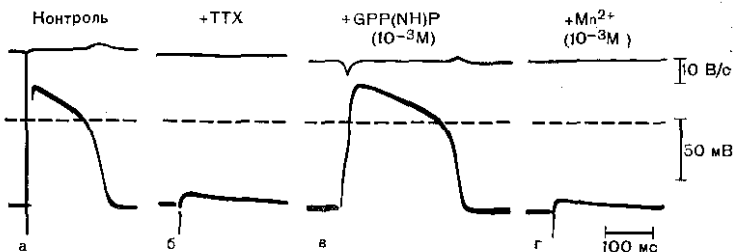


Рис. 8.8. Возникновение медленных ответов в реагрегатах миоцитов сердца пыщелка в культуре при действии GPP(NH)P в присутствии пропранолола. Препарат стимулировали с частотой 1 Гц. Все записи получены на одной клетке.

а — контрольный «быстрый» потенциал действия в нормальном растворе Тирод; б — при добавлении TTX ($3,1 \times 10^{-6}$ М) клетки становились невозбудимыми. Затем добавляли пропранолол (10^{-6} М), чтобы исключить всякое влияние, опосредованное через β -рецепторы; в — добавление затем GPP(NH)P (10^{-3} М) вызвало медленные ответы через 15 мин действия; г — ионы Mn^{2+} (1 мМ) за 1 мин блокируют медленные ответы. Вверху — записи dV/dt . Модифицировано из [17].

В работе [19] показано, что ионофоретическая внутриклеточная микроинъекция цАМФ в волокна Пуркинью сердца собаки и клетки миокарда желудочка сердца морской свинки вызывает кратковременное (на 1–2 мин) появление медленных ПД в данной клетке (рис. 8.9). Вторая инъекция цАМФ снова вызывает появление медленного ПД, который опять исчезает через 1–2 мин. Действие введенного внутрь клетки цАМФ было мгновенным, т. е. развивалось через несколько секунд после инъекции.

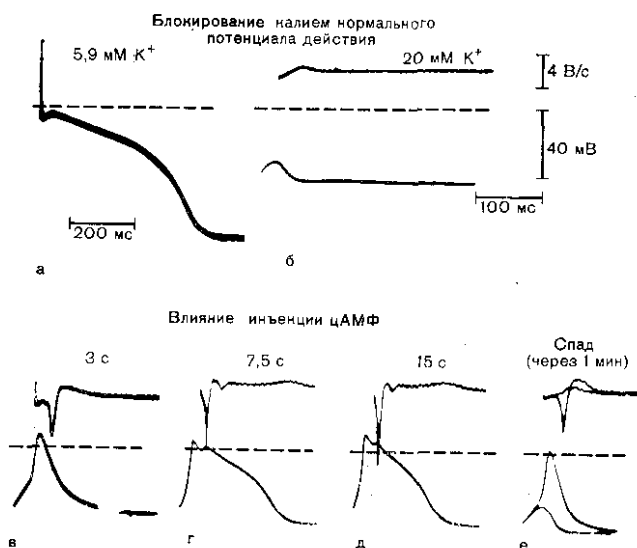


Рис. 8.9. Появление медленных потенциалов действия в коротком фрагменте волокна Пуркинье сердца собаки под влиянием цАМФ.

а — нормальный «быстрый» потенциал действия, зарегистрированный в волокне, находящемся в растворе Кребса—Хенселейта ($[K^+]_o = 5,9$ мМ); б — при повышении $[K^+]_o$ до 20 мМ происходит деполяризация волокон приблизительно до -40 мВ и исчезает возбудимость (при стимуляции электрическим полем с интенсивностью, превышающей нормальный порог в 10 раз); в—е — появление медленных потенциалов действия в проводящем сердечном миоците при внутриклеточной инъекции цАМФ при токе 200 нА в течение 3 с (в); 7,5 с (г) и 15 с (д). Промежутки между инъекциями были достаточно продолжительными для полного исчезновения медленных ответов, индуцированных при однократной инъекции (не показано на в и г); е — уменьшение медленных ответов к первой минуте после окончания инъекции цАМФ. Через 1 мин после окончания инъекции (д) существенно уменьшились как $+V_{\text{макс}}$, так и длительность медленного потенциала действия (первая запись), а затем ответ исчез практически полностью (вторая запись). Обратите внимание, что под действием цАМФ величина $+V_{\text{макс}}$ (верхние записи на каждом фрагменте) изменяется градуально. Горизонтальными пунктирными линиями показан уровень нулевого потенциала. Калибровки времени на а и б—е различны. В течение всего эксперимента препарат стимулировали с частотой 0,3 Гц. Записи dV/dt специально сдвинуты вправо, чтобы их не закрывал фронт потенциала действия. По [19].

Амплитуда и длительность индуцированных медленных ПД зависят от количества введенного цАМФ. Инъекция цАМФ потенцирует (увеличивает скорость нарастания и амплитуду) медленные ПД, появление которых вызвано теофиллином.

В работе [20] показано, что инъекции под давлением цАМФ, GPP(NH)P и холерного токсина в одиночные миокардиальные клетки, находящиеся в папиллярной мышце сердца морской свинки, быстро вызывают появление в них медленных ПД (рис. 8.10—8.12). Как показано на рис. 8.10, инъекция цАМФ под давлением вызывает появление высокоамплитудных медленных ПД через 15—25 с после начала инъекции. Действие продолжалось до тех пор, пока поддерживали инъекционное давление, и после прекращения инъекции через 25 ч медленные ПД исчезали. Таким образом, описанные результаты подтверждают данные, полученные

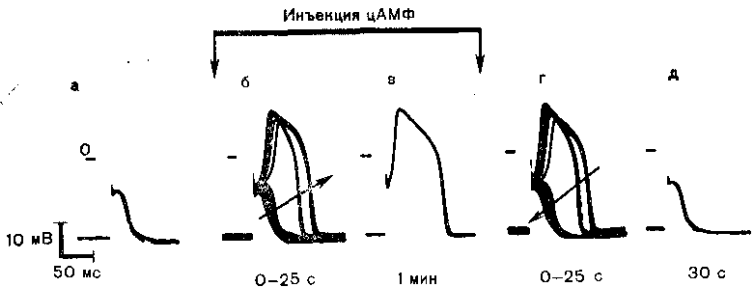


Рис. 8.10. Появление медленных потенциалов действия в кардиомиоцитах папиллярной мышцы морской свинки при внутриклеточной инъекции цАМФ под давлением. Мышца деполяризована раствором, содержащим 22 мМ $[K^+]_o$, для инактивации быстрых натриевых каналов. Для регистрации внутриклеточных потенциалов и инъекции цАМФ под давлением использовали микроэлектрод, заполненный 0,2 М раствором Na^+ -цАМФ.

а — небольшой локальный ответ; б — наложенные записи, показывающие постепенное развитие медленных потенциалов действия при инъекции цАМФ в течение 25 с; в — при инъекции в течение 1 мин возникают устойчивые потенциалы действия; г — после прекращения инъекции в течение 25 с происходит постепенное уменьшение медленных ответов; д — полное исчезновение медленных ответов через 30 с после прекращения инъекции цАМФ. Все регистрации получены в одной и той же клетке. По [20].

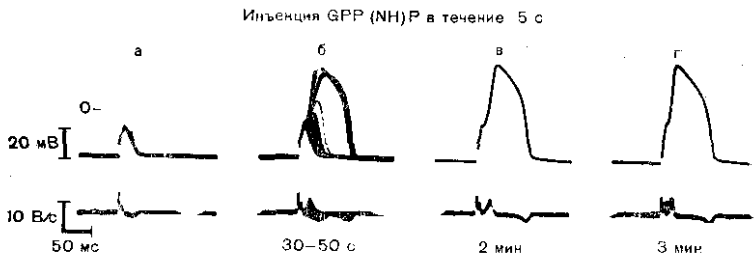


Рис. 8.11. Появление медленных потенциалов действия в кардиомиоцитах папиллярной мышцы морской свинки при внутриклеточной инъекции GPP(NH)P.

а — небольшой локальный ответ, вызванный электрической стимуляцией (30/мин) в растворе Рингера, содержащем 22 мМ K^+ ; б — появление медленного потенциала действия при внутриклеточной инъекции GPP(NH)P в течение 5 с. Микроэлектрод, заполненный 0,2 М раствором $NaCl$ с GPP(NH)P (3×10^{-2} М), использовался как для инъекций, так и для регистрации трансмембранного потенциала. Наложены одна на другую записи показывают постепенное возникновение и увеличение амплитуды медленных потенциалов действия; в—г — появившиеся медленные потенциалы действия имеют стабильную форму в течение более 3 мин после окончания инъекции. В клетке, удаленной от точки инъекции на 50 мкм медленные потенциалы действия не возникали. В других экспериментах медленные потенциалы действия, появившиеся при инъекции GPP(NH)P, сохранялись в течение 7 мин после окончания инъекции. Модифицировано из [20].

при электрофоретической инъекции цАМФ. На рис. 8.11 показано, как внутриклеточная инъекция GPP(NH)P (в течение только 5 с) вызывает очень быструю реакцию, т. е. большие медленные ПД появлялись уже через 40—50 с по сравнению с относительно более медленным развитием действия GPP(NH)P (5—20 мин), добавленным в перфузионный раствор. Индуцированные медленные ПД сохранялись в течение 3 мин после выключения инъекционного давления, указывая на относительно продолжительный эф-

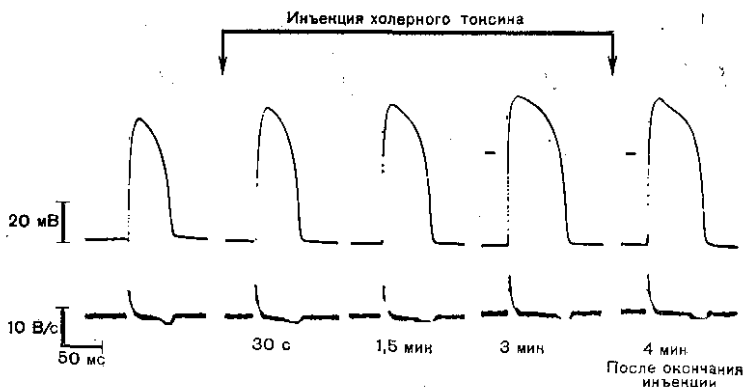


Рис. 8.12. Увеличение медленных потенциалов действия в кардиомиоцитах инфилярной мышцы морской свинки при внутриклеточной инъекции холерного токсина.

Первая запись — медленный потенциал действия, возникающий при электрической стимуляции (30/мин) в растворе, содержащем 22 мМ К⁺. Следующие три регистрации получены через разные моменты времени после начала внутриклеточной инъекции холерного токсина под давлением. Микроэлектрод, заполненный 0,2 М раствором NaCl, содержащим растворенный холерный токсин (1 мг/мл), использовался как для внутриклеточной инъекции, так и для регистрации трансмембранного потенциала. Видно, что увеличение амплитуды и длительности медленного потенциала действия началось уже через 30 с после начала инъекции. Эти параметры продолжали возрастать при продолжении инъекции, как видно по записям, полученным через 1,5 и 3 мин после начала инъекции. К 3-й минуте эффект достигает установившегося значения. Эффект действия холерного токсина сохранялся и после прекращения инъекции по крайней мере в течение 4 мин (последняя запись). Все регистрации получены в одной и той же клетке. По [20].

эффект GPP(NH)P. На рис. 8.12 показано, что инъекция холерного токсина быстро потенцирует уже существующие медленные ПД, действие начинается через 30 с и достигает максимума на 3-й минуте (во время трехминутного периода инъекции). Индуцированные медленные ПД сохранялись в течение более 4 мин после окончания инъекции, указывая на относительно продолжительный эффект холерного токсина. (Холерный токсин оказывает такое же влияние на аденилатциклазный комплекс, что и GPP(NH)P, а именно вызывает необратимую активацию регуляторной субъединицы фермента вследствие угнетения гидролиза ГТФ.)

Полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что внутриклеточный уровень цАМФ влияет на число медленных каналов, имеющих на сарколемме миокардиальных клеток (см. табл. 8.1).

Зависимость от метаболизма

В работах [11, 14] было показано, что вызываемые различными веществами медленные ПД угнетаются при гипоксии, ишемии и при действии различных метаболических ядов (включая цианиды, динитрофенол и валиномицин) за 5—15 мин, что сопровождается понижением внутриклеточного уровня АТФ. Приведем только один пример эффекта угнетения метаболизма. На рис. 8.13 показано, что цианиды полностью блокируют медленный ПД и

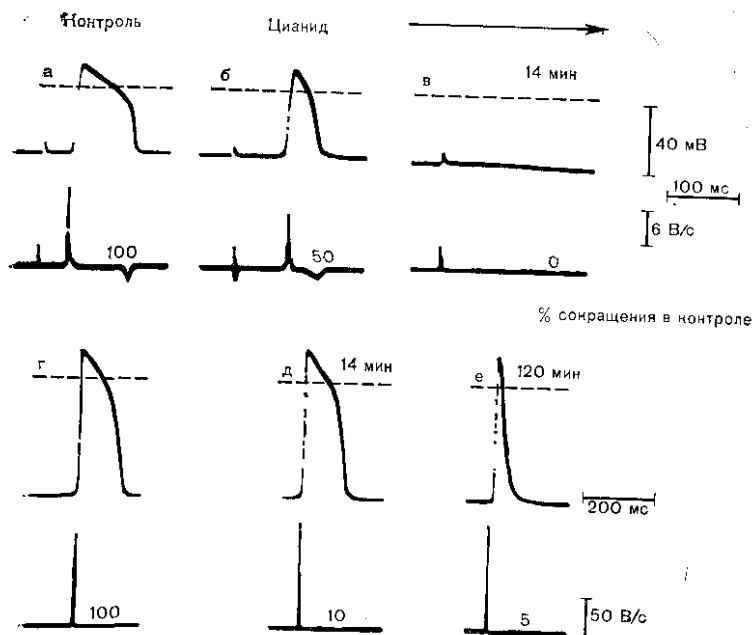


Рис. 8.13. Угнетение цианидами (10^{-3} М) медленного кальциевого потенциала действия, вызванного катехоламинами (КСН). Миокард частично депляризован в растворе с 27 мМ K^+ (быстрые натриевые каналы инактивированы).

Верхние записи — внутриклеточные потенциалы действия; нижние записи — производная потенциала действия. Числа на каждом фрагменте рисунка обозначают величину силы сокращения в процентах от контроля. а — медленный потенциал действия, вызванный изопротеренолом (10^{-7} М); б — в — через 13 мин (б) после добавления в перфузат КСН медленный потенциал действия угнетается, а через 16 мин (в) полностью исчезает. Параллельно происходит уменьшение и исчезновение сокращения; г — нормальный «быстрый» потенциал действия в нормальном растворе Рингера (2,7 мМ K^+); д — через 14 мин после добавления КСН. К моменту полного блокирования медленных каналов (в) не наблюдается никакого влияния цианидов на нормальный потенциал действия ($V_{\text{макс}}$, амплитуду или длительность). Однако сила сокращения существенно снижается; е — через 120 мин действия цианидов происходит значительное укорочение нормального «быстрого» потенциала действия, но сохраняется высокая скорость его нарастания. Модифицировано из [1].

сокращение (см. рис. 8.13, а, б), в то время как их влияние на быстрый ПД (см. рис. 8.13, г, д) едва заметно, однако сокращению почти полностью блокируется, т. е. наблюдается разобщение сокращения с быстрым ПД. Эти данные позволяют предположить, что нарушение метаболизма приводит к блокированию медленных каналов. Быстрые ПД в этих условиях остаются без изменений, свидетельствуя о том, что влияние на быстрые натриевые каналы незначительно. Однако сокращение, сопровождающее нормальный, быстрый ПД, угнетено или полностью блокировано, указывая на то, что оно разобщено с возбуждением, как и ожидается при блокировании медленных каналов. Медленные ПД, блокированные валиномицином или в условиях гипоксии, восстанавливаются при повышении концентрации глюкозы [21], свиде-

тольствуя о том, что действие метаболических ядов или гипоксических условий действительно опосредовано влиянием на метаболизм. Таким образом, существует специфическая зависимость медленных каналов от метаболической энергии.

При длительном угнетении метаболизма, например в течение 60—120 мин гипоксии или воздействия цианидов, наблюдается постепенное укорочение нормального «быстрого» ПД до тех пор, пока не остается только короткий компонент, похожий на спайк, однако скорость его нарастания остается высокой (рис. 8.13, е). Таким образом, угнетение метаболизма вызывает еще одно, значительно более медленно развивающееся, воздействие на мембрану. Этот эффект связан с ускорением кинетики активации калиевой проводимости (g_K), что и приводит к укорочению ПД. Механизм такого действия может быть опосредован постепенным повышением внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , что может привести к увеличению кальцийактивируемой проводимости g_K (т. е. $g_K(Ca)$).

Было показано, что нестимулированные («естественные») и стимулированные («индуцированные») медленные каналы миокардиальных клеток аналогичны в отношении их блокирования метаболическими ядами [22].

Гипотеза фосфорилирования

Обнаружив связь между концентрацией цАМФ и числом имеющих в мембране медленных каналов и зависимость числа функционирующих медленных каналов от метаболической энергии, Shigenobu, Sperelacis [8], Sperelacis, Schneider [14] предположили, что некоторый белок мембраны должен быть фосфорилирован, с тем чтобы медленный канал мог быть активирован при деполяризации (рис. 8.14). Аналогичная гипотеза была предложена Tsien и соавт., Watanabe и соавт. и Rinaldi и соавт. [16, 23, 24]. Повышение внутриклеточного уровня цАМФ при действии веществ, оказывающих положительное инотропное воздействие, активирует цАМФзависимую протеинкиназу (димер расщепляется на два мономера), которая фосфорилирует множество различных белков в присутствии АТФ. В этих условиях фосфорилируются ряд мембранных белков миокардиальной клетки.

Фосфорилируемым белком может быть один из белков, составляющих сам медленный канал (рис. 8.14, а). Белок, фосфорилирование которого необходимо для того, чтобы медленный канал мог функционировать, необязательно должен быть белком самого канала; это может быть соседний регуляторный белок (например, похожий на фосфоламбан), связанный с медленным каналом миокардиальной клетки. Например, Rinaldi и соавт. [23] предположили, что функционирование медленных кальциевых каналов в изолированных везикулах сарколеммы миокардиальных клеток модулируется цАМФзависимым фосфорилированием белка сарколеммы («кальдуцина»), имеющего молекулярную массу около 23 000.

Схема гипотезы фосфорилирования медленного канала

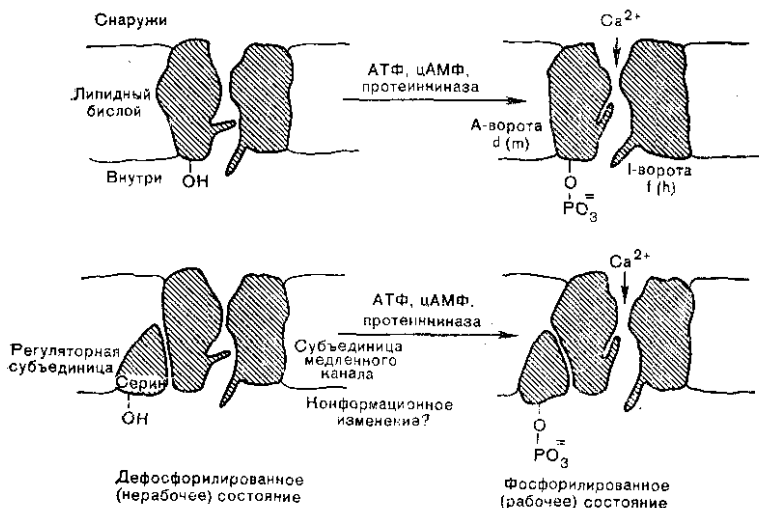


Рис. 8.14. Рисованная модель двух гипотетических состояний медленного канала мембраны миокардиальной клетки: слева — дефосфорилированное состояние (канал не активируется при деполяризации), справа — фосфорилированное состояние. Активационные (А, d или m) ворота и инактивирующие (I, f или h) ворота этого канала имеют значительно более медленную кинетику, чем ворота быстрого натриевого канала. Согласно предлагаемой гипотезе, либо непосредственно образующий канал белок (а), либо некоторый регуляторный белок, связанный с каналом (б), должен быть фосфорилирован для того, чтобы канал приобрел способность активироваться при деполяризации. Фосфорилирование происходит с помощью цАМФ-зависимой протеинкиназы в присутствии АТФ. По-видимому, происходит фосфорилирование остатка серина или треонина, входящего в состав белка. Фосфорилирование белка медленного канала или связанного с каналом регуляторного белка может вызывать конформационные изменения, которые либо позволяют воротам канала менять свое положение при деполяризации, либо увеличивают диаметр отверстия канала, заполненного водой, давая возможность ионам Na^+ и Ca^{2+} проходить через него. Модифицировано из [14].

Фосфорилирование может переводить медленный канал в активируемое состояние благодаря конформационным изменениям, которые либо позволяют активационным воротам открываться при деполяризации, либо эффективно увеличивают диаметр поры, заполненной водой («селективного фильтра»), создавая возможность ионам Na^+ и Ca^{2+} проходить через канал. Фосфорилируемая форма медленного канала была бы активной (рабочей), а дефосфорилированная форма неактивной (нерабочей), т. е. только фосфорилированная форма канала может быть активирована при деполяризации до уровня порога. Дефосфорилированные каналы были бы электрически неактивны. По-видимому, в данных

условиях с учетом уровня цАМФ должно существовать равновесие между числом фосфорилированных медленных каналов и числом дефосфорилированных медленных каналов. Поэтому вещества, действие которых заключается в повышении уровня цАМФ, должны увеличивать долю медленных каналов, находящихся в фосфорилированной форме и, следовательно, способных активироваться при деполяризации. Такие вещества должны увеличивать силу сокращения миокарда.

Существуют некоторые вещества, оказывающие положительное инотропное действие и индуцирующие медленные каналы, но не повышающие уровня цАМФ, например, ангиотензин II [25] и ионы фтора (<1 мМ) [24, 26]. Действие ионов фтора может быть обусловлено ингибированием фосфатазы фосфопротеинов, дефосфорилирующей белок медленного канала, в результате чего увеличивается доля фосфорилированных каналов; т. е. уменьшение скорости дефосфорилирования должно оказывать такой же эффект, как и увеличение скорости фосфорилирования. Ангиотензин может активировать цАМФ-независимую протеинкиназу. Таким образом, результаты, полученные при действии ангиотензина и ионов фтора, могут быть объяснены в рамках гипотезы фосфорилирования.

Роль цГМФ в работе медленных каналов неизвестна. Однако в некоторых случаях инъекция цГМФ угнетает уже существующие медленные ПД (Bkaliy, Sperelakis, неопубликованные данные). Не ясно, опосредовано ли действие ацетилхолина изменениями уровня цГМФ в клетке. Не известно также, какова роль кальций-кальмодулин-активируемой протеинкиназы в работе медленных каналов миокардиальных клеток. Однако трифторперазин, ингибитор кальмодулина, угнетает медленные ПД (Bkaliy, Sperelakis, Eldefrawi, неопубликованные данные).

При проверке гипотезы фосфорилирования Bkaliy, Sperelakis [27] показали, что внутриклеточное введение (с помощью липидов) ингибитора протеинкиназы (цАМФ-зависимой) блокирует медленные каналы миокардиальных клеток.

Селективное блокирование при ацидозе

Медленные каналы миокардиальных клеток селективно блокируются при ацидозе [28, 29]. В работе [29] показано, что, например, вызванные изопроterenолом медленные ПД угнетаются (уменьшается скорость нарастания, амплитуда и длительность), если рН перфузионного раствора уменьшается ниже 7,0 (рис. 8.15). Медленные ПД ингибируются на 50% при рН 6,6 и полностью угнетаются при рН 6,1. (Блокирование медленных ПД происходит раньше, чем блокирование всех медленных каналов вследствие необходимости минимальной плотности медленных каналов для развития регенеративного и распространяющегося ответа.) Сокращение угнетается параллельно с медленным ПД. Так как один и тот же результат достигается одинаково быстро при использовании двух буферных систем, $\text{HCO}_3^- - \text{CO}_2$ и PIPES, и так

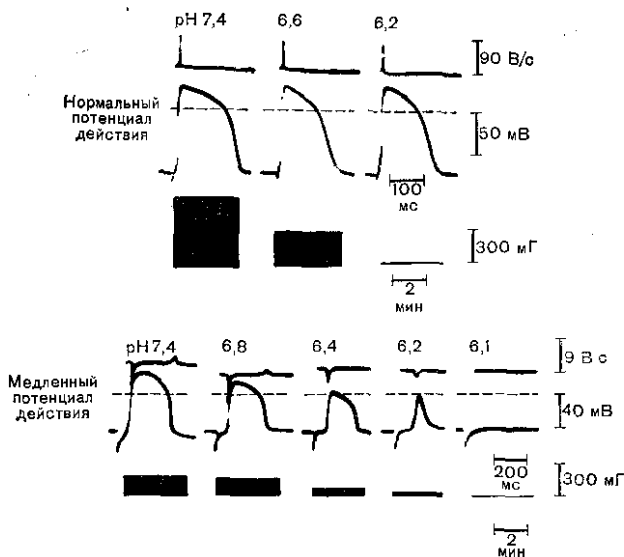


Рис. 8.15. Селективное блокирование медленных каналов при кислом pH. Буфер: $\text{NaHCO}_3\text{--CO}_2$. Сердце зародыша цыпленка (возраст — 20 дней) перфузировали нормальным раствором Рингера и стимулировали с частотой 0,5/с.

Вверху — изменение нормального «быстрого» потенциала действия и силы сокращения при снижении pH: при pH 6,6 сила сокращения существенно уменьшается, в то время как потенциал действия практически не отличается от регистрируемого при pH 7,4, а при pH 6,2 сокращения полностью угнетаются, несмотря на наличие потенциала действия, т. е. происходит разобщение возбуждения и сокращения. Внизу — блокирование медленного потенциала действия, индуцированного изопроterenолом (10^{-8} М) при снижении pH (25 мМ K^+ , буфер $\text{NaHCO}_3\text{--CO}_2$). Первая запись получена в контроле при pH 7,4. Снижение pH в перфузионном растворе вызывает угнетение медленного потенциала действия и силы сокращения, пока не возникает полной блокады при pH 6,1. На каждом фрагменте над потенциалом действия приведена запись его производной (dV/dt), что позволяет оценить величину максимальной скорости нарастания потенциала действия. Модифицировано по [10].

как буферная система PIPES должна медленно изменять внутриклеточный pH, то, по-видимому, блокирование медленных каналов происходит при закислении раствора около внешней поверхности клеточной мембраны. Это могло бы вызывать изменение поверхностного заряда мембраны и (или) изменение конформации белков медленного канала.

Ацидоз мало или вовсе не влияет на нормальный быстрый ПД, т. е. скорость нарастания ПД остается высокой, а влияние на овершут и длительность минимально. Однако сокращение угнетается и полностью исчезает в зависимости от степени ацидоза, т. е. возникает разобщение возбуждения и сокращения, как следует ожидать при селективном блокировании медленных каналов.

Так как во время гипоксии и ишемии возникает ацидоз миокардиальной ткани (гликолиз усиливается и молочная кислота диффундирует в межклеточное пространство), то, вероятно, часть влияния этих метаболических воздействий на медленные каналы опосредована сопровождающим их ацидозом, а не одним только

уменьшением внутриклеточного уровня АТФ. С этим согласуется тот факт, что гипоксические изменения медленного ПД исчезают почти мгновенно, хотя и не полностью и на короткое время при изменении рН в перфузионном растворе до 8,0; при дальнейшем воздействии гипоксии при щелочных рН медленные ответы постепенно уменьшаются [30].

Внутренний контроль поступления ионов Ca^{2+} : гипотеза защиты миокарда

Поступление ионов Ca^{2+} в миокардиальные клетки контролируется внешними факторами (см. табл. 8.1). Например, стимуляция симпатических нервов сердца, повышение уровня циркулирующих катехоламинов или других гормонов оказывает положительное инотропное действие, в то время как стимуляция парасимпатических нейронов — отрицательное. Некоторые из этих эффектов опосредованы изменением уровня циклических нуклеотидов в кардиомиоцитах.

Такой внешний контроль поступления ионов Ca^{2+} в миоциты возможен благодаря особым свойствам медленных каналов, как, например, предполагаемая необходимость фосфорилирования канала.

Однако, кроме того, существует внутренний контроль поступления ионов Ca^{2+} , осуществляемый самой миокардиальной клеткой (см. табл. 8.1). Например, в условиях кратковременной локальной ишемии многие медленные каналы становятся неактивируемыми при деполяризации (или «молчащими»). Этот эффект может быть опосредован понижением уровня АТФ в клетках, подвергшихся воздействию, а также сопровождающим ишемию ацидозом (так как блокирование медленных каналов при гипоксии происходит быстрее при кислом рН, чем при щелочном). Вероятно, ацидоз прямо приводит к блокированию медленных каналов, а угнетение метаболизма вызывает опосредованную инактивацию медленных каналов.

Таким образом, миокардиальная клетка может частично или полностью подавить поступление в нее ионов Ca^{2+} (частично опосредованное медленным входящим током I_{s1}) в неблагоприятных условиях. Это приводит к тому, что подвергшаяся воздействию клетка сокращается слабее или совсем не сокращается, а так как большая часть работы, совершаемая клеткой, является механической, то уровень АТФ сохраняется. Такой механизм может служить для защиты миокардиальных клеток в таких неблагоприятных условиях, как кратковременная локальная ишемия при спазме коронарных сосудов. Если бы миокардиальная клетка не была способна контролировать поступление в нее ионов Ca^{2+} , то в таких неблагоприятных условиях уровень АТФ мог бы снизиться до такой степени, что повреждение стало бы необратимым, т. е. клетка погибла бы. Благодаря особым свойствам медленных каналов они инактивируются, разобщая таким образом сокраще-

ние и возбуждение и сохраняя уровень АТФ. После возвращения кровотока к норме такие клетки могут полностью восстановить свои функции.

Практически нормальный потенциал покоя и сохранение быстрых ПД в зоне ишемии приводят к нормальному распространению возбуждения в этой области, уменьшая, таким образом, до минимума риск возникновения аритмий. Влияние угнетения метаболизма на длительность ПД через 30—120 мин (вследствие ускорения кинетики активации g_K , которая определяет длительность ПД) также может способствовать более быстрому окончанию I_{s1} , уменьшая, таким образом, общее поступление ионов Ca^{2+} в клетку за один ПД и помогая сохранению уровня АТФ.

ПД в зоне ишемии может быть либо медленным, либо частично подавленным нормальным «быстрым». Угнетение скорости нарастания ПД является следствием частичной деполяризации клеток в результате накопления ионов K^+ в межклеточном пространстве и, возможно, вследствие угнетения работы электрогенного натриевого насоса. Постепенно нарастающая деполяризация инактивирует все большую часть быстрых натриевых каналов вследствие закрытия их инактивационных (I) ворот. Можно ожидать, что многие медленные каналы будут заблокированы вследствие ацидоза и понижения уровня АТФ.

БЛОКИРОВАНИЕ МЕДЛЕННЫХ КАНАЛОВ АЦЕТИЛХОЛИНОМ

Нейромедиатор парасимпатической нервной системы ацетилхолин (Ацх) вызывает уменьшение силы сокращения миокарда, а также оказывает отрицательное хронотропное действие, влияя на клетки СА-узла. Вследствие наличия положительной лестницы в миокарде последний эффект также оказывает отрицательное инотропное действие. Хорошо известно, что Ацх увеличивает g_K , приводя, таким образом, к гиперполяризации клеток СА-узла (следовательно, угнетая автоматизм) и укорачивает длительность ПД в миокардиальных клетках предсердий. Это также способствует угнетению медленных ПД в предсердных клетках в результате увеличения выходящего калиевого тока, накладывающегося на медленный входящий ток, что приводит к уменьшению суммарного входящего (медленного) тока.

В миокардиальных клетках желудочков активация мускариновых рецепторов Ацх устраняет стимуляцию аденилатциклазного комплекса, вызываемую β -адренергическими агонистами. Активация β -адренергических рецепторов усиливает регуляторную (стимулирующую) субъединицу аденилатциклазного комплекса, в то время как активация мускариновых рецепторов усиливает ингибиторную регуляторную субъединицу фермента (см. рис. 8.20).

Josephson, Sperelakis [31] в экспериментах по фиксации потенциала на культивируемых клетках желудочка сердца цыпленка

Реагрегаты культивируемых кардиомиоцитов
куринного эмбриона

Фиксация потенциала

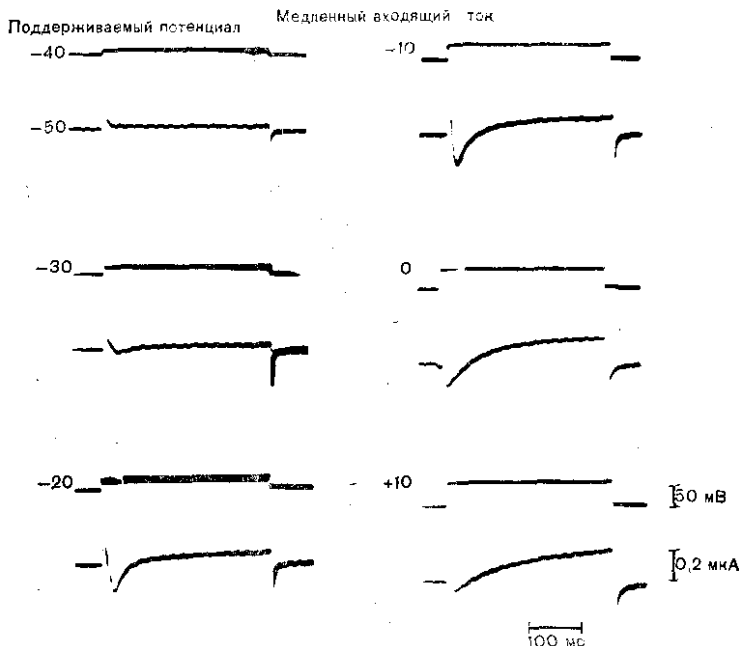


рис. 8.16. Трансмембранные ионные токи в реагрегате клеток сердца птицы в культуре, зарегистрированные методом фиксации потенциала. Перфузионный раствор содержит ТТХ (10^{-6} М) и изопротеренол (10^{-6} М). Поддерживаемый потенциал -50 мВ. Таким образом, вследствие блокирования быстрых натриевых каналов с помощью ТТХ и инактивации их потенциалом полностью предотвращается активация быстрого натриевого тока. Деполяризующие ступеньки потенциала были продолжительностью 300 мс и подавались с частотой $0,3/с$. Уровень ступеньки последовательно изменяли до -40 , -30 , -20 , -10 , 0 и $+10$ мВ. Медленный входящий ток (I_{s1}) небольшой амплитуды появлялся уже при -30 мВ и достигал максимума при -10 мВ. При ступеньках деполяризации большей величины ток I_{s1} уменьшался вследствие снижения электрохимической движущей силы ($E_m - E_{s1}$). При таких ступеньках наблюдали постепенное повышение силы выходящего калиевого тока (I_k). В некоторых случаях величина емкостного тока не видна на регистрациях. По [31].

показали двойственное действие ацетилхолина: увеличение выходящего калиевого тока и угнетение медленного входящего тока (I_{s1}) (рис. 8.16—8.18). На рис. 8.16 показан типичный эксперимент по фиксации потенциала для измерения величин входящего I_{s1} и выходящего I_k . Поддерживаемый потенциал равен -50 мВ. В некоторых экспериментах в перфузионный раствор добавляли ТТХ, что позволяло инактивировать быстрые натриевые каналы. По мере увеличения ступенек потенциала в диапазоне от -30 до

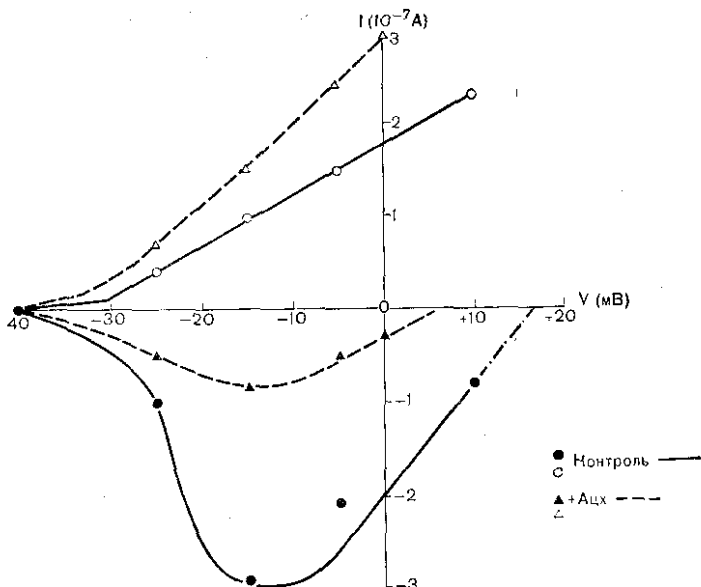


Рис. 8.17. Действие ацетилхолина (Ацх) на трансмембранные ионные токи реареггатов клеток желудочков сердца цыпленка в культуре в присутствии изопротеренола.

Темными кружками обозначены величины I_{si} , полученные в присутствии ТТХ (10^{-6} М) и изопротеренола (10^{-6} М); показатели выходящего тока (при 300 мс) обозначены светлыми кружками. Треугольниками отмечены величины токов через 3 мин действия Ацх (10^{-6} М); сила выходящего тока обозначена светлыми треугольниками, входящего — темными. Эти данные показывают, что Ацх не только увеличивает силу выходящего тока I_K , но и уменьшает силу входящего тока I_{si} .
 Модифицировано из [31].

—10 мВ происходило увеличение I_{si} , при деполяризующих ступеньках потенциала большой амплитуды (например, до 0 мВ и +10 мВ) он уменьшался в результате снижения электрохимической движущей силы ($E_m - E_{si}$). При деполяризующих ступеньках большой амплитуды также возрастал I_K . Эти данные показаны на графике в виде вольтамперных кривых на рис. 8.17 (контрольные кривые). Пиковые значения входящего I_{si} достигали максимума в относительно широком диапазоне потенциалов (между —15 и 0 мВ), а реверсный потенциал для I_{si} находился около +20 мВ. На рис. 8.17 показано двойное действие ацетилхолина, выражающееся в угнетении I_{si} и потенциации выходящего калиевого тока.

На рис. 8.18 показаны контрольные вольтамперные зависимости, полученные в другом эксперименте, и проиллюстрирован тот факт, что верапамил сильно угнетает I_{si} , почти не влияя на выходящий калиевый ток, способствуя, таким образом, идентификации входящего тока как медленного входящего кальциевого тока.

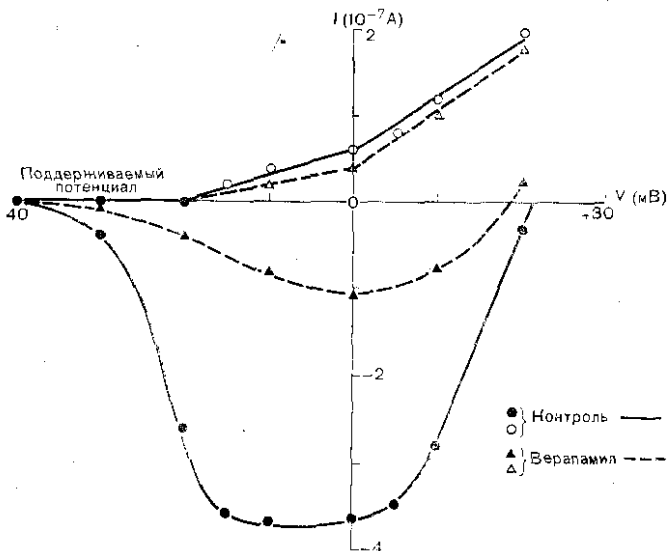


Рис. 8.18. Влияние верапамила (10^{-6} М) на трансмембранные ионные токи, зарегистрированные в реагрегатах клеток в культуре.

Темными кружками обозначена амплитуда I_{s1} , зарегистрированного при разных потенциалах в присутствии ТТХ (10^{-5} М) и изопроterenола (10^{-5} М); светлыми кружками показан выходящий ток (при 300 мс). Треугольниками обозначены величины токов через 3 мин действия верапамила (10^{-6} М); светлыми треугольниками — выходящий ток, темными — амплитуда входящего тока I_{s1} . Эти данные показывают, что верапамил угнетает I_{s1} и не оказывает практически никакого влияния на выходящий ток I_K . По [34].

БЛОКИРОВАНИЕ МЕДЛЕННЫХ КАНАЛОВ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ ПРЕПАРАТАМИ И АНЕСТЕТИКАМИ

Кальциевые антагонисты, такие как верапамил, Д-600, нифедипин, дилтиазем и бепридил, блокируют потенциалозависимые медленные каналы (типа Ca^{2+} и Ca^{2+}/Na^{+}), обнаруженные в клетках рабочего миокарда, волокнах Пуркинье, узловых клетках и гладкомышечных клетках сосудов. Некоторые из кальциевых антагонистов, такие как верапамил, Д-600 и нифедипин (но не дилтиазем, бепридил и мезудицин), блокируют также медленные натриевые каналы, выявленные в миокардиальных клетках эмбрионов (трехдневных) цыплят [12, 35].

На рис. 8.19 показано действие верапамила на папиллярную мышцу сердца морской свинки, проявляющееся в блокировании медленных ПД, и действие нифедипина на папиллярную мышцу сердца морской свинки (см. рис. 8.19, а—г) и волокна Пуркинье сердца морской свинки (см. рис. 8.19, д—з) при постоянной частоте стимуляции (0,5 Гц), проявляющееся блокированием индуцированных изопроterenолом медленных ПД. Как было сказано ранее, способность нифедипина блокировать медленные каналы выше, чем у верапамила [32, 33]. Кальциевые антагонисты по

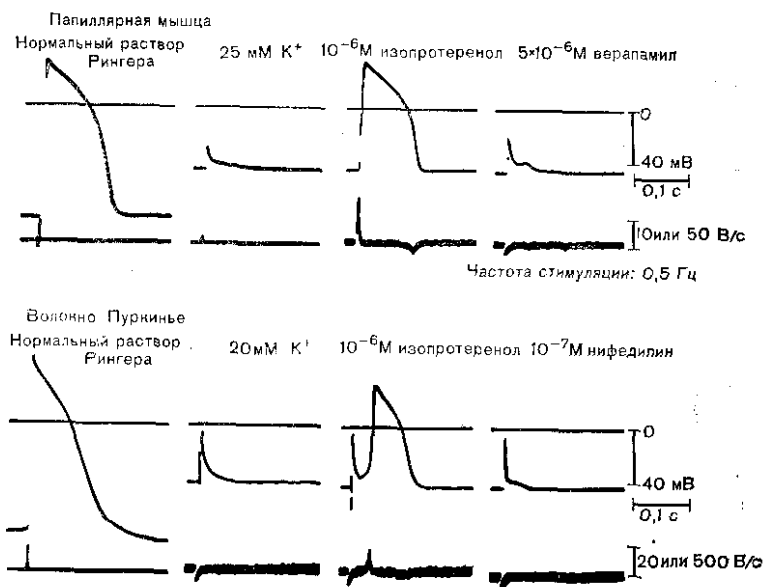


Рис. 8.19. Возникновение медленного потенциала действия и его блокирование кальциевыми антагонистами.

Верхние четыре записи получены на папиллярной мышце морской свинки, нижние — на волокне Пуркинье. Первые записи сверху и внизу демонстрируют нормальные «быстрые» потенциалы действия в этих миокардиальных препаратах. Повышение $[K^+]_o$ до 20—25 мм вызывает деполяризацию клеток до -45 мВ и подавляет возбудимость (видны только артефакты стимуляции). При добавлении к перфузату изопроterenола (10^{-6} М) быстро возникают медленные потенциалы действия. Добавление затем верапамила ($5 \cdot 10^{-6}$ М) или нифедипина (10^{-7} М) приводит к блокированию медленных потенциалов действия, индуцированных изопроterenолом. Частота стимуляции для возбуждения медленных ответов составляла 0,5 Гц. Прямая линия вверху на каждом фрагменте рисунка отмечает уровень нулевого потенциала, внизу приведены записи dV/dt , отклонение вверх на которых соответствует величине $\dot{V}_{макс}$. Калибровки потенциала и времени относятся ко всему рисунку, калибровка dV/dt для быстрых потенциалов действия — 500 В/с, для медленных — 20 В/с. Модифицировано по [32, 33].

своей способности блокировать медленные каналы в различных тканях сердца могут быть расположены в следующей последовательности: нифедипин > дилтиазем > верапамил > бепридил [34].

Для того чтобы вещество можно было отнести к этому классу соединений, оно должно блокировать медленные каналы, действуя непосредственно на сам канал клеточной мембраны (а не опосредовано, например, через угнетение метаболизма или создание ацидоза), и это действие должно быть относительно специфично для медленных каналов по сравнению с таковым на другие типы потенциалозависимых ионных каналов (например, быстрые натриевые каналы или калиевые каналы с задержанным выпрямлением). Это определение позволяет, таким образом, отличить кальциевые антагонисты, например, от местных анестетиков или метаболитических ядов.

Некоторые кальциевые антагонисты, такие как бепридил, могут, кроме того, оказывать еще одно действие на миокард, например, угнетать поглощение или освобождение ионов Ca^{2+} саркоплазматическим ретикулумом внутри клетки [36]. Доказательств

вом существования второго эффекта бепридила явилось угнетение им силы сокращения миокарда в большей степени, чем может быть объяснено угнетением медленного входящего кальциевого тока. С возможным существованием второго места действия бепридила и верапамила согласуется то, что они проникают внутрь миокардиальных клеток; порядок убывания проницаемости кальциевых антагонистов представлен в следующей последовательности: бепридил > верапамил > нитрендипин \gg нифедипин > дилтиазем [37, 38]. Этот ряд проницаемостей соответствует ряду их растворимости в липидах [38]. Кроме того, те из кальциевых антагонистов, которые более легко проникают внутрь клеток, имеют возможность влиять на медленные каналы с внутренней поверхности клеточной мембраны. Например, недавно было показано, что заряженная модификация D-600 (с четвертичным аммонием) не влияет на медленный входящий ток миокардиальных клеток, если ее добавлять в перфузионный раствор, но она тем не менее угнетает I_{si} , если ее ввести внутрь клетки [26].

Верапамил и бепридил в зависимости от концентрации ингибируют связывание ионов Ca^{2+} с изолированными фрагментами сарколеммальной мембраны (везикулами), причем из этих двух соединений более сильное действие оказывает верапамил, как и при угнетении медленных ПД [37]. Так как связывание ионов Ca^{2+} около входа в медленный канал во внешней поверхности сарколеммы (как показано на рис. 8.2), по-видимому, является первым шагом в проникновении иона через канал, вытеснение ионов Ca^{2+} могло бы быть одним из возможных механизмов блокирования входа Ca^{2+} верапамилем и бепридилом, хотя такой механизм не способен столь же просто объяснить зависимость действия этих двух веществ от частоты возбуждения миоцитов. С другой стороны, не зависящее от частоты блокирование входа ионов Ca^{2+} ионами Mn^{2+} , Co^{2+} или La^{3+} вполне может быть объяснено этим механизмом. Нифедипин и дилтиазем не ингибируют связывание ионов Ca^{2+} с клеточной мембраной [39]. Таким образом, между свойствами различных кальциевых антагонистов существуют значительные различия, и они могут блокировать медленные каналы по совершенно различным молекулярным механизмам, что можно предположить на основании их существенно различающихся химических структур.

Кажущееся уменьшение блокирования медленных ПД и сокращения кальциевыми антагонистами при повышении $[Ca^{2+}]_o$ может происходить в соответствии с одним из двух следующих механизмов: а) конкуренция между ионами Ca^{2+} и веществом за место связывания около входного отверстия канала; б) увеличение электрохимической движущей силы для поступления ионов Ca^{2+} через медленные каналы, не заблокированные веществом. Последний из этих механизмов, по-видимому, действует во всех случаях, в то время как первый из них может быть справедлив только для некоторых веществ, таких как верапамил и бепридил.

Угнетение медленных ПД и медленного входящего кальциевого тока (I_{si}) при действии большинства кальциевых антагони-

стов зависит от частоты возбуждения миокарда, чем выше частота стимуляции, тем сильнее их блокирующее действие на медленные каналы. Например, в концентрации, вызывающей полное блокирование медленных ПД при частоте стимуляции 1 Гц, вещество может не оказывать никакого действия при частоте стимуляции 0,1 Гц. Этот эффект значительно выражен при действии всех веществ этого класса, хотя для нифедецина, по-видимому, характерна меньшая зависимость влияния от частоты, чем для других веществ. И, наоборот, действие таких блокаторов поступления Ca^{2+} , как ионы Mn^{2+} , Co^{2+} и La^{3+} , не зависит от частоты стимуляции; например, действие Mn^{2+} проявляется даже в первом ПД, вызываемом после добавления Mn^{2+} к препарату в покое.

Такая частотная зависимость влияния позволяет предположить, что кальциевые антагонисты действуют не просто как пробки медленных кальциевых каналов, как, например, ионы Mn^{2+} или La^{3+} . Скорее это свойство означает, что вещество может замедлять процесс реактивации медленного канала из инактивированного состояния в состояние покоя (см. рис. 8.2). Если это справедливо, то низкая частота стимуляции или продолжительный период отсутствия стимуляции (например, 20—60 с) должны позволить связанному с веществом медленному каналу полностью восстановиться до наступления следующего возбуждения. Чтобы оказывать такое действие на кинетику реактивации ворот, вещество должно связываться с некоторым участком белка канала. Другая возможность заключается в том, что при блокировании вещество связывается с каналом, находящимся только в активированном или инактивированном состоянии (мембрана деполяризована), а при переходе канала в состояние покоя вещество диссоциирует. Имеются некоторые данные в пользу того, что связывание вещества с каналом зависит от потенциала, причем деполяризация способствует связыванию, а гиперполяризация — отхождению вещества от канала.

Другая возможность, которую следует рассмотреть, состоит в том, что вещество, влияющее некоторым непосредственным образом на фосфорилирование медленных каналов, также будет эффективно избирательно блокировать медленные каналы, и это могло бы объяснить зависимость его влияния от частоты стимуляции. Недавно было обнаружено, что некоторые кальциевые антагонисты, такие как верапамил, ингибируют пАМФ-зависимое фосфорилирование трех мембранных белков *in vitro*, что согласуется с выдвинутым предположением (Carty, Sperelakis, Villar-Palasi, неопубликованные данные).

Ряд других химических веществ и лекарственных препаратов также блокирует медленные каналы миокардиальной клетки; к ним относятся местные анестетики [40] и ингаляционные общие анестетики [41]. Однако такие местные анестетики, как лидокаин и прокаинамид, блокируют медленные каналы неспецифически, т. е. кривая зависимости угнетения ими медленных ПД от концентрации идентична аналогичной кривой для скорости нарастания «быстрых» ПД. Угнетенные «быстрые» ПД, возникающие в

растворе с 10 мМ [K⁺]_о, были приблизительно в 10 раз более чувствительны к лидокаину [42]. Халотан и энфлуран более избирательно ингибируют медленные каналы миокардиальных клеток, чем быстрые натриевые каналы [43].

ВОЗНИКНОВЕНИЕ И РАСПРОСТРАНЕНИЕ МЕДЛЕННЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ ДЕЙСТВИЯ

Порог возбуждения медленных ПД почти в 10 раз выше, чем порог «быстрых» ПД, т. е. медленные ПД обладают низкой возбудимостью. Пороговый потенциал ($V_{\text{пор}}$) для медленных ПД составляет около -35 мВ, в то время как порог для «быстрых» ПД находится около -55 мВ, т. е. критический уровень деполяризации, необходимый для возбуждения медленных ПД, является более высоким (в предположении неизменности потенциала покоя, равного -80 мВ). Хронаксия для медленного ПД (0,9 мс) приблизительно в 10 раз больше, чем для «быстрого» ПД [43].

Медленные ПД распространяются со скоростью около 4—10 см/с [44]. Для простого кабеля скорость проведения (θ) прямо пропорциональна величине $\sqrt{V_{\text{макс}}}$ [45], т. е. чем больше скорость нарастания ПД, тем быстрее распространение. (Для миокарда имеются исключения из этого закона, выявляемые при сравнении поперечного распространения с продольным и связанные с тем, что его ткань не является простым кабелем.) Таким образом, если учесть, что нормальный ПД распространяется в сердечной мышце со скоростью 0,4 м/с при $V_{\text{макс}} = 150$ В/с, тогда если $V_{\text{макс}}$ уменьшить до 15 В/с, характерной для медленного ПД, то θ должно уменьшиться в $\sqrt{10}$ раз и быть равной 0,127 м/с. Однако скорость распространения уменьшается в большей степени, чем предполагается, как в рабочем миокарде (предполагается 12,7 см/с, реально 4—10 см/с), так и в волокнах Пуркинье (предполагается 0,2 м/с, реально $< 0,1$ м/с) [46]. Авторы указанной работы [46] объясняют наблюдаемое расхождение свойствами медленного ПД, при развитии которого эффективная емкость мембраны (C_m) как бы более высокая, т. е. мембрана характеризуется более высоким емкостным импедансом (X_c). Пока не ясно, до какой степени возможно декрементное проведение, т. е. проведение с уменьшением скорости проведения и амплитуды ответа при увеличении расстояния вдоль мышцы.

Был проведен ряд исследований для изучения способности распространяющихся нормальных ПД запускать медленные ПД. Masuda и соавт. [44] провели эксперименты на полосках левого предсердия сердца кролика (состоящих из однородных параллельных пучков волокон), разделенных на 3 функциональных сегмента, причем левый (тестовый) сегмент перфузировали раствором, содержащим 12,7 мМ [K⁺]_о и 1 мМ [Ba²⁺]_о для деполяризации до уровня, достаточного для блокирования нормальных «быстрых» ПД. Они обнаружили, что при высокой частоте стимуляции (0,63—2,5 Гц) наблюдается 2 : 1 блокирование проведения,

обусловленное «усталостью» медленного ПД (замедлением восстановления возбудимости). Однако при низких частотах (0,13—0,4 Гц) стимуляция приводила к полному блокированию. Следовательно, имеется очень ограниченный диапазон частот, в пределах которого нормальный «быстрый» ПД способен вызывать появление медленных ПД с постоянным отношением 1:1. Низкочастотный блок объясняется наблюдаемым при таких частотах уменьшением амплитуды и длительности «быстрых» ПД в миокарде предсердий, так как ацетилхолин, укорачивающий фазу плато ПД предсердий, также блокирует развитие медленных ПД в тестовом отсеке при его добавлении в средний отсек. Следовательно, и амплитуда, и длительность, и частота следования «быстрых» ПД определяет их эффективность для запуска медленных ПД в деполяризованной области.

Авторы работы [43] изучали свойства «мембранных» (нераспространяющихся) медленных ПД, вызываемых (с помощью стимуляции через электрод-присоску) в коротких (2—3 мм) предсердных трабекулах из левого предсердия кролика на фоне 1 мМ $[Ca^{2+}]_o$ и 10 мМ $[K^+]_o$. Потенциал покоя в растворе, содержащем ионы Ca^{2+} и высокую концентрацию ионов K^+ , составлял -55 мВ, амплитуда медленных ПД была равна 60 мВ и $DPD_{50} - 84$ мс. Фаза быстрого нарастания медленного ПД всегда начиналась с небольшой подпороговой деполяризующей ступеньки потенциала. Медленный ПД развивался по принципу «все или ничего». «Усталость» медленных ПД наблюдалась при высоких частотах стимуляции (>1 Гц), и полные медленные ПД могли быть получены в определенном диапазоне частот, что было показано и для длинных полосок миокарда Masuda и соавт. [44].

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ МЕДЛЕННЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ ДЕЙСТВИЯ В РАЗВИТИИ АРИТМИЙ

Считают, что медленные ПД участвуют в развитии аритмий [43, 47—49]. Распространяющиеся «быстрые» ПД могут вызывать генерацию медленных ПД в деполяризованных участках миокарда [46]. Медленное проведение по некоторому пути позволяет возникать вдоль него круговому движению возбуждения и приводит к появлению аритмий рециркуляторного типа. Существует необходимость однопольного проведения через угнетенную область, и критической является длина петли рециркуляции, зависящая от скорости проведения. Угнетенная область с медленным проведением имеется в зоне ишемии или инфаркта и в окружающей граничащей зоне. Частичная деполяризация клеток в этой области обусловлена высокой концентрацией ионов K^+ в межклеточной жидкости, что является следствием гипоксии (ишемии) с последующим угнетением метаболизма. Кроме того, в этой области происходит освобождение норадреналина из окончаний симпатических нервов.

Освобождение порадrenalина должно повышать уровень ЦАМФ в клетках и увеличивать число медленных каналов, способных активироваться при возбуждении, приводя к увеличению И₁ в клетках из зоны ишемии. Однако условия гипоксии (ишемии) способствуют также угнетению I_{s1} вследствие сопутствующего им понижения уровня АТФ и зависимости работы медленных каналов от энергетического метаболизма. Следовательно, ПД в зоне ишемии может представлять собой либо а) угнетенный «быстрый» ПД (т. е. ПД, при котором входящий ток переносится небольшим числом быстрых натриевых каналов) вследствие частичной деполяризации (и зависимости h от V_m); либо б) «чистый» медленный ПД (т. е. ПД, при котором входящий ток переносится только медленными каналами), если калиевая деполяризация достаточно велика для полной инактивации всех (или большинства) быстрых натриевых каналов (около -55 мВ). Имеются подтверждения обеих возможностей [47].

Доказательством того, что ПД в зоне ишемии представляет собой угнетенный «быстрый» ПД, является блокирование такого ПД при действии ТТХ и отсутствие эффекта при действии верапAMILA [50, 51]. Кроме того, такую точку зрения подтверждают следующие факты: а) зависимость функционирования медленных каналов от энергетического метаболизма; б) дискинезия или аккинезия зоны ишемии. Вероятно, степень аккумуляции ионов K⁺ в межклеточном пространстве, а значит и уровень деполяризации, является одним из факторов, определяющих природу ПД в зоне ишемии, другими факторами может быть количество освобожденных из нервных окончаний катехоламинов в межклеточной жидкости и степень истощения уровня АТФ и ацидоза в поврежденных клетках.

Хотя местные анестетики угнетают и блокируют медленные ПД при той же концентрации, при которой они угнетают нормальный «быстрый» ПД [40], угнетенные «быстрые» ПД почти в 10 раз более чувствительны к действию этих веществ [42]. Так, прокаинаин, прокаинамид и другие антиаритмические препараты того же класса могут относительно избирательно подавлять угнетенные «быстрые» ПД в зоне ишемии (инфаркта), уменьшая, таким образом, возможность развития аритмий.

ПД в зоне ишемии характеризуются малой скоростью нарастания фронта ПД (V_{макс}), медленно распространяются (приблизительно 0,05 м/с) и почти у 35% ПД наблюдается зазубренный фронт или даже 2 пика [48]. Возникают задержки и, возможно, неопределенное проведение. В такой угнетенной области выявляется однонаправленный блок проведения, частотно-зависимый блок проведения Венкебаха. Фактор безопасности для проведения низок, в результате чего ПД может блокироваться на препятствиях. В качестве последних могут выступать структурные неоднородности и патологически измененные области [48]. Кроме того, такие неоднородности могут быть вскрыты при экстрвозбуждении, поэтому преждевременный ПД будет с большей легкостью распространяться в одном направлении, чем в другом. Такой однона-

правленный блок волны экстрвозбуждения создает одно из условий, необходимых для рециркуляции возбуждения, а именно однонаправленное проведение. Предполагают, что причиной нарушения проведения является увеличение сопротивления нервов (или ширины контактной щели) при гипоксии (ишемии) [48].

ВЛИЯНИЕ $[Ca^{2+}]_i$ НА КАНАЛЫ МЕМБРАНЫ

$[Ca^{2+}]_i$ сильно влияет на электрические свойства мембраны (рис. 8.20). Следовая деполяризация, развивающаяся после обычной следовой гиперполяризации, была впервые описана в культивируемых клетках сердца эмбриона цыпленка в работе [52], авторы которой запускали и выключали серию спонтанных ПД, пропуская гиперполяризующий ток различной интенсивности. Эти авторы показали, что каждый ПД в такой серии запускается предыдущим ПД с помощью задержанной следовой деполяризации. Вслед за этим Ferrie, Moe [53] описали такие же явления в сердце млекопитающего и назвали их задержанными последеполяризациями (ЗПД). Они показали, что сердечные гликозиды и повышение $[Ca^{2+}]_o$ потенцируют ЗПД, а кальциевые антагонисты угнетают или полностью устраняют ЗПД, и отметили их возможную роль в аритмогенезе.

Kass и соавт. [54] показали, что ЗПД не вызываются непосредственно всплеском входящего кальциевого тока, а скорее всего связаны с ним опосредованно, через освобождение ионов Ca^{2+} из СР, что в свою очередь приводит к увеличению неспецифической проводимости типа утечки для входящего деполяризующего тока, транзиторного входящего тока (I_{ti}). Реверсный потенциал (E_{rev}) I_{ti} составляет около -5 мВ, и он чувствителен к $[Na^+]_o$, но не к $[Ca^{2+}]_o$. Увеличение $[Ca^{2+}]_i$ открывает неспецифические потенциалозависимые ионные каналы, напоминающие по типу каналов постсинаптической мембраны, через которые могут проходить как ионы Na^+ , так и ионы K^+ . Каналы этого типа в чем-то аналогичны Ca^{2+} -активируемому калиевым каналам ($G_{K(Ca)}$) [26].

I_{ti} и сопровождающая его следовая волна сокращения усиливаются при действии дигиталиса, в бескальциевом растворе, при действии катехоламинов и при повышении $[Ca^{2+}]_o$. Влияние дигиталиса и бескальциевого раствора может быть объяснено ингибированием натрий-калиевого насоса. Например, оубаин потенцирует I_{ti} , ингибируя натрий-калиевый насос, что приводит к увеличению $[Na^+]_i$, а затем и к увеличению $[Ca^{2+}]_i$ по системе натрий-кальциевого обмена. В свою очередь повышенная концентрация $[Ca^{2+}]_i$ запускает освобождение Ca^{2+} из СР по механизму, названного Ca^{2+} освобождением Ca^{2+} , предложенному Fabiato, Fabiato [53]. Осцилляторное освобождение ионов Ca^{2+} способно объяснить наблюдаемые иногда затухающие осцилляции I_{ti} (а также ЗПД и следовых волн сокращения).

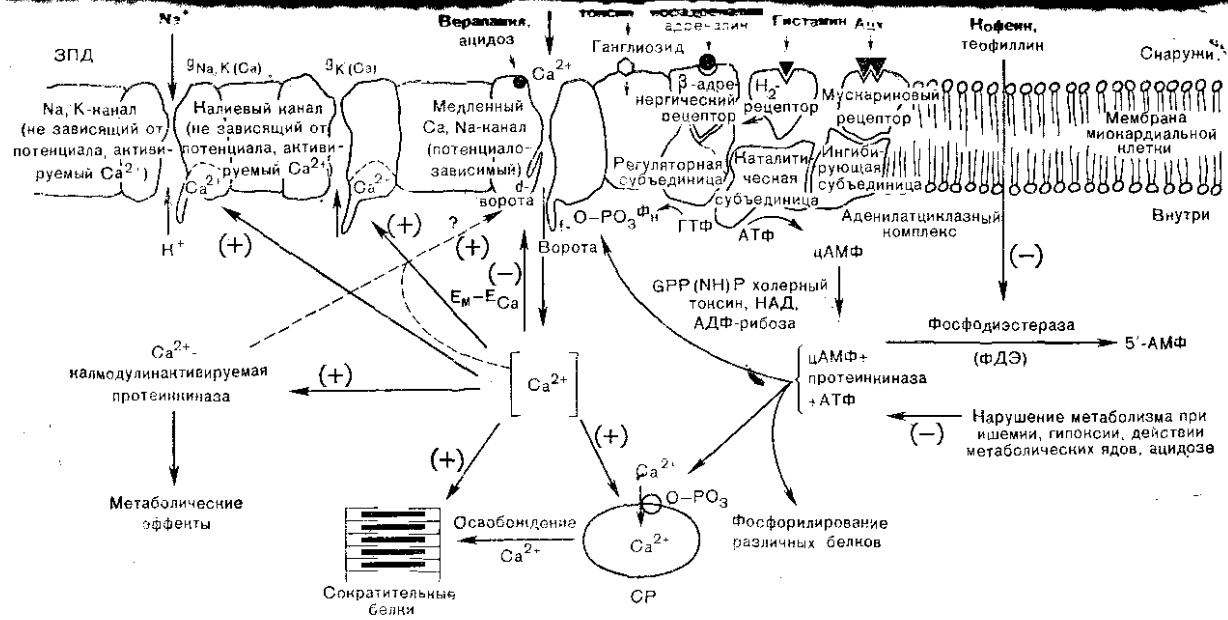


Рис. 8.20. Схема, на которой суммированы основные свойства ионных каналов мембраны миокардиальной клетки. Показаны также механизмы некоторых веществ, оказывающих положительное инотропное действие, таких как β-адрепергические агонисты, агонисты H₂-гистаминовых рецепторов и метилксантины (ингибиторы фосфодиэстеразы). Агонисты β-рецепторов и H₂-рецепторов действуют на регуляторный компонент (белок, связывающий гуанинуклеотиды) аденيلاتциклазного комплекса и усиливают образование цАМФ. Работа потенциалозависимых медленных (Ca-Na)-каналов зависит от концентрации цАМФ и энергетического метаболизма, что, по-видимому, обусловлено необходимостью фосфорилирования некоторого белкового компонента этого канала (или регуляторного белка, связанного с каналом), для возможности канала активироваться при деполаризации. Показаны места действия GPP(NH)P и холерного токсина на регуляторный компонент аденيلاتциклазы. Отмечено также, что медленные каналы селективно блокируются при ацидозе и кальциевыми антагонистами (блокаторами медленного канала). На схеме представлены, кроме того, два типа ионных каналов, не зависящих от потенциала, но активирующихся внутриклеточными ионами Ca²⁺: K⁺-селективный канал (g_{K(Ca)}) и неселективный NaK-канал (g_{Na, K(Ca)}). По [56].

I_{Ti} устраняется при предварительной обработке миокарда кофеином (10 мМ) для истощения запасов Ca^{2+} в СР. Прогрессирующая потенциация ЗПД или I_{Ti} во время серии ПД может быть объяснена постепенным увеличением загрузки СР ионами Ca^{2+} .

Таким образом, повышение $[Ca^{2+}]_i$ активирует ионные каналы по крайней мере двух различных типов: а) каналы неспецифической проводимости ($g_{Na, K(Ca)}$), которые определяют появление I_{Ti} и ЗПД и могут иметь важное значение для генерации нарушений ритма сердца и даже в формировании фазы плато сердечного ПД; б) Ca^{2+} -активируемая (Sr^{2+} и Ba^{2+} могут заменить Ca^{2+}) калиевая проводимость ($g_{K(Ca)}$), которая может играть существенную роль в укорочении сердечного ПД. Кроме того, авторы работы [49] представили доказательства того, что повышение $[Ca^{2+}]_i$ (но не Sr^{2+}) увеличивает потенциалозависимый I_{Si} в волокнах Пуркинье, и это может быть причиной некоторых эффектов сердечных гликозидов. Механизм такого действия $[Ca^{2+}]_i$ может быть основан на участии Са — кальмодулин-активируемой протеинкиназы и фосфорилировании медленных каналов. Этот эффект $[Ca]_i$ с положительной обратной связью не способен к регенеративной реакции, потому что высокая концентрация $[Ca]_i$ может ингибировать поступление ионов Ca^{2+} (отрицательная обратная связь) либо путем блокирования медленных каналов, либо уменьшением электрохимического градиента для входа ионов Ca^{2+} .

Заключение

Поступление ионов Ca^{2+} в миокардиальные клетки через потенциалозависимые и зависимые от времени медленные каналы во время сердечного потенциала действия является ключевым этапом электромеханического сопряжения и определяет силу сокращения сердца. Модель медленного канала аналогична модели быстрого натриевого канала, за исключением того, что медленные каналы: а) имеют более медленную кинетику открывания и закрывания ворот; б) работают в другом диапазоне потенциалов (потенциалы активации и инактивации менее отрицательны); в) блокируются разными веществами (примером кальциевого антагониста является верапамил, а блокатором быстрого натриевого тока — ТТХ). Кроме того, медленные каналы обладают некоторыми особыми свойствами (по сравнению с быстрыми натриевыми каналами или калиевыми каналами различных типов), что позволяет миокардиальной клетке осуществлять контроль за поступлением в них ионов Ca^{2+} в ответ на воздействие различных внутренних и внешних факторов, а также гормонов и нейромедиаторов. К таким свойствам относятся: а) зависимость от энергетического метаболизма; б) зависимость от рН; в) зависимость от цАМФ.

Симпатический нейромедиатор, норадреналин, гормоны типа катехоламинов, ангиотензин II, гистамин и метилксантины вызывают быстрое появление новых медленных Na^+/Ca^{2+} -каналов в миокардиальных клетках. После блокирования быстрых натрие-

ных каналов с помощью ТТХ или их инактивации при деполяризации в растворе с 25 мМ $[K^+]_o$, эти вещества способствуют возникновению медленно нарастающих ПД путем увеличения числа медленных каналов, способных активироваться при деполяризации и (или) путем увеличения среднего времени жизни их открытого состояния. Вместе с тем такие соединения вызывают быстрое повышение внутриклеточного уровня цАМФ, что позволяет предположить, что он каким-то образом связан с работой медленных каналов. Экзогенный цАМФ оказывает такое же действие, разншающееся, однако, значительно более медленно.

Воздействие аналога ГТФ, GPP(NH)P, на интактные миокардиальные клетки также приводит к появлению медленных ПД через 10—20 мин. Этот эффект, вероятнее всего, связан с активацией аденилатциклазного комплекса. Внутриклеточное введение цАМФ, GPP(NH)P или холерного токсина (который также является активатором аденилатциклазного комплекса) вызывает быстрое возникновение или потенциацию уже существующих медленных ПД в данной клетке. Таким образом, временная задержка между началом воздействия вещества и развитием наблюдаемого эффекта существенно уменьшается при внутриклеточном введении вещества. Эти результаты ясно указывают на ключевую роль, которую играет цАМФ в регуляции работы медленных кальциевых каналов, а следовательно, в регуляции поступления ионов Ca^{2+} в миокардиальные клетки и силы сокращения.

Индукированные медленные каналы очень чувствительны к блокированию метаболитическими ядами и угнетаются в условиях гипоксии и ишемии (см. рис. 8.20). Медленный ПД блокируется в то время, когда скорость нарастания и длительность нормального «быстрого» ПД существенно не изменяются. Однако сокращение, сопровождающее «быстрый» ПД, сильно угнетается или полностью подавляется, т. е. сокращение разобщается с возбуждением, что и следует ожидать при блокировании медленных каналов. При действии метаболитических ядов, например валиномицина или ДНФ, внутриклеточный уровень АТФ сильно снижается в то же время, когда происходит блокирование медленных каналов [55]. Следовательно, работа медленных каналов зависит от энергетического метаболизма, вероятнее всего, от концентрации АТФ, в то время как быстрые натриевые каналы от метаболизма не зависят. Второе, значительно более медленное, влияние метаболизма состоит в ускорении кинетики открытия g_k , которое, возможно, опосредовано увеличением установившегося уровня $[Ca^{2+}]_i$.

Зависимость медленных каналов миокардиальных клеток от уровня цАМФ и от энергетического метаболизма позволяет предположить, что они получают возможность активироваться при деполяризации лишь при фосфорилировании мембранного белка, входящего в состав медленного канала, или связанного с ним регуляторного белка с помощью цАМФ-зависимой протеинкиназы, использующей энергию АТФ [56, 57]. Дефосфорилированный медленный канал не способен открываться при деполяризации, т. е.

находится в нерабочем состоянии. Фосфорилирование может вызывать конформационное изменение белков, позволяющее воротам медленного канала срабатывать в ответ на изменение мембранного потенциала.

Медленные каналы также селективно блокируются раствором с кислым рН, т. е. при рН 6,8—6,1 медленный ПД угнетается или полностью блокируется. Нормальный «быстрый» ПД в этих условиях существенно не изменяется, однако происходит разобщение процесса электромеханического сопряжения. Быстрое блокирование медленных каналов при ишемии, по-видимому, частично связано с ацидозом, сопутствующим ей.

Благодаря таким особым свойствам медленных каналов поступление ионов Ca^{2+} в миокардиальную клетку может контролироваться внешними факторами, такими, как, например, стимуляция нервов вегетативной нервной системы или наличие в крови циркулирующих гормонов, а также такими внутренними факторами, как внутриклеточный рН или уровень АТФ. При кратковременной локальной ишемии селективное блокирование медленных каналов, приводящее к угнетению силы сокращения и уменьшению работы, совершаемой поврежденной клеткой, могло бы способствовать защите клеток от необратимого повреждения благодаря сохранению в них некоторого минимального уровня АТФ.

Парасимпатический нейромедиатор ацетилхолин угнетает медленный входящий ток (I_{s1}), который усиливается β -адренергическими агонистами и увеличивает выходящий калиевый ток.

Пороговый потенциал активации медленных каналов равен приблизительно -35 мВ по сравнению с -55 мВ для быстрых натриевых каналов. $V_{\text{макс}}$ медленного ПД составляет около 10 В/с, а скорость его распространения (0,04—0,10 м/с) составляет $1/6$ — $1/3$ от скорости распространения нормального ПД. При частоте стимуляции выше 1 Гц наблюдается угнетение медленных ПД. «Быстрые» ПД могут запускать медленные ПД в участках, деполаризованных калием. Медленные ПД принимают участие в развитии рециркуляционных аритмий в зоне ишемии, но имеются данные, что в некоторых случаях регистрируемые в зоне ишемии ПД представляют собой угнетенные «быстрые» ПД, а не истинные медленные ПД; однако в любом случае скорость распространения ПД будет низкой, поэтому и возникают нарушения проводимости, создающие предрасположенность к развитию нарушений ритма сердца. Несмотря на то что медленные ПД и «быстрые» ПД блокируются одними и теми же концентрациями местных анестетиков, угнетенные «быстрые» ПД более чувствительны к действию этих препаратов.

В развитии аритмий по типу триггерного автоматизма принимают участие задержанные следовые потенциалы. Эти следовые потенциалы обусловлены тем, что при увеличении $[\text{Ca}^{2+}]_i$ открываются потенциалозависимые неспецифические ионные каналы постсинаптического типа, реверсный потенциал которых составляет около -5 мВ. Любые условия и вещества, способствующие увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$: гипоксия, ишемия, дигиталис или

катехоламины — усиливают следовые потенциалы, приводя к повышению вероятности запуска серии ПД из этого эктопического фокуса и вызывая аритмии. Кальциевые антагонисты, блокируя медленные каналы и угнетая таким образом поступление ионов Ca^{2+} в клетки, снижают накопление их в СР, подавляют следовые потенциалы и предотвращают развитие аритмий такого типа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schneider J. A., Sperelakis N.* The demonstration of energy dependence of the isoproterenol-induced transcellular Ca^{++} current in isolated perfused guinea pig hearts: an explanation for mechanical failure in ischemic myocardium. — *J. surg. Res.*, 1974, vol. 16, p. 389—403.
2. *Sperelakis N.* Electrophysiology of vascular smooth muscle of coronary artery. — In: *The coronary artery*/Ed. S. Karsner. Croom Helm, 1982, p. 118—167.
3. *Pappano A. J.* Calcium-dependent action potential produced by catecholamines in guinea pig atrial muscle fibers depolarized by potassium. — *Circulat. Res.*, 1970, vol. 27, p. 379—390.
4. *Sperelakis N.* Changes in membrane electrical properties during development of the heart. — In: *The slow inward current and cardiac arrhythmias*/Ed. D. P. Zipes, J. C. Bayley, V. Elharrar. Martinus Nijhoff, 1980, p. 221—262.
5. *Lee K. S., Tsien R. W.* Reversal of current through calcium channels in dialysed single heart cells. — *Nature*, 1982, vol. 297, p. 498—501.
6. *Fabiato A., Fabiato F.* Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. — *Ann. Rev. Physiol.*, 1979, vol. 41, p. 473—484.
7. *Josephson I., Renaud J. F., Vogel S.* et al. Mechanism of the histamine-induced positive inotropic action in cardiac muscle. — *Europ. J. Pharmacol.*, 1976, vol. 35, p. 393—398.
8. *Shigenobu K., Sperelakis N.* Ca^{++} current channels induced by catecholamines in chick embryonic hearts whose fast Na^{+} channels are blocked by tetrodotoxin or elevated K^{+} . — *Circ Res* 31: 932—952, 1972.
9. *Freer R. J., Pappano A. J., Peach M. J.* et al. Mechanism of the positive inotropic effect of angiotensin II on isolated cardiac muscle. — *Circulat. Res.*, 1976, vol. 39, p. 178—183.
10. *Reuter H., Stevens C. F., Tsien R. W., Yellen G.* Properties of single calcium channels in cardiac cell culture. — *Nature*, 1982, vol. 297, p. 501—540.
11. *Schneider J. A., Sperelakis N.* Valinomycin blockade of slow channels in guinea pig hearts perfused with elevated K^{+} and isoproterenol. — *Europ. J. Pharmacol.*, 1974, vol. 27, p. 349—354.
12. *Shigenobu K., Schneider J. A., Sperelakis N.* Verapamil blockade of slow Na^{+} and Ca^{++} responses in myocardial cells. — *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1974, vol. 190, p. 280—288.
13. *Reuter H., Scholz H.* The regulation of the calcium conductance of cardiac muscle by adrenaline. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1977, vol. 264, p. 49—62.
14. *Sperelakis N., Schneider J. A.* A metabolic control mechanism for calcium ion influx that may protect the ventricular myocardial cell. — *Amer. J. Cardiol.*, 1976, vol. 37, p. 1079—1085.
15. *Watanabe A. M., Besch H. R. Jr.* Cyclic adenosine monophosphate modulation of slow calcium influx channels in guinea pig hearts. — *Circulat. Res.*, 1974, vol. 35, p. 316—324.
16. *Tsien R. W., Giles W., Greengard P.* Cyclic AMP mediates the effects of adrenaline on cardiac Purkinje fibers. — *Nature (New Biol.)*, 1972, vol. 240, p. 181—183.
17. *Josephson I., Sperelakis N.* 5'Guanylimidodiphosphate stimulation of slow Ca^{++} current in myocardial cells. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1978, vol. 10, p. 1157—1166.

Глава 9

ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКОЕ СОПРЯЖЕНИЕ. СВЯЗЬ МЕДЛЕННОГО ВХОДЯЩЕГО ТОКА С СОКРАЩЕНИЕМ

Т. Ф. Мак ДОНАЛЬД (Т. F. McDONALD)

ВВЕДЕНИЕ

В основе фазического сокращения мышечных клеток лежит транзиторное увеличение концентрации ионов Ca^{2+} около миофибрилл, хотя источник этого Ca^{2+} не один и тот же для всех типов мышц. В скелетной мышце активирующие сокращение ионы Ca^{2+} поступают почти исключительно из цистерн саркоплазматического ретикулума (СР), в то время как в сердце лягушки он, по-видимому, поступает из внеклеточного пространства. Миокард млекопитающих занимает промежуточное положение, так как его сокращение, по-видимому, в основном зависит от ионов Ca^{2+} , освобождаемых из СР, однако для его развития требуется также поступление ионов Ca^{2+} через сарколемму. Такое поступление ионов Ca^{2+} происходит как часть медленного входящего тока (I_{si}), проходящего через Ca^{2+} -селективные каналы. Так как эти каналы открываются при потенциалах выше -50 мВ, I_{si} течет во время фазы плато потенциала действия, т. е. как раз тогда, когда он может принимать участие в процессе электромеханического сопряжения. В этой главе будет рассмотрена роль I_{si} в этом процессе, причем особое внимание будет уделено экспериментам по фиксации потенциала на миокарде желудочков сердца млекопитающих.

В первом из приведенных ниже разделов дано краткое описание I_{si} внутриклеточных запасников ионов Ca^{2+} и освобождения ионов Ca^{2+} из СР. В последующих разделах представлены основные доказательства, свидетельствующие о выполнении I_{si} по крайней мере трех функций в процессе электромеханического сопряжения: а) триггера освобождения ионов Ca^{2+} , активирующего сокращение, из внутренних запасников (СР); б) регулятора количества освобожденного Ca^{2+} ; в) источника ионов Ca^{2+} для пополнения запасов СР.

Известно, что существует множество других важных аспектов электромеханического сопряжения, которые не могут быть описаны в этой главе. К ним, например, относится Na^+ — Ca^{2+} -обмен и для обсуждения этого вопроса мы рекомендуем читателям обратиться к недавно опубликованным обзорам [1, 2], а также к другим главам этой книги. Кроме того, можно ознакомиться с бол

ранними обзорами по электромеханическому сопряжению [3—7], они более широко освещают этот вопрос и в некоторых случаях предлагают другую точку зрения, отличную от выраженной нами.

КРАТКИЙ ОБЗОР СВОЙСТВ I_{si} , ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ЗАПАСНИКОВ ИОНОВ Ca^{2+} И ОСВОБОЖДЕНИЯ ИОНОВ Ca^{2+} ИЗ СР

Считают, что I_{si} течет через потенциалозависимые и зависящие от времени кальциевые каналы, аналогично тому как ионы Na^+ проникают через быстрые натриевые каналы. Поэтому для изучения I_{si} будет полезно использовать формулу Ходжкина — Хаксли [3]:

$$I_{si} = g_{si}(E_m - E_{si}),$$

где g_{si} — проводимость канала, $(E_m - E_{si})$ — электродвижущая сила для I_{si} . Изменение g_{si} во времени определяется соотношением:

$$g_{si}(t) = \bar{g}_{si} \cdot d(t) \cdot f(t),$$

где \bar{g}_{si} — максимальная проводимость; d — параметр активации, f — параметр инактивации. Безразмерные переменные d и f имеют установившиеся значения, d_∞ и f_∞ между 0 и 1. Установившиеся значения зависят от потенциала и скорость их достижения определяется зависящими от потенциала постоянными времени τ_d и τ_f .

При подаче ступеньки деполяризации относительно потенциала покоя или поддерживаемого потенциала порог для I_{si} оказывается между -50 и -35 мВ. При деполяризации до более положительных потенциалов развивается I_{si} , максимальная амплитуда которого резко возрастает между пороговым потенциалом и 0 мВ, а затем уменьшается до небольших величин около $+50$ мВ. Потенциал, при котором ток становится равным нулю, или реверсный потенциал (E_{si}) для I_{si} исключительно трудно измерить. Вероятно, E_{si} находится между $+50$ и $+80$ мВ в зависимости от вида животных [8—10]; если бы I_{si} был чисто кальциевым током, его реверсный потенциал должен был быть около $+120$ мВ. Менее положительная величина E_{si} указывает, таким образом, что определенный вклад в I_{si} вносит также и движение других ионов, в основном Na^+ и K^+ [9, 10]. Несмотря на то что селективность медленного канала для ионов Ca^{2+} по крайней мере в 100 раз выше, чем для ионов Na^+ или K^+ [9], тем не менее то обстоятельство, что этот ток не является чисто кальциевым током, осложняет интерпретацию экспериментов, проводимых с целью выяснения количественных соотношений между медленным током и сокращением. Обычно предполагают, так же как и мы в этой главе, что амплитуда I_{si} пропорциональна амплитуде кальциевого тока. Следует помнить, что это предположение становится менее справедливым, а иногда и совершенно неверным при потенциалах, находящихся около значений E_{si} . Наконец, отметим, что предлагаемое описание I_{si} является рабочей гипотезой, кото-

рая может нуждаться в изменении при получении новой информации. Более полное описание I_{si} и кальциевого канала представлено в литературе [14—16].

Внутриклеточные запасы ионов Ca^{2+} и сокращение

Первое предположение о существовании связи между трансмембранным кальциевым током, внутриклеточными запасами ионов Ca^{2+} , активирующих сокращений, и самим сокращением было получено в исследованиях, в которых длительности потенциала действия в препаратах миокарда млекопитающих изменяли с помощью гиперполяризующих и деполяризующих импульсов тока. В частности, авторы работ [17—18] выдвинули гипотезу, что ионы Ca^{2+} , входящие в клетку во время потенциала действия, пополняют внутриклеточные запасы ионов Ca^{2+} ; последующая деполяризация освобождает этот связанный внутри клетки кальций, что приводит к активации миофибрилл. Данные, полученные в экспериментах на изолированных везикулах СР и скиннированных миокардиальных клетках, показывают, что участком запасаения ионов Ca^{2+} внутри клетки скорее всего является СР, как указано в [19].

Механизм освобождения ионов Ca^{2+} из СР неизвестен как для скелетной мышцы, так и для миокарда. Основная гипотеза заключается в том, что небольшое увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} запускает освобождение большого количества Ca^{2+} из СР. Эта концепция появилась в результате первых работ Ford, Podolsky [20, 21], Endo и соавт. [22] на скиннированных волокнах скелетной мышцы и работ Fabiato, Fabiato [23] на одипочных скиннированных миокардиальных клетках. Несмотря на то что дальнейшие исследования на скиннированных волокнах скелетной мышцы заставили Endo [24] отказаться от этой гипотезы, впечатляющие и тщательные выполненные в течение последних 5 лет эксперименты Fabiato, Fabiato [25—28] значительно укрепили доверие к этой гипотезе относительно миокардиальных клеток. Широкий обзор доказательств ее справедливости представлен и в главе 11 данной книги. Комбинация нескольких процессов: поглощения ионов Ca^{2+} СР, выведение ионов Ca^{2+} по механизму $Na^{+}-Ca^{2+}$ -обмена и выведение ионов Ca^{2+} с помощью активного сарколеммального насоса, вполне, по-видимому, способно восстановить внутриклеточную концентрацию ионов Ca^{2+} до уровня покоя в течение диастолы.

I_{si} и сокращение в условиях изменения его величины путем изменения мембранного потенциала

Так как I_{si} течет по тем каналам, работа ворот которых зависит от потенциала и времени, его амплитуда может изменяться в широком диапазоне при использовании фиксации потенциала на различных уровнях. Стандартный подход состоит в фиксации потенциала на мембране, равном некоторому отрицательному поддерживаемому потенциалу, с последующей подачей деполяризующих ступенек потенциала. Длительность ступе

пик обычно близка к продолжительности потенциала действия, а их амплитуда увеличивается с шагом 10—20 мВ до тех пор, пока не будет исследован весь диапазон потенциалов от —60 до +60 мВ. Измеренные одновременно в таких условиях амплитуды I_{s1} и величины силы сокращения могут быть затем нанесены на график для получения вольтамперных кривых и кривых зависимости силы сокращения от потенциала. Вторым способом изменения амплитуды I_{s1} является использование ступенек потенциала до одной и той же величины, подающихся после некоторой предварительной ступеньки потенциала разной амплитуды, используемой для изменения доли кальциевых каналов, способных активироваться. Результаты экспериментов этих двух типов описаны в двух последующих разделах.

Вольтамперные зависимости и зависимости силы сокращения от потенциала

На рис. 9.1 показаны зависимости амплитуды I_{s1} и силы сокращения от потенциала. Данные получены на папиллярной мышце сердца кошки, и во многих деталях они соответствуют опубликованным результатам других исследований, полученным на препаратах желудочков сердца кошки и животных других видов. Замечают внимания три аспекта: пороговый потенциал, связь между I_{s1} и силой сокращения при потенциале до +20 мВ и связь между ними при потенциалах выше +20 мВ.

В миокарде желудочков сердца собаки [29], кошки [8], овцы [30], быка (McDonald, Trautwein, неопубликованные данные) и в волокнах Пуркинье овцы [31] пороговые потенциалы для активации I_{s1} и активации сокращения очень близки, хотя и не равны между собой. Фактически New, Trautwein [8] сообщили, что они никогда не наблюдали ни I_{s1} без сокращения, ни сокращения без I_{s1} . В одном из ранних обзоров по этому вопросу [17] было предположено, что I_{s1} без сопровождающего его сокращения можно наблюдать после истощения гипотетических запасников ионов Ca^{2+} . Размышляя над этим утверждением, следует учитывать, что в работе [17] оно не было подтверждено экспериментальными доказательствами и что в зависимости от применяемого метода может возникать проблема измерения очень маленьких сил в препаратах, используемых для фиксации потенциала.

В миокарде желудочков имеется тесная связь между амплитудой I_{s1} и силой сокращения при потенциалах в диапазоне от порога до +20 мВ; это является обычным для многих видов животных [29, 32, 33]. Однако при более положительных потенциалах возникает проблема, когда амплитуда I_{s1} уменьшается значительно круче, чем пик сокращения. Это наблюдение было подтверждено во многих исследованиях [8, 29]. Поэтому исследователи пытались во что бы то ни стало выяснить, какая максимальная амплитуда сокращения может наблюдаться при малых величинах I_{s1} при потенциалах, расположенных около значений E_{s1} или даже слегка превышающих их. На основании недавних опубликованных работ [9, 10] по поводу ионной природы I_{s1} можно

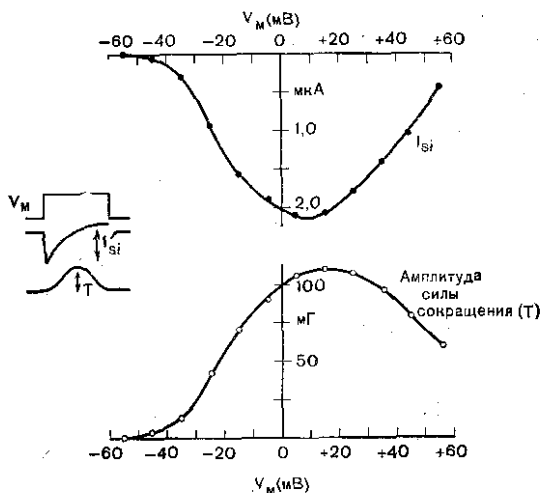


Рис. 9.1. Установившиеся зависимости I_{si} и силы сокращения от потенциала в миокарде желудочка сердца коники. I_{si} и силу сокращения измеряли при изменении потенциала от -55 мВ до некоторого уровня потенциала V_m , длительность ступеньки — 300 мс (см. схему на рисунке). Каждую следующую ступеньку подавали после достижения установившихся значений тока и силы сокращения при подходе в ступенек потенциала от -55 до -10 мВ длительностью 300 мс с частотой 0,2 Гц (McDonald, Trautwein, неопубликованные данные).

предложить следующее объяснение, что, хотя реверсия суммарного I_{si} может происходить при потенциалах между $+50$ и $+80$ мВ, внутрь направленный кальциевый компонент этого тока может сохраняться вплоть до потенциала $+120$ мВ.

Относительно зависимостей I_{si} и сокращения от потенциала следует также заметить, что обе эти величины предположительно зависят от внеклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , т. е. увеличение внеклеточной концентрации ионов Ca^{2+} приводит к увеличению как I_{si} , так и сокращения [29, 32].

Число неинaktivированных кальциевых каналов и сокращение

Амплитуду I_{si} можно изменять в широких пределах, воспользовавшись зависимостью воротного механизма кальциевых каналов от времени и потенциала. Например, кальциевые каналы частично инактивируются, если на 0,5 с деполяризовать мембрану выше -50 мВ. При такой ступеньке потенциала возникающий I_{si} будет по амплитуде составлять лишь часть того тока, который возникает, если ступеньку потенциала такой же амплитуды подать с уровня поддерживаемого потенциала ниже -50 мВ. После деполяризации до -20 мВ тестирующая ступенька потенциала вызовет I_{si} с амплитудой, составляющей 50% от контрольной, а после деполяризации — до 0 мВ, останется лишь 5% неинaktivированных каналов [3, 12]. Гиперполяризация может реактивировать каналы, т. е. вернуть их в состояние, при котором они снова могут быть открыты. Доля реактивированных каналов зависит от потенциала, достигнутого при гиперполяризации, а скорость реактивации (удаления инактивации) также является функцией этого потенциала.

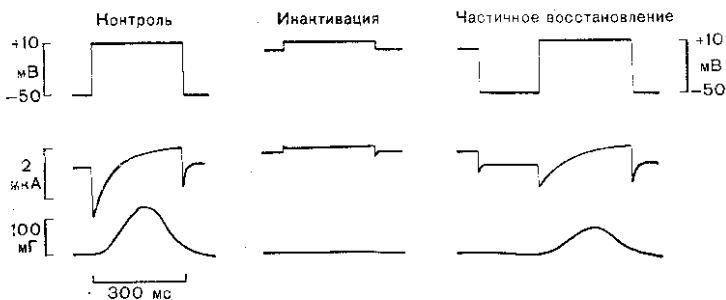


Рис. 9.2. Величины I_{Ca} и сокращение после инактивации и частичного восстановления возбудимости кальциевых каналов миокарда желудочка сердца кошки. После получения контрольной регистрации (слева) кальциевые каналы инактивировали, сместив поддерживаемый потенциал от -50 до 0 мВ. В этом случае ступеньки потенциала до $+10$ мВ практически не вызывают никакого образования I_{Ca} и сокращения (в центре). Гиперполяризация до уровня -50 мВ на 200 мс переводит часть каналов из инактивированного состояния в состояние покоя, на что указывает частичное восстановление величины тока I_{Ca} и силы сокращения во время ступеньки потенциала до 10 мВ (справа).

Поэтому нам хотелось бы изучить изменения силы сокращения при изменении амплитуды I_{Ca} , вызываемого серией ступенек потенциалов, влияющих на состояние проводимости кальциевых каналов. На рис. 9.2 приведены сравнительные данные контрольной реакции с полученными при полной инактивации системы кальциевых каналов и при частичной ее реактивации. В контроле ступенька потенциала от -50 до $+10$ мВ длительностью 300 мс вызывала I_{Ca} большой амплитуды, который сопровождался сокращением препарата (слева). После этого кальциевые каналы инактивировали, смещая поддерживаемый потенциал до 0 мВ. Активирующая ступенька до той же величины потенциала ($+10$ мВ) в этом случае вызывала I_{Ca} существенно меньшей амплитуды, амплитуда силы сокращения также была очень маленькой (в центре). Инактивацию можно устранить путем реактивации мембраны до более отрицательных потенциалов. Если провести реактивацию кальциевых каналов с помощью предварительной ступеньки до потенциала -50 мВ и длительностью 200 мс, то тестирующая ступенька до $+10$ мВ вызовет такие I_{Ca} и сокращение, амплитуды которых составляют около 60% от контрольных величин. Такая пропорциональность между I_{Ca} и сокращением сохраняется во всем диапазоне потенциалов от потенциала, при котором все кальциевые каналы способны к активации, до потенциала, который инактивирует все каналы (от -60 мВ до $+10$ мВ, рис. 9.3). Кроме того, такая пропорциональность наблюдается и в экспериментах по изучению зависимости реактивации I_{Ca} от времени (рис. 9.4). При устранении инактивации во время реполяризации восстановления I_{Ca} и максимума силы сокращения происходит параллельно, следуя экспоненциальному закону.

На основании данных, приведенных на рис. 9.1, можно утверждать, что сокращение связано просто с уровнем деполяризации

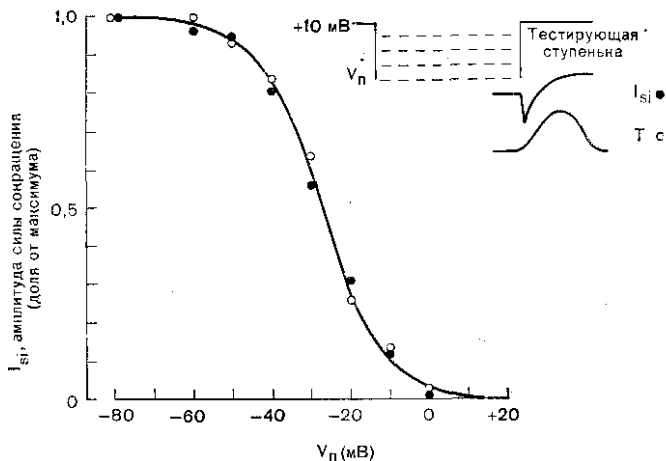


Рис. 9.3. Корреляция между I_{Si} и силой сокращения, полученная при разных уровнях инактивации кальциевых каналов. Мембранный потенциал папиллярной мышцы кошки поддерживали на уровне 10 мВ (полная инактивация I_{Si}). Затем мембрану гиперполяризовали до различных уровней потенциала V_n на 1500 мс. Показатель I_{Si} (обозначены темными кружками) и силы сокращения (обозначены светлыми кружками) регистрировали при последующем возврате потенциала до уровня 10 мВ (тестирующая ступенька). Ступеньки до уровня V_n подавали с частотой 0,1 Гц (McDonald, Trautwein, неопубликованные данные).

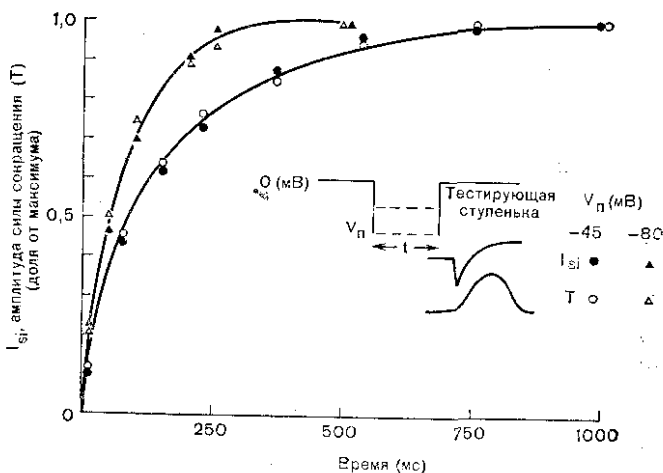


Рис. 9.4. Корреляция между временным ходом восстановления I_{Si} и силой сокращения. При увеличении длительности (t) ступеньки потенциала до уровня V_n , восстановление I_{Si} (темные символы) и силы сокращения (светлые символы) происходит с одной и той же постоянной времени. Уровни V_n устанавливали равным -45 или -80 мВ. Данные для $V_n = -45$ мВ получены Reuter [30] на миокарде желудочка сердца овцы; данные для $V_n = -80$ мВ получены на миокарде желудочка сердца кошки (McDonald, Trautwein, неопубликованные данные).

или же с амплитудой ступеньки и что сходство кривой зависимости силы сокращения от потенциала с вольтамперной кривой для I_{s1} чисто случайно. Однако результаты, показанные на рис. 9.2—9.4, неоспоримо свидетельствуют против случайности такой взаимосвязи. Предположение о том, что сила сокращения определяется уровнем деполяризации, опровергается тем обстоятельством, что ступеньки до одного и того же потенциала могут вызывать сокращения самой разной амплитуды (см. рис. 9.2). Возможная связь с амплитудой ступеньки исключается экспериментом с реактивацией, показанным на рис. 9.4; несмотря на постоянство амплитуды тестирующей ступеньки, сила сокращения изменяется в широком диапазоне.

В заключение описания экспериментов по изучению проводимости рассмотрим результаты, полученные авторами работы [12]. Они показали, что кривые зависимостей установившихся значений параметра активации (d_{∞}) и параметра инактивации (f_{∞}) от потенциала, полученные на миокарде сердца кошки, существенно перекрываются [3]. Эти зависимости являются почти зеркальным отражением друг друга и пересекаются в области потенциалов между -40 и 0 мВ, причем максимальное перекрывание находится около -20 мВ. В установившихся условиях это означает, что при таких потенциалах часть I_{s1} не инактивируется (так как $g_{s1} = g_{s1} \cdot d_{\infty} \cdot f_{\infty}$). Следовательно, при медленно нарастающем потенциале в диапазоне от -40 до 0 мВ проводимость практически не изменяется во времени и должны возникать неинактивирующийся I_{s1} и сократительный ответ. При этом оказалось, что связь сократительного ответа с потенциалом будет напоминать соответствующую зависимость произведения $d_{\infty} \cdot f_{\infty}$ от потенциала. И действительно экспериментальные результаты достаточно убедительно подтвердили это предположение, что показано на рис. 6 в работе [12].

СОКРАЩЕНИЕ В ПРИСУТСТВИИ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ, ИЗМЕНЯЮЩИХ I_{s1}

Недостаток места вынуждает ограничиться коротким рассмотрением только тех веществ, которые принадлежат к одной из следующих категорий: катехоламины, холинергические агонисты, сердечные гликозиды и блокаторы кальциевых каналов. Следует помнить, что большинство химических веществ, изменяющих I_{s1} , влияют также и на другие функции клетки, которые могут независимо от I_{s1} влиять на силу сокращения. Многие из таких эффектов более подробно описаны в других главах этой книги; наша цель состоит в том, чтобы выяснить, согласуется ли действие вещества на I_{s1} с его влиянием на сокращение.

Катехоламины

Авторы работы [34] впервые установили, что катехоламины увеличивают обмен ионов Ca^{2+} в сокращающихся миокардиальных

препаратах, но не влияют на него в препаратах в состоянии покоя. Связь между дополнительным поступлением ионов Ca^{2+} в клетки и их возбуждением была впервые выяснена автором работы [35], который обнаружил, что катехоламины увеличивают I_{si} в волокнах Пуркинье сердца. Reuter также измерил I_{si} и силу сокращения при действии катехоламинов на рабочий миокард желудочков. При частоте следования ступенек потенциала, равной 0,33 Гц, как I_{si} , так и сила сокращения за 1 мин увеличивались почти до 30% по сравнению с контролем. В этом же исследовании показано, что аналог цАМФ, дибутирил-цАМФ, оказывает действие сходное с катехоламином.

Холинергические агонисты

Ацетилхолин уменьшает I_{si} в предсердных трабекулах сердца земноводных [37, 38] и сердца млекопитающих [39]. Позднее авторы работы [40] измерили степень блокирования I_{si} в миокарде желудочка сердца морской свинки при действии ацетилхолина. Однако до того как авторы работы [39] провели эксперименты на предсердных трабекулах млекопитающих, трудно было сделать окончательный выбор между следующими возможностями: обусловлена ли хорошо известная связь между отрицательным инотропным действием ацетилхолина и укорочением плато потенциала действием увеличенного I_{K} или же здесь основную роль играет прямое его действие на кальциевую проницаемость. В работе этих авторов показано, что в условиях фиксации потенциала на мембране отрицательное инотропное действие Ацх проявляется только при его концентрациях, угнетающих I_{si} .

Сердечные гликозиды

Связь между I_{si} и положительным инотропным действием сердечных гликозидов еще не до конца выяснена. McDonald и соавт. [33] в экспериментах по фиксации потенциала на миокарде желудочков сердца кошки показали, что увеличение сократимости при действии гликозидов не связано с их влиянием на I_{si} . Однако авторы работы [41] в приведенных недавно исследованиях на двух различных препаратах (миокард желудочков сердца хорька и волокна Пуркинье телянка) установили, что увеличение I_{si} во времени при действии гликозидов происходит параллельно развитию положительного инотропного эффекта. Причина таких противоречивых результатов исследований действия сердечных гликозидов неясна. Однако в миокарде желудочков может существовать зависимость поступления ионов Ca^{2+} в клетки от их внутриклеточной концентрации, и в этом случае появляется возможность разрешить эту проблему [15, 41].

Блокаторы кальциевых каналов

К веществам, блокирующим кальциевые каналы миокардиальных клеток, относятся лантаниды, переходные металлы и некоторые органические соединения. В экспериментах по фиксации

потенциала наблюдали одновременное уменьшение I_{si} и силы сокращения при действии La^{3+} [42], Mn^{2+} [43] и Co^{2+} [44]. Органические соединения Д-600 и АQA-39 угнетают I_{si} и сокращение в зависимости от концентрации [45, 46]. Интересной особенностью действия Д-600 является то обстоятельство, что после достижения постоянного уровня блокирования силы сокращения амплитуда первого сокращения после периода покоя может быть во много раз больше установившейся (при действии вещества) величины при постоянной стимуляции. Это может быть объяснено освобождением рецептора кальциевого канала от блокатора во время периода покоя, что и приводит к появлению большой амплитуды в первом стимуле после этого состояния [47].

ВЛИЯНИЕ ЧАСТОТЫ СТИМУЛЯЦИИ НА I_{si} И СОКРАЩЕНИЕ

Частота стимуляции влияет на форму потенциала действия и силу сокращения довольно сложным образом. Одна из причин заключается в существовании, по-видимому, конституционных различий между разными тканями и видами животных [48, 49]. Влияние частоты стимуляции на I_{si} и сокращение изучали на миокардиальных препаратах сердца собаки, овцы, быка и кошки. Как будет показано ниже, полученные результаты создают вполне согласованную картину. Отметим, что большая серия экспериментов на волокнах Пуркинье овцы была проведена авторами работ [3, 50, 54] и недавно обсуждалась в обзоре Fozzard [7].

Результаты исследований частотно-зависимых изменений I_{si} и сокращения кратко суммированы на рис. 9.5. В этом эксперименте, проведенном на папиллярной мышце сердца кошки, подавали 8 ступенек потенциала с частотой 0,01 Гц, 8 ступенек с частотой 0,5 Гц, а затем 8 ступенек с частотой 2 Гц. Наложенные друг на друга записи трансмембранных ионных токов и сокращений получены во время восьмой ступеньки при каждой частоте; видно, что I_{si} имеет максимальную амплитуду, а сила сокращения минимальна при частоте стимуляции 0,01 Гц (см. рис. 9.5, а). График зависимости силы сокращения от амплитуды I_{si} показывает наличие обратной линейной зависимости между этими двумя параметрами (см. рис. 9.5, б).

В ранних исследованиях на миокардиальных препаратах собаки [29] и волокнах сердца кошки [8] не удалось обнаружить каких-либо изменений I_{si} , связанных с явлением положительной лестницы для силы сокращения при разных частотах стимуляции. Обнаружение обратной связи между этими параметрами в экспериментах на миокардиальных волокнах собаки и кошки в более поздних исследованиях [52, 53], по-видимому, объясняется усовершенствованием методики. Обратная связь была также отмечена в работе [54] на изолированных миоцитах желудочков сердца быка.

В предыдущих разделах этой главы на основании результатов различных типов экспериментов, было предположено, что из-

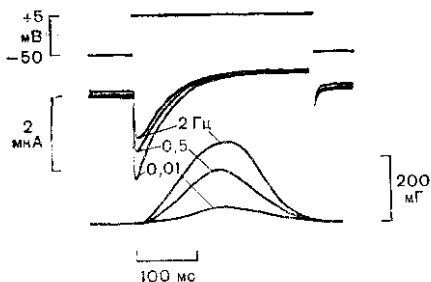
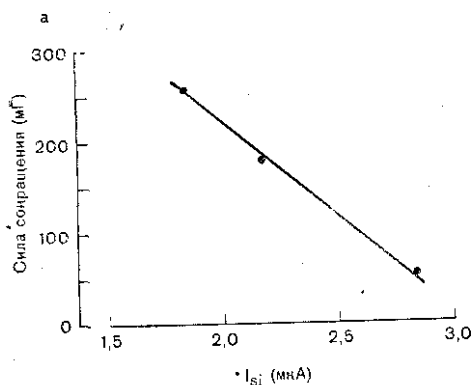


Рис. 9.5. Влияние частоты стимуляции на I_{si} и силу сокращения миокарда желудочка сердца кошки. Ступеньки потенциала длительностью 300 мс от -50 до $+5$ мВ подавали следующим образом: 8 ступенек — с частотой 0,01 Гц, 8 ступенек — с частотой 0,5 Гц и, наконец, 8 ступенек — с частотой 2 Гц.

а — наложенные друг на друга записи, полученные во время 8-й ступеньки на данной частоте; б — график силы сокращения от амплитуды I_{si} , величины взяты для 8-й ступеньки на каждой частоте (McDonald, Trautwein, неопубликованные данные).



менения I_{si} могут вызывать соответствующие по величине и знаку изменения силы сокращения. Противоречит ли этой точке зрения обратная связь, показанная на рис. 9.5?

Нет. В обсуждавшихся ранее экспериментах был разработан такой протокол, чтобы свести к минимуму изменения количества ионов Ca^{2+} , откладывающихся во внутриклеточных запасниках и способных освободиться из них при возбуждении. В экспериментах с изменением частоты стимуляции количество ионов Ca^{2+} , которые могут быть освобождены из СР, по-видимому, минимально после длительных периодов покоя или при низкочастотной стимуляции. Причиной этого является то обстоятельство, что при высоких частотах стимуляции за единицу времени в клетки поступает значительно больше ионов Ca^{2+} , способных пополнить запасы Ca^{2+} в СР, несмотря на относительно меньшую величину I_{si} , протекающего во время каждой ступеньки деполяризации. Поэтому сравнение амплитуд I_{si} и силы сокращения в условиях, когда внутриклеточные запасники полностью заполнены ионами Ca^{2+} , не дает практически никакой информации о способности I_{si} градуировать освобождение ионов Ca^{2+} внутри клетки по сравнению с условиями, когда запасники пусты. Нам в действительности необходимо установить, может ли I_{si} градуировать силу сокращения независимо от того, заполнены запасники, почти пусты или заполнены частично. Полученные недавно данные на препаратах желудочка сердца кошки и быка позволяют предположить, что можно положительно ответить на этот вопрос (McDonald, Pelzer, Trautwein, материал готовится к публикации).

Уменьшение I_{si} при увеличении частоты стимуляции несомненно связано с угнетением проводимости кальциевых каналов

или с уменьшением движущей силы для I_{si} . Последнее утверждение подтверждено большим количеством данных [3, 30, 52, 53], однако вопрос еще до конца не решен.

ТРАНЗИТОРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ I_{si} И СОКРАЩЕНИЯ, ВЫЗВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЕМ ДЛИТЕЛЬНОСТИ СТУПЕНЬКИ ПОТЕНЦИАЛА

Основная часть материала, представленного в предыдущих разделах, касалась соотношений между I_{si} и сокращением в установившихся условиях. В этом разделе мы не преследуем цель описать все те многочисленные ситуации, которые было бы правильно охарактеризовать как неустановившиеся состояния, а хотели бы сосредоточиться на некоторых отдельных случаях, указывающих на наиболее важные моменты этого вопроса. Переходные процессы, происходящие при изменении частоты стимуляции, представляют собой наиболее интересный из этих случаев. Например, увеличение частоты стимуляции миокардиального препарата желудочка сердца кошки приводит к уменьшению I_{si} с каждым последующим возбуждением и соответствующему увеличению силы сокращения; установившиеся значения (см. рис. 9.5) достигаются приблизительно за 6—8 стимулов. При возобновлении стимуляции после периода покоя указанное выше явление оказывается просто более ярко выражено в миокарде желудочка сердца как кошки [52], так и овцы [30].

Особенно интересные результаты были получены в экспериментах на волокнах Пуркинье собаки с использованием акворина [55, 56]. Акворин представляет собой Ca^{2+} -активируемый люминесцентный фосфобелок, который при введении внутрь клетки внешне применяется для регистрации быстрых изменений внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} во многих биологических препаратах [57], включая сердечную ткань [58, 59]. Wier [55] использовал акворинный метод в волокнах Пуркинье собаки, и вместе с Isenberg [56] они получили одновременные регистрации люминесценции акворина, силы сокращения и I_{si} в условиях фиксации потенциала. Сигнал люминесценции содержал два компонента: ранний всплеск (L_1), который достигает максимума в тот же момент времени, что и I_{si} , и более медленный всплеск (L_2) (рис. 9.6). В некоторых волокнах, в которых L_1 был основным компонентом, они наблюдали, что максимум амплитуды силы сокращения (очень маленькой в таких волокнах, где выявляется только L_1 всплеск), максимум I_{si} и L_1 одинаково зависели от потенциала. С другой стороны, L_2 обладал свойствами, предпологаемыми для освобождения ионов Ca^{2+} из запасников, и был связан с нормальным сокращением. Ни L_1 , ни L_2 не имели связи с поступлением ионов Ca^{2+} по механизму $Na^+ - Ca^{2+}$ -обмена, и оба компонента сигнала люминесценции угнетались Д-600. Последнее можно ожидать в том случае, если всплеск L_1 зависит от входа

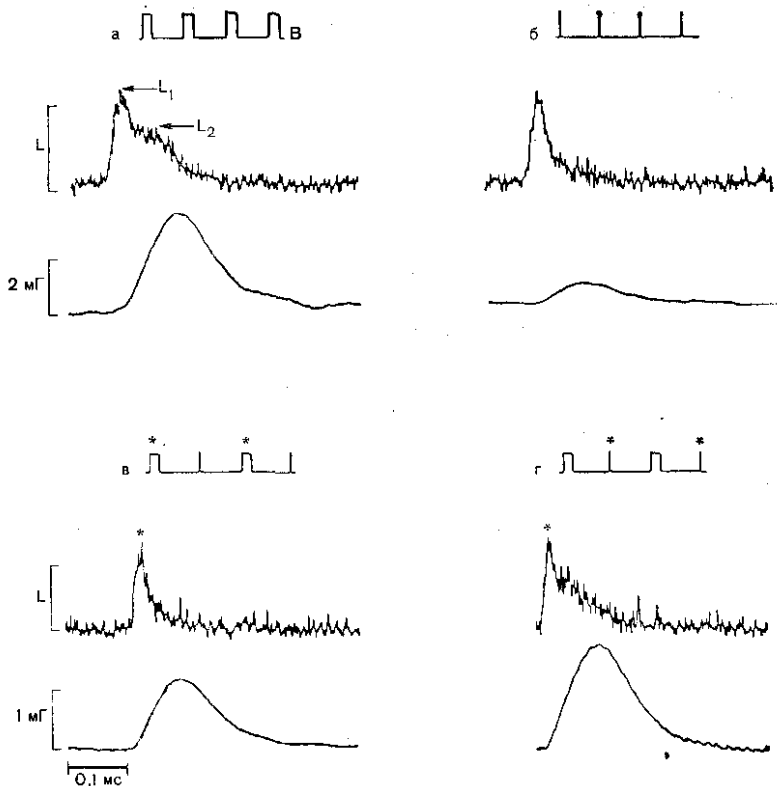


Рис. 9.6. Результаты экспериментов по фиксации потенциала на волокне Пуркинье собаки с инъекцией акворина.

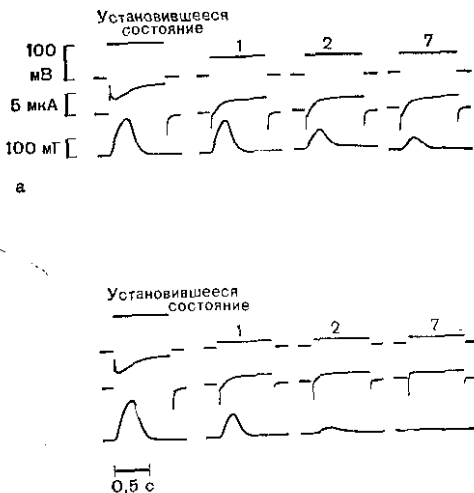
а-г — сверху — потенциал, в середине — интенсивность люминесценции акворина, внизу — сила сокращения. Записи на двух верхних фрагментах рисунка получены в контроле при стимуляции с частотой 0,4 Гц; длительность ступеньки на рис. а — 500 мс, на рис. б — 50 мс. При длительности 500 мс установившийся уровень силы сокращения был высоким, а в соответствующем сигнале люминесценции акворина были видны два компонента, L_1 и L_2 . Сокращение при длительности ступеньки 50 мс было значительно менее сильным, что сопровождалось уменьшением L_2 и отсутствием изменений L_1 . Так как амплитуда I_{si} изменялась при изменении длительности ступеньки и хорошо коррелировала с амплитудой L_1 (получено в другом эксперименте), компонент L_2 , по-видимому, отражает повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в результате освобождения Ca^{2+} из СР. Таким образом, во время ступенек длительностью 500 мс происходит пополнение внутриклеточных запасников и массивное освобождение Ca^{2+} из СР, поэтому сила сокращения имеет большую амплитуду. При более коротких ступеньках внутриклеточные запасники пополняются хуже, и меньшее количество Ca^{2+} освобождается из СР, поэтому отмечается менее сильное сокращение. Это значительно подчеркивается в экспериментах, показанных на фрагментах рис. в, г, в которых чередовали подачу ступенек длительностью 50 и 500 мс. В этом случае ступенька длительностью 50 мс (г) сопровождалась сокращением большей силы и более высокой амплитудой L_2 , чем более продолжительная (в), т. е. в случае когда короткой ступеньке предшествовали длительная, то внутриклеточные запасники, освобождающие Ca^{2+} во время следующей активации, пополняются более эффективно.

ионов Ca^{2+} с I_{si} и если для появления всплеск L_2 (освобождению ионов Ca^{2+} из СР) также необходим I_{si} .

Экспериментальные записи, полученные в одном из исследований с применением акворинового метода [56], иллюстрируют значение I_{si} в пополнении запасов Ca^{2+} в СР (см. рис. 9.6). На кон

Рис. 9.7. Двойственный характер I_{s1} во время нисходящих «лестниц» силы сокращения в пиллярной мышце сердца кошки.

а — после достижения установившихся условий при ступенке потенциала с амплитудой 110 мВ, амплитуду ступенки снижали до 65 мВ; б — в тех же условиях амплитуду ступенки снижали до 18 мВ. В обоих случаях наблюдали постепенное уменьшение силы сокращения, т. е. нисходящую «лестницу». Однако при амплитуде ступенек 65 мВ I_{s1} постепенно усиливался, а при амплитуде 18 мВ — уменьшался. Модифицировано из [33].



тройных пробегах (верхние записи) видно, что ритмическая стимуляция с частотой 0,4 Гц вызывает I_{s2} и сокращение значительно

большей амплитуды при длительности ступеньки потенциала 500 мс (см. рис. 9,6, а), чем при длительности ступеньки 50 мс (см. рис. 9,6, б). Однако, L_1 и I_{s1} (не показан) не зависят от длительности ступеньки. Если же чередовать ступеньки длительностью 500 мс и 50 мс друг за другом (нижние записи), то L_1 и I_{s1} (не показано) снова не изменяются, а L_2 и сила сокращения были больше при длительности ступеньки 50 мс (см. рис. 9,6, в). Был сделан вывод, что поступление в клетки Ca^{2+} во время длинной ступеньки эффективно пополняет внутриклеточные запасы и обеспечивает освобождение большего количества ионов Ca^{2+} во время следующей ступеньки независимо от ее длины (500 или 50 мс).

Как было сказано выше, отрицательная корреляция между амплитудой I_{s1} и пиком сокращения во время лестниц сокращения является обычной находкой в миокарде желудочков сердца млекопитающих. Однако авторы работы [53] сообщили, что на препаратах желудочков сердца кошки и собаки можно наблюдать как отрицательную корреляцию, так и положительную корреляцию между I_{s1} и силой сокращения. Полученные ими записи на пиллярной мышце сердца кошки воспроизведены на рис. 9.7. Процедура заключалась в наполнении запасников ионами Ca^{2+} с помощью серии ступенек потенциала большой амплитуды с частотой 0,5 Гц. После достижения установившихся условий подавали последовательность из семи ступенек потенциалов амплитудой либо 65 мВ (см. рис. 9.7, вверху), либо 18 мВ (см. рис. 9.7 внизу), во время которой наблюдали отрицательную лестницу сокращения. Однако в одном случае (ступеньки 65 мВ) I_{s1} увеличивался, а в другом (ступеньки 18 мВ) — уменьшался.

Последний результат наиболее удивителен, так как ступеньки амплитудой 18 мВ не достигали порогового потенциала для I_{s1} (в

предположении, что потенциал покоя был равен 80 мВ в описываемых экспериментах в условиях двойной сахарозной щели). Цитируемые авторы предпочли объяснить это тем обстоятельством, что такой входящий ток отражает «ускользание», обусловленное регенеративной деполяризацией мембранной системы СР [53]. Эта гипотеза основывается на устаревшей концепции о возможности низкоомного электрического сопряжения между сарколеммой и СР и что в мембране СР существует потенциалзависимая кальциевая проводимость, аналогичная обнаруженной на сарколемме [3, 12]. Наиболее интересно, что регистрации тока ускользания считались связанными с массивным освобождением ионов Ca^{2+} из СР [53]. Как отмечали цитируемые авторы, этот «медленный входящий» ток может быть вызван ускользанием транссарколеммального тока. Не установленная еще проблема состоит в том, что все попытки вызвать освобождение ионов Ca^{2+} из СР путем такой деполяризации мембраны СР в скиннированных миокардиальных клетках были безуспешными [19]. Кроме того, представление о непрерывности между внеклеточным пространством и внутренним пространством СР не было подтверждено при исследованиях с применением микрозондов [60]. Если не учитывать эти возражения, экспериментальные данные представляются интригующими, и они, несомненно, побуждают к новым исследованиям в этой области.

Заключение

Данные, представленные в этой главе, указывают, что I_{si} выполняет три функции в процессе электромеханического сопряжения в миокарде желудочков сердца млекопитающих. Во-первых, он служит в качестве триггера освобождения Ca^{2+} -активатора из внутренних запасников (СР). Это подтверждается данными о том, что в отсутствие I_{si} не наблюдается физического сокращения и что эти два явления имеют один и тот же порог. Механизм, объясняющий освобождение ионов Ca^{2+} из СР, вероятно, включает в себя Ca^{2+} -активируемое освобождение ионов Ca^{2+} из СР, подробно исследованное в работах Fabiato, Fabiato. Вторая функция I_{si} состоит в градуальном изменении количества ионов Ca^{2+} , освобождаемых из СР. Это подтверждается наблюдениями, что в условиях постоянства количества ионов Ca^{2+} , способных освободиться из СР, градуальное изменение амплитуды I_{si} самыми разными способами приводит к градуальному изменению силы сокращения, хорошо коррелирующему с изменениями I_{si} . Важно также отметить, что Ca^{2+} -активируемое освобождение ионов Ca^{2+} из СР в скиннированных миокардиальных клетках может быть градуально изменено при градуальном изменении концентрации Ca^{2+} в растворе, вызывающего освобождение; диапазон концентраций Ca^{2+} не выходит за пределы ожидаемого для поступления ионов Ca^{2+} в миокардиальную клетку во время I_{si} [19]. Третья установленная функция I_{si} состоит в пополнении внутриклеточных запасов ионов Ca^{2+} в СР. Это подтверждается данными о том,

что изменение заряда, переносимого I_{si} , независимо от того, является ли изменение результатом изменения амплитуды I_{si} , длительности деполяризующей ступеньки или частоты следования ступенек, имеет предсказуемое влияние на сократимость и амплитуду сигнала люминесценции акворина во время последующей активации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Langer G. A. The role of calcium in the control of myocardial contractility: an update. — J. molec. cell. Cardiol., 1980, vol. 12, p. 231—239.
2. Langer G. A. Sodium-calcium exchange in the heart. — Ann. Rev. Physiol., 1982, vol. 44, p. 435—449.
3. Bassingthwaite G., Reuter H. Calcium movements and excitation-contraction coupling in cardiac cells. — In: Electrical phenomena in the heart/Ed. W. C. De Mello. New York: Academic, 1972, p. 353—393.
4. Morad M., Goldman Y. Excitation-contraction coupling in heart muscle: membrane control of development of tension. — Progr. Biophys. mol. Biol., 1973, vol. 27, p. 257—313.
5. Chapman R. A. Excitation-contraction coupling in cardiac muscle. — Progr. Biophys. mol. Biol., 1979, vol. 35, p. 1—52.
6. Fabiato A., Fabiato F. Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. — Ann. Rev. Physiol., 1979, vol. 41, p. 473—484.
7. Fozzard H. A. Slow inward current and contraction. — In: The slow inward current and cardiac arrhythmias/Ed. D. P. Zipes, J. C. Bailey, V. Elharrar. The Hague: Martinus Nijhoff Division, 1980, p. 173—203.
8. New W., Trautwein W. The ionic nature of slow inward current and its relation to contraction. — Pflügers Arch., 1972, vol. 334, p. 24—38.
9. Reuter H., Scholz H. A study of the ion selectivity and the kinetic properties of the calcium dependent slow inward current in mammalian cardiac muscle. — J. Physiol. (Lond.), 1977, vol. 264, p. 17—47.
10. Lee K. S., Tsien R. W. Reversal of current through calcium channels in dialysed single heart cells. — Nature, 1982, vol. 297, p. 498—501.
11. Reuter H. Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. — Progr. Biophys. mol. Biol., 1973, vol. 26, p. 3—43.
12. Trautwein W., McDonald T. F., Tripathi O. Calcium conductance and tension in mammalian ventricular muscle. — Pflügers Arch., 1975, vol. 354, p. 55—74.
13. Carmeliet E., Vereecke J. Electrogenesis of the action potential and automaticity. — In: Handbook of physiology: the cardiovascular system I/Ed. R. M. Berne, N. Sperelakis, G. R. Geiger. Baltimore: Williams and Wilkins, 1979, p. 269—334.
14. Coraboeuf E. Voltage clamp studies of the slow inward current. — In: The slow inward current and cardiac arrhythmias/Ed. D. P. Zipes, J. C. Bailey, V. Elharrar. The Hague: Martinus Nijhoff Medical Division, 1980, p. 25—95.
15. McDonald T. F. The slow inward calcium current in the heart. — Ann. Rev. Physiol., 1982, vol. 44, p. 425—434.
16. Tsien R. W. Calcium channels in excitable cell membranes. — Ann. Rev. Physiol., 1983, vol. 45, p. 341—358.
17. Antoni H., Jacob R., Kaufmann R. Mechanische Reaktionen des Frosch und Säugetiermyokards bei Veränderung der Aktionspotential-Dauer durch konstante Gleichstromimpulse. — Pflügers Arch., 1969, vol. 306, p. 33—57.
18. Wood E., Heppner R. L., Weidmann S. Inotropic effects of electric currents. — Circulat. Res., 1969, vol. 24, p. 409—445.
19. Fabiato A., Baumgarten C. M. Methods for detecting calcium release from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells and the relationship between calculated transsarcolemmal calcium movements and calcium release. — In: Physiology and pathophysiology of the heart/Ed. N. Sperelakis. The Hague: Martinus Nijhoff Medical Division, 1984.

Глава 10

РОЛЬ Na^+ — Ca^+ -ОБМЕНА В КЛЕТКАХ ТКАНИ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

Л. Дж. МАЛЛИНС (L. J. MULLINS)

ВВЕДЕНИЕ

Клетки сердечной мышцы во многих отношениях отличаются от клеток скелетной мышцы; одним из существенных отличий является развитие контрактуры в миокардиальных клетках, если поместить их в безнатриевый раствор, в то время как в клетках скелетной мышцы такого явления не наблюдается. Так как мембранный потенциал большинства клеток сердечной ткани не изменяется при такой смене раствора, возникает вопрос, каким образом уменьшение внеклеточной концентрации ионов Na^+ вызывает развитие контрактуры. Это не может быть электрический сигнал, так как мембранный потенциал не изменяется. Оказалось, что наиболее ценной гипотезой в отличие от некоторых несколько необычных концепций, предложенных для объяснения этого явления, является предположение, что при понижении $[\text{Na}^+]$ внеклеточные ионы Ca^{2+} могут обмениваться с внутриклеточными ионами Na^+ и, таким образом, возникает направленное внутрь клетки движение ионов Ca^{2+} , вызывающее контрактуру.

В других очень давних исследованиях наблюдалось, что если сердечную мышцу подвергнуть действию таких веществ, как оубаин или дигоксин, то даже в очень небольших концентрациях они способны увеличить силу сокращения миокарда. И в этом случае экспериментальные данные свидетельствуют в пользу того, что основным фактором, определяющим количество ионов Ca^{2+} , входящих в клетку во время каждой деполяризации, является изменение внутриклеточной концентрации ионов Na^+ на 2—3 мМ, хотя было предложено множество других объяснений механизма действия сердечных гликозидов. Эти данные вынуждают сделать предположение, что упоминавшийся выше процесс Na^+ — Ca^{2+} -обмена либо зависит от потенциала, либо просто является электрогенным (т. е. переносит с ионами Na^+ заряд большей величины в одном направлении, чем с ионами Ca^{2+} — в другом). Эти новые данные также сделали излишним изобретение новых участков действия сердечных гликозидов на миокард, и осталось только хорошо известное явление ингибирования сердечными гликозидами (Na^+ , K^+)-насоса во всех типах клеточных мембран.

В сердечной мышце имеются и другие источники ионов Ca^{2+} для активации сокращения, в частности кальциевые каналы и SR , оба эти источника подробно описаны в других главах этой книги.

Необходимо сказать, что $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен не только способен переносить ионы Ca^{2+} внутрь клетки при деполяризации, но также вносит определенный вклад в удаление ионов Ca^{2+} миоплазмы во время диастолы. Следует учитывать также АТФ-зависимый кальциевый насос сарколеммы, который будет рассмотрен ниже, в качестве еще одного механизма удаления ионов Ca^{2+} из миоплазмы. $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен должен удалять не только те ионы Ca^{2+} , которые он сам вносит в клетку при деполяризации, но также и те, которые поступают через кальциевый канал. Поэтому поступающие по механизму $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена ионы Ca^{2+} не могут представлять лишь малую долю от всех ионов Ca^{2+} , участвующих в сокращении, иначе сердечные гликозиды не оказывали бы такого действия, которое реально наблюдается.

Самым современным из опубликованных полных обзоров, посвященных проблеме $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена, является обзор Langer [4]. В тесной связи с материалами этой главы находятся обзоры Фабиато и [2, 3, 4], а также работы, целиком посвященные проблеме $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена [5].

ГРАДИЕНТНЫЙ ТРАНСПОРТ ИОНОВ

Все без исключения возбудимые клетки имеют высокую концентрацию ионов K^+ и низкую концентрацию ионов Na^+ в миоплазме; обратное утверждение справедливо для внеклеточных концентраций ионов, где ионы Na^+ являются доминирующими катионами. Такое состояние возникает благодаря тому, что в клеточной мембране имеется натриевый насос, обменивающий внутриклеточные ионы Na^+ на внеклеточные ионы K^+ (хотя и не в равных соотношениях). Так как для выведения ионов Na^+ наружу требуется энергия, то ясно, что для работы натриевого насоса необходим субстрат в виде АТФ.

Известно также, что большая часть производимого в клетке АТФ получается за счет энергии, запасенной в виде протонного градиента, возникающего на мембране митохондрий в результате химических реакций, происходящих внутри этих органелл. Следовательно, наблюдается следующая последовательность: перемещение ионов приводит к образованию АТФ и в обратной реакции использование энергии АТФ приводит к перемещению ионов. На основании этих общепринятых положений можно предположить, что в биологических системах энергия может запасаться в виде энергии химических связей или в виде ионных градиентов; это означает, что в возбудимых клетках существует взаимопревращение этих источников энергии. Более широкое понимание взаимопревращения субстратов и ионных градиентов заключается в том, что градиенты концентрации ионов одного вида могут служить источником энергии для создания трансмембранного градиента концентраций ионов (или молекул) другого вида. Общим названием для такого типа превращения энергии является «градиентный транспорт», когда градиент концентраций ионов одного вида приводит к развитию градиента концентраций ионов другого вида.

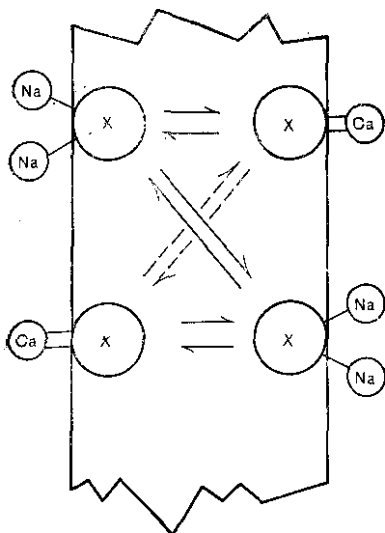


Рис. 10.1. Классическая модель переносчика Na—Ca-обмена, способствующего передаче внутрь клетки либо Na⁺ в обмен на Ca²⁺, либо Ca²⁺ в обмен на Na⁺. Диагональные стрелки показывают другие возможные режимы обмена.

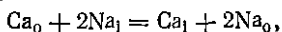
Градиентный транспорт может быть подразделен на совместный транспорт и противотранспорт в зависимости от того, находятся ли «движущие» ионы и транспортируемые ионы с одной стороны мембраны или с разных ее сторон. Na⁺ — Ca²⁺-транспорт представляет собой противотранспорт, так как движение ионов Na⁺ в одном направлении вызывает движение ионов Ca²⁺ в противоположном

направлении. Этот транспорт работает за счет градиента, и общий смысл заключается в том, что градиент концентраций ионов Na⁺, созданный потребляющим энергию АТФ (Na⁺, K⁺)-насосом, затрачивается на создание градиента концентраций ионов Ca²⁺.

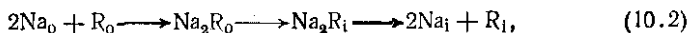
Наблюдения, связанные с Na⁺ — Ca²⁺-обменом в сердце, были сделаны значительно раньше, чем предложены описанные выше концепции, так как еще в начале развития физиологии было показано, что в сердце лягушки, помещенном в безнатриевый раствор, развивается контрактура. Такое явление было достаточно разумно объяснено существованием мембранного переносчика, который может связываться либо с ионами Na⁺, либо с ионами Ca²⁺, как показано на рис. 10.1. Модель такого типа обладает рядом свойств, которые на первый взгляд не очевидны; согласно этой модели, переносчик способен либо переносить ионы натрия (слева направо) в обмен на ионы Ca²⁺, переносимые в противоположном направлении, либо переносить ионы Ca²⁺ (слева направо) в обмен на перенос ионов Na⁺ в противоположном направлении. Если переносчик способен проникать через мембрану только будучи связанным с ионами, тогда итоговым движением ионов может быть только повышение содержания ионов Na⁺ в клетке за счет выхода из нее ионов Ca²⁺ или увеличение содержания ионов Ca²⁺ за счет выхода ионов Na⁺. Существуют еще два типа обмена ионов, осуществляемых с помощью такого переносчика (показаны стрелками по диагонали), это Na⁺ — Na⁺-обмен и Ca²⁺ — Ca²⁺-обмен; такие типы обмена имеют значение только при необходимости рассмотрения результатов изотопных исследований.

Первое время исследователи не располагали никакими методами определения внутриклеточной концентрации ионов Ca²⁺, но они считали ее очень низкой по крайней мере в мышце, так как было установлено, что этот ион связан с развитием сокращения. Если внутриклеточная концентрация ионов Ca²⁺ близка к нулю, то един-

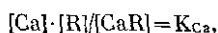
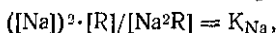
ственной реакцией, которая может осуществляться на переносчике и создавать в итоге перенос ионов, будет следующая:



т. е. вход ионов Ca^{2+} в обмен на ионы Na^+ . В других моделях предполагается, что переносчик, R, может возвращаться на внешнюю поверхность мембраны в ненагруженном состоянии; если бы это было справедливо, то можно было бы ожидать следующих реакций:



Следовательно, имеется две реакции, приводящие к перемещению R на внутреннюю сторону мембраны: 1) реакция переносчика с внеклеточными ионами Ca^{2+} , скорость которой может зависеть от внеклеточной концентрации ионов Na^+ , так как оба иона конкурируют за связывание с переносчиком на внешней стороне мембраны; 2) аналогичная конкуренция между внеклеточными ионами Ca^{2+} и Na^+ при взаимодействии с переносчиком внеклеточных ионов Na^+ . Важно отметить, что основной характерной чертой этих моделей является конкуренция между ионами Na^+ и Ca^{2+} за место связывания на переносчике, как это показано в реакциях (10.1) и (10.2) сверху. Мы можем записать реакции для связывания ионов Na^+ и Ca^{2+} с переносчиком следующим образом:



таким образом, если $[\text{CaR}] / [\text{Na}_2\text{R}]$ представляет собой долю молекул переносчика, переносящих внутрь ионы Ca^{2+} по отношению к тем молекулам, которые переносят ионы Na^+ , то эта величина будет равна $[\text{Ca}]$, деленной на $([\text{Na}])^2$ и умноженной на некоторую константу, равную $K_{\text{Ca}}/K_{\text{Na}}$. Таким образом, возникает предположение, что поступление внутрь клетки ионов Ca^{2+} по этому механизму определяется отношением концентраций ионов Ca^{2+} и Na^+ в растворе Рингера или Тироде.

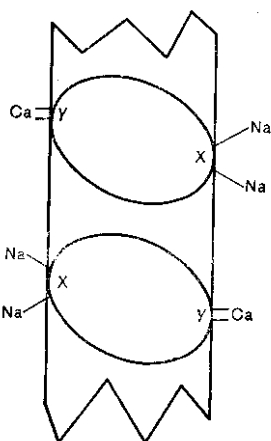
Если возможны только реакции (10.1) и (10.2), то возможны только два типа движения ионов: вход ионов Ca^{2+} в обмен на выход ионов Na^+ или вход ионов Na^+ в обмен на выход ионов Ca^{2+} , так как в каждом случае наличие противотранспорта требует возврата переносчика R с внешней стороны мембраны на внутреннюю и наоборот. В изотропных исследованиях может быть продемонстрировано существование как $\text{Na}^+ - \text{Na}^+$ -обмена, так и $\text{Ca}^{2+} - \text{Ca}^{2+}$ -обмена. Если возможна также реакция (10.3), то в принципе оба электрохимических градиента, для ионов Na^+ и ионов Ca^{2+} , могут исчезнуть за счет реакций (10.1) + (10.3) и (10.2) + (10.3) соответственно. Быструю потерю ионных градиентов можно предотвратить, если значительно повысить сродство переносчика к ионам Na^+ , а подвижность связанного с Na^+ переносчика понизить по сравнению с таковой для случаев, когда переносчик связан с

ионом Ca^{2+} . Следует отметить, что предположение о том, что внутриклеточная концентрация ионов Na^+ может участвовать в регуляции входа ионов Ca^{2+} , оказалось неучтенным при таком анализе, то в результате этого все управление поступления ионов Ca^{2+} в клетки будет зависеть только от реакции ионов Na^+ и Ca^{2+} с переносчиком на внешней стороне мембраны. Наличие следующего из модели обмена внутриклеточных ионов Na^+ на внеклеточные не было подтверждено в экспериментальных исследованиях.

По мере улучшения понимания механизма механизма сокращения в сердце и скелетной мышце становилось ясно, что: а) внутриклеточная концентрация ионов Ca^{2+} не равна нулю, хотя и очень низка; б) увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} является инициатором сокращения. Следовательно, большим достижением явилось предположение авторов работы [6] о том, что $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен способен обеспечивать не только поступление ионов Ca^{2+} в клетки, если внеклеточная концентрация ионов Na^+ сильно снижена, но что тот же самый процесс способствует удалению ионов Ca^{2+} из клеток, что было очень существенно, так как в этом случае выведение из клеток ионов Ca^{2+} , входящих через кальциевые каналы, происходило бы аналогично хорошо установленному механизму выведения из клеток ионов Na^+ , входящих через натриевые каналы, с помощью натриевого насоса. Такое предположение создало ряд существенных трудностей, потому что это был «истинный» $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обменный процесс (или противотранспорт) и его предполагаемая стехиометрия была равна 2 : 1. Первая трудность обусловлена кинетическими свойствами системы. Необходимо было найти такие константы диссоциации K_{Na} и K_{Ca} , которые обеспечивали бы разумную скорость транспорта. Вторая трудность заключалась в удовлетворении требований термодинамики: необходимости обеспечения градиентом концентраций ионов Na^+ достаточной энергии для выкачивания ионов Ca^{2+} до уровня концентрации, необходимого для расслабления мышцы. Суть проблемы, связанной с кинетикой транспорта, можно вкратце охарактеризовать следующим образом: в норме отношение концентрации ионов Na^+ и ионов Ca^{2+} в плазме крови составляет 75, а внутри расслабленного миокардиального волокна оно близко к 10^6 . Эти данные означают, что если на внутренней стороне мембраны значительная часть молекул переносчика связана с ионами Ca^{2+} , то присутствие ионов Na^+ на внешней стороне мембраны не будет существенно влиять на работу переносчика, так как константа связывания для ионов Ca^{2+} будет так высока, что ионы Na^+ не смогут конкурировать с переносчиком на внешней стороне мембраны. С другой стороны, этот результат противоречит большому количеству экспериментальных данных, свидетельствующих о высокой чувствительности сокращения к внеклеточной концентрации ионов Na^+ .

Другим следствием такой модели является существование $\text{Ca}^{2+} - \text{Ca}^{2+}$ -обмена, а также $\text{Na}^+ - \text{Na}^+$ -обмена, которые могут быть измерены изотопными методами. Эксперименты продемонстрировали уменьшение выходящего потока ионов Ca^{2+} при удалении ионов Ca^{2+} из перфузионного раствора, но в них не удалось пока

Рис. 10.2. Модель Na—Ca-переносчика с отдельными местами связывания для ионов Na^+ и Ca^{2+} , обозначенные соответственно X и Y. Внутриклеточное пространство показано слева.



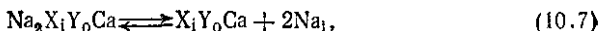
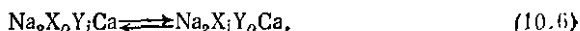
отсутствие наличия уменьшения выхода ионов Na^+ при удалении из перфузионного раствора иона Na^+ , так что некоторые следствия модели $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена не подтверждаются экспериментально. Влияние вискальциевого раствора может быть объяснено совершенно по-другому, что будет описано ниже, а то обстоятельство, что не удается подобрать подходящих величин констант диссоциации для ионов Ca^{2+}

Na^+ и что экспериментально не обнаружено наличие $\text{Na}^+ - \text{Na}^+$ -обмена, осуществляемого переносчиком $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена, наиболее просто объяснить, если предположить, что переносчик имеет отдельные места связывания для ионов Na^+ и Ca^{2+} . Так как градиент концентраций ионов Na^+ существенно влияет как на кинетику, так и на термодинамику $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена, то кажется разумным предположить, что связывание ионов Na^+ с переносчиком приводит к появлению мест связывания ионов Ca^{2+} на переносчике. Можно также построить модель, в которой связывание ионов Ca^{2+} с переносчиком на одной стороне мембраны создает места связывания ионов Ca^{2+} на переносчике на другой стороне мембраны, но устройство такой модели будет существенно более сложным. Большую часть экспериментальных данных относительно влияния ионов Na^+ на $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен можно наиболее просто объяснить, если предположить, что концентрация ионов Na^+ на одной стороне мембраны определяется связыванием ионов Ca^{2+} с переносчиком на другой стороне. Независимо от этого чисто энергетического эффекта существует термодинамический фактор, определяющий запасенную в градиенте концентраций энергию, предназначенную для поддержания транспорта ионов Ca^{2+} . Если концентрация ионов Na^+ с внешней стороны выше концентрации ионов Na^+ внутри клетки, тогда будет чаще осуществляться конфигурация, показанная в верхней части рис. 10.2; и наоборот, если внеклеточная концентрация ионов Na^+ сильно снижена, а их концентрация внутри клетки будет выше, чем снаружи, то будет справедлива зависимость, показанная в нижней части этого рисунка. В верхней части рис. 10.2 показано, как $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен выводит ионы Ca^{2+} из клетки; в нижней части тот же самый механизм обеспечивает поступление ионов Ca^{2+} внутрь клетки.

Систему, изображенную на рис. 10.1, можно заставить транспортировать ионы Ca^{2+} внутрь клетки в обмен на выведение ионов Na^+ изнутри, но при данных константах связывания ионов Na^+ и Ca^{2+} с переносчиком, которые позволяют переносить ионы Ca^{2+} внутрь клетки при снижении внеклеточной концентрации

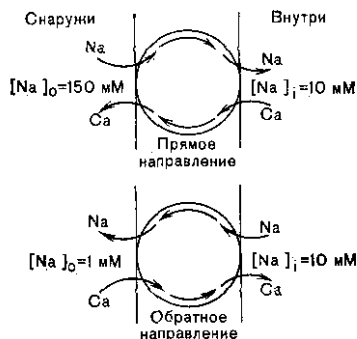
ионов Na^+ , переносчик не способен развить значительную мощность (т. е. создать большой поток ионов) для выведения ионов Ca^{2+} наружу. Конечно, величины K_{Ca} могут быть различными с разных сторон мембраны (то же и для K_{Na}), но это возможно только за счет использования метаболической энергии. Теперь рассмотрим систему, аналогичную показанной на рис. 10.2 и имеющую отдельные участки связывания разных ионов на молекулу $(\text{Na}^+, \text{Ca}^{2+})$ -переносчика. Она отличается некоторыми не совсем очевидными свойствами. Во-первых, такая система не должна быть способна переносить ионы через мембрану, если с переносчиком связаны только ионы Na^+ или только ионы Ca^{2+} , так как это привело бы к исчезновению градиентов концентраций этих ионов, оба из которых направлены наружу. Вторая особенность состоит в необходимости обеспечения свободного движения через мембрану ненагруженного переносчика, так как в противном случае был бы невозможен никакой перенос ионов, если с одной стороны мембраны отсутствуют ионы Ca^{2+} , а с другой — ионы Na^+ . Однако известно, что при $[\text{Na}]_i = 0$ и $[\text{Ca}]_o = 0$ наблюдается массивное выведение ионов Ca^{2+} при наличии ионов Na^+ во внеклеточной среде. При разных местах связывания переносчик вносит ионы Na^+ внутрь и обмен на выведение ионов Ca^{2+} наружу, после чего он должен вернуться в исходное положение незагруженным.

В случае переносчика с отдельными местами связывания для ионов Na^+ и Ca^{2+} следует отметить, что между этими ионами невозможна конкуренция за места связывания, хотя она предполагалась во многих исследованиях. Следовательно, можно задать вопрос, как в условиях отсутствия ионов Na^+ снаружи может возникнуть массивный вход ионов Ca^{2+} в клетки при отсутствии конкуренции между ионами Na^+ и Ca^{2+} за одно и то же место связывания на переносчике. Записав все реакции, происходящие между местами связывания и ионами, получим следующее:



Приведенная выше схема прямо описывает образование Na_2X -комплексов с переносчиком, которое приводит к появлению места связывания Y для ионов Ca^{2+} . Связывание ионов Ca^{2+} с этим комплексом приводит к созданию полностью загруженного переносчика (10.5), который затем перемещается в мембране (10.6), ионы Na^+ диссоциируют (10.7), что приводит к исчезновению места связывания для ионов Ca^{2+} и диссоциации иона Ca^{2+} (10.8). Таким образом, перенос ионов Ca^{2+} наружу оказывается возможным благодаря тому, что вследствие низкой концентрации ионов Na^+ внутри клетки происходит диссоциация ионов Na^+ , связанных с переносчиком. Следует ожидать, что для входа Ca^{2+} имеет значе-

Рис. 10.3. Схема Na—Ca-обмена: вверху — $[Na^+]_o = 150$ мМ, градиент Na^+ направлен наружу, и в результате выхода ионов Na^+ внутрь клетки поступают ионы Ca^{2+} .



ние диссоциация комплекса Na^+X_c Y_iCa_i . Очевидно, что этот комплекс будет освобождать Na^+ с большей легкостью при низкой внеклеточной концентрации ионов Na^+ , чем в случае высокой концентрации. Таким образом, модель с отдельными местами связывания обладает свойством усиливать вход Ca^{2+} вследствие низкой внеклеточной концентрации ионов Na^+ , а не в результате конкуренции Na^+ и Ca^{2+} за одно и то же место связывания, а потому, что противотранспорт сам по себе чувствителен к градиенту концентраций ионов Na^+ . На рис. 10.3 показано, как модель $Na^+ - Ca^{2+}$ противотранспорта реагирует на изменения внеклеточной концентрации ионов Na^+ . В верхней части рисунка, когда внеклеточная концентрация ионов Na^+ равна 150 мМ, а внутриклеточная — 10 мМ, входящий поток ионов Na^+ вызывает выходящий поток ионов Ca^{2+} ; в нижней части рисунка внеклеточная концентрация ионов Na^+ снижена до 1 мМ и градиент концентрации направлен наружу, а выходящий поток ионов Na^+ является движущей силой для входящего потока ионов Ca^{2+} . Обычно последний процесс называют обратным режимом работы $Na^+ - Ca^{2+}$ -обмена, так как он возникает при понижении внеклеточной концентрации ионов Na^+ и вызывает накопление Ca^{2+} в ткани, а не его выведение.

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА $Na^+ - Ca^{2+}$ -ОБМЕНА

Приведенное выше обсуждение свидетельствует в пользу существования переносчика $Na^+ - Ca^{2+}$ -обмена с двумя отдельными участками, с которыми связываются ионы Na^+ и Ca^{2+} , но не было высказано никаких соображений по поводу стехиометрии связывания ионов Na^+ с переносчиком. Проще предположить, что в одном направлении переносится два иона Na^+ , а в другом — один ион Ca^{2+} , что действительно наиболее обычно. Рассмотрим теперь, какую работу необходимо затратить для достижения такой внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , которая обычно наблюдается в клетках.

Реальные величины внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} были получены лишь недавно, после разработки методов для измерения этой концентрации. В результате исследований с использованием буферов СаЭГТА-ЭГТА и скиннированных мышечных волокон выяснилось, что для процесса расслабления величина внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} должна быть порядка

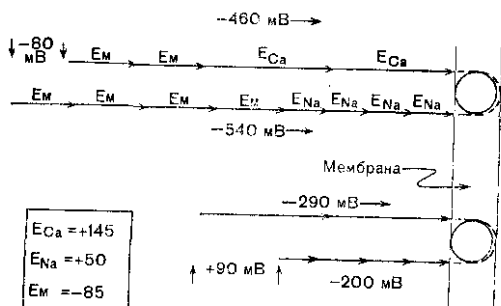


Рис. 10.4. Наглядный расчет для потенциалов, показанных в рамке слева ввиду, электрохимических градиентов для Na^+ и Ca^{2+} при коэффициенте сопряжения обмена $4Na^+ : 1Ca^{2+}$. Вверху $E_m = -85$ мВ, внизу $E_m = 0$ мВ. Обратите внимание на изменение направления транспорта Ca^{2+} .

0,1 мкМ, а реальные измерения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} в аксоне кальмара дают величину около 0,03 мкМ. Такая концентрация также близка к диапазону, в котором, как показывают эксперименты, внутриклеточная концентрация ионов Ca^{2+} влияет на Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы, так что множество самых различных методов указывает, что величины внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} в покое меньше 0,05 мкМ или 50 нМ. Проведенные недавно измерения с помощью Ca^{2+} -чувствительных электродов показали величины порядка 200 нМ, что, согласно оценкам взаимодействия ионов Ca^{2+} с сократительными структурами, должно приводить к развитию существенного напряжения. Расслабленное состояние клеток позволяет предположить, что эти оценки внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} сильно завышены. Это означает, что в аксоне кальмара отношение $[Ca^{2+}]_o/[Ca^{2+}]_i$ по порядку величины равно 10^5 и, вероятно, имеет точно такое же значение в клетках млекопитающих. Если принять такое отношение концентраций ионов Ca^{2+} , то E_{Ca} будет равно +145 мВ, и при обычных значениях мембранного потенциала сердечной клетки в дополнение к химическому градиенту +145 мВ имеется электрический градиент около -85 мВ. Так как ион, который влияют эти градиенты (Ca^{2+}), имеет 2 заряда, сила, заставляющая ионы Ca^{2+} двигаться внутрь, определяется величиной $[-85 - (145)] \times 2 = -460$ мВ, как показано на рис. 10.4. Естественным следствием этого является вывод, что либо энергия, которая может быть получена из электрохимического градиента ионов Na^+ , должна быть больше указанной, если происходит выведение ионов Ca^{2+} , либо должны работать другие способы уменьшения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} до низких уровней.

На рис. 10.4 показано также, что если величина E_{Na} равна +50 мВ, то для уравнивания градиента Ca^{2+} необходимо взять более трех величин $(E - E_{Na})$. На этом рисунке показано также, что перенос одного иона Ca^{2+} предполагается сопряженным с переносом четырех ионов Na^+ , так что выражение $4(E - E_{Na}) - 2(E - E_{Ca}) = -80$ мВ. Эта величина является мерой разности электрохимических градиентов ионов Na^+ и Ca^{2+} , а также мерой движущей силы, приводящей к выведению Ca^{2+} за счет входа Na^+ . Такая разность градиентов необходима, если при потенциале покоя Ca^{2+} должен действительно выводиться из сердечных волокон.

Знак разности градиентов указывает, что поток Na^+ имеет входящее направление. В нижней части рис. 10.4 показано, что произойдет, если клетка деполяризована и трансмембранный потенциал равен нулю (условия в области плато ПД в миокардиальных волокнах). Градиенты концентраций для Na^+ и Ca^{2+} остаются вначале без изменений, но вклады электрических компонентов исчезают для обоих ионов. Теперь разность электрохимических градиентов будет равна $[-4E_{\text{Na}} - 2E_{\text{Ca}}]$ или $+90$ мВ. Следовательно, в этих условиях ионы Ca^{2+} будут поступать в клетки в обмен на внутриклеточные ионы Na^+ , и при таком обмене будет генерироваться выходящий ток. Очевидно, что если при нормальном потенциале покоя происходит выведение Ca^{2+} , а во время фазы плато Ca^{2+} поступает в клетки, то должен иметь место потенциал, при котором вход и выход Ca^{2+} уравниваются, т. е. реверсный потенциал $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена. Его легко рассчитать, приняв разность градиентов, равной нулю, т. е. $4(E - E_{\text{Na}}) - 2(E - E_{\text{Ca}}) = 0$ или $E = 2E_{\text{Na}} - E_{\text{Ca}}$. Таким образом, реверсный потенциал в приведенном выше примере равен -45 мВ.

Предположение о том, что для выведения Ca^{2+} из клеток при потенциале покоя необходим вход четырех ионов Na^+ , определяется энергетическими требованиями при заданных $E_{\text{Na}} = +50$ мВ и $E_{\text{Ca}} = +145$ мВ, но эти величины не являются единственно возможными. Имеется достаточно доказательств того, что во время потенциала действия длительностью 200—300 мс E_{Ca} сильно изменяется и что E_{Na} заметно изменяется в течение нескольких секунд в зависимости от того, сокращаются ли миокардиальные волокна или нет, и в зависимости от частоты сокращений, если они имеются. Так, величина $E_{\text{Na}} = 50$ мВ соответствует отношению концентраций ионов Na^+ по разные стороны мембраны, составляющему приблизительно 7, что справедливо для сердца, сокращающегося с высокой частотой, и, следовательно, сильно нагружаемого ионами Na^+ . При меньших нагрузках (Na^+) или при меньших частотах сокращения (или в покоящихся волокнах) отношение концентраций ионов Na^+ по разные стороны мембраны может приближаться к 15 или $E_{\text{Na}} = +70$ мВ. Таким образом, эти две величины для E_{Na} ($+50$ мВ и $+70$ мВ) удобно использовать в качестве пределов для химического компонента электрохимического градиента Na^+ . При известных в настоящее время величинах для $[\text{Ca}^{2+}]_i$ отношение концентраций Ca^{2+} по разные стороны мембраны может составлять 10^5 , и эту величину можно рассматривать в качестве одного из пределов. При других измерениях $[\text{Ca}^{2+}]_i$ получали отношение, равное лишь 10^4 , так что и здесь мы имеем две величины: $E_{\text{Ca}} = +145$ мВ и $E_{\text{Ca}} = +116$ мВ (округлено $+120$ мВ). В табл. 10.1 показаны эти пределы равновесных потенциалов для ионов Na^+ и Ca^{2+} для случаев систем транспорта, когда перемещение одного иона Ca^{2+} связано с тремя или четырьмя ионами Na^+ . В ней также даны величины разностей между электрохимическими градиентами для Na^+ и Ca^{2+} , так как ниже будет чисто эмпирически показано, что большая разность градиентов означает существование массивного потока ионов через систему $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена.

Таблица 10.1. Реверсные потенциалы $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена и разности электрохимических потенциалов для ионов Na^+ и Ca^{2+} при условии, что $r=3$ или $r=4$ и при указанных величинах E_{Ca} и E_{Na}

$r=4$			$4(E_{\text{M}} - E_{\text{Na}}) - 2(E_{\text{M}} - E_{\text{Ca}}) =$
E_{Ca}	E_{Na}	E_{R}	Градиент при E_{M} покоя
145	50	-45	-80
145	70	-5	-160
120	50	-20	-130
120	70	+20	-210
$r=3$			$3(E_{\text{M}} - E_{\text{Na}}) - 2(E_{\text{M}} - E_{\text{Ca}}) =$
145	50	-140	+55
145	70	-80	-5
120	50	-90	+5
120	70	-30	-55

Из данных таблицы очевидно, что, за исключением случая, когда значение E_{Na} очень велико (+70 мВ), а E_{Ca} — очень мало (+120 мВ), при стехиометрии $3\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$ невозможно получить допустимую разность градиентов для Na^+ и Ca^{2+} при потенциалах покоя. Короткое рассмотрение вероятных величин для E_{Na} и E_{Ca} при потенциале покоя мембраны показывает, что в случае электронейтрального обмена 1Ca^{2+} на 2Na^+ невозможно достичь величин $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в том диапазоне, который наблюдается в расслабленном миокарде. Было предположено, что в присутствии АТФ в качестве субстрата система $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена может изменяться таким образом, что константы связывания ионов Na^+ и Ca^{2+} на переносчике с двух сторон мембраны будут сильно отличаться. Это позволит переносчику создавать низкие величины $[\text{Ca}^{2+}]_i$, частично используя энергию градиента концентраций ионов Na^+ и частично — метаболическую энергию. К сожалению, экспериментально не удалось показать, что АТФ способен вызвать выходящие потоки ионов Ca^{2+} из таких клеток, как гигантский аксон кальмара, величина которых превышала бы 0,1—0,2 нмоль/(см²·с), в то время как реальные потоки, выходящие из сердечных волокон, должны быть в 10—100 раз больше. Следовательно, $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен должен быть не электронейтральным (т. е. электрогенным), и, следовательно, при перемещении одного иона Ca^{2+} в одном направлении в другом направлении должны перемещаться три или четыре иона Na^+ . В действительности, основываясь на данных табл. 10.1, следует предположить, что при необходимости быстрого выведения Ca^{2+} из клеток при окончании ПД и достижении нормального диастолического потенциала 4 будет минимальной величиной для стехиометрии $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена.

Во время сокращения $[Ca^{2+}]_i$ изменяется от величины порядка десятков наномолей до единиц микромолей, следовательно, величина $[Ca^{2+}]_o/[Ca^{2+}]_i$ изменяется от 10^5 до 10^3 или $E_{Ca^{2+}} = +145$ мВ до $+87$ мВ. Так как во время фазы плато ПД мембранный потенциал находится около 0 мВ, разность градиентов для $Na^+—Ca^{2+}$ -обмена будет равна $[-4E_{Na} - (2E_{Ca^{2+}})] = (-4 \times 50 + 2 \times 90)$, что близко к нулю, и не будет происходить ни входа, ни выхода ионов Ca^{2+} . Эквивалентно можно утверждать, что вход Ca^{2+} инактивирован.

В этом случае реполяризация вызовет большой входящий ток и быстрое выведение Ca^{2+} , $E_{Ca^{2+}}$ будет расти по направлению к величине, наблюдаемой при диастолическом потенциале, и величина выведения Ca^{2+} будет уменьшаться.

Обычно предполагают, что механизм $Na^+—Ca^{2+}$ -обмена находится в равновесии во время диастолы, но это в действительности не всегда может быть справедливо. Можно различать два случая: а) $Na^+—Ca^{2+}$ -обмен является единственным механизмом выведения Ca^{2+} из клетки; б) существует как АТФ-зависимое выведение Ca^{2+} , так и $Na^+—Ca^{2+}$ -обмен. Так как в любой реальной клетке сердечной ткани имеется утечка Ca^{2+} внутрь через натриевые каналы, кальциевые каналы и неспецифические пути утечки, то установившиеся условия достигаются, когда сумма входа Ca^{2+} с утечкой и входа Ca^{2+} через $Na^+—Ca^{2+}$ -обмен равняется выходу Ca^{2+} . Если справедлив случай (а), то система $Na^+—Ca^{2+}$ -обмена не может находиться в равновесии, в то время как в случае (б), если АТФ-зависимое выведение Ca^{2+} в точности совпадает с входом Ca^{2+} с утечкой, то $Na^+—Ca^{2+}$ -обмен может находиться в равновесии. Следует подчеркнуть, что только «может», так как даже если АТФ-зависимый кальциевый насос удаляет из клетки все ионы Ca^{2+} , входящие с утечкой, то и тогда, так как удаление всех ионов Ca^{2+} , поступивших через кальциевые каналы и по механизму $Na^+—Ca^{2+}$ -обмена во время деполяризации, требует определенного времени, при недостаточной длительности сердечного цикла $Na^+—Ca^{2+}$ -обмен не будет достигать равновесия, даже если $[Ca^{2+}]_i$ будет ниже порога активации сокращения. Это означает, что во время фазы диастолы всегда будет иметь место выведение Ca^{2+} из клеток, и равновесие может быть достигнуто только при возможности очень длительных периодов полного покоя миокарда. Аналогично неравновесные условия работы $Na^+—Ca^{2+}$ -обмена изменяют количество вводимых с $Na^+—Ca^{2+}$ -обменом ионов Ca^{2+} во время потенциала действия.

КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА $Na^+—Ca^{2+}$ -обмена

Приведенный выше термодинамический анализ позволяет предположить, что разность между электрохимическими градиентами для Na^+ и Ca^{2+} может быть параметром, определяющим величину суммарного потока через систему обмена. Прежде чем прийти к такому выводу, полезно было бы исследовать реакцию величин

входа Ca^{2+} в гигантский аксон кальмара при изменении градиентов концентраций ионов Na^+ и Ca^{2+} . Начнем с того, что если $[\text{Na}^+]_o$ будет равным 1 мМ, а $[\text{Na}^+]_i$ останется около 20 мМ, то E_{Na^+} будет составлять -75 мВ по сравнению с нормальной величиной $+70$ мВ, когда $[\text{Na}^+]_o$ в норме. Это означает изменение E_m на 145 мВ, хотя и приводит к относительно умеренному увеличению поступления Ca^{2+} , составляющему увеличение в 33 раза [приблизительно с 30 до 1000 фмоль/(см²·с)]. Если вместо E_{Na^+} мы изменим E_m на 60 мВ, то в результате произойдет более чем 300-кратное возрастание поступления Ca^{2+} до уровня, приближающегося к 50 нмоль/(см²·с). Почему изменение мембранного потенциала на 60 мВ увеличивает вход Ca^{2+} в 10 раз, чем изменение E_{Na^+} на 150 мВ? Для понимания этого необходимо исследовать, какие стадии процесса обмена будут лимитировать скорость всего процесса в различных условиях.

Если $[\text{Ca}^{2+}]_i$ низкая, мембранный потенциал равен нормальному и $[\text{Na}^+]_o$ в норме, то возможно, что лимитирующей скоростью стадией реакции транспорта для выведения Ca^{2+} будет связывание Ca^{2+} с переносчиком на внутренней стороне мембраны. Отметим, что все другие стадии реакции транспорта (транспорт Ca^{2+} наружу, связывание Na^+ на внешней поверхности, мембранный потенциал) окажутся в состоянии насыщения. Напротив, для реакции входа Ca^{2+} , по-видимому, в насыщении будет находиться связывание Ca^{2+} на внешней стороне мембраны, а связывание Na^+ с внутренней стороны будет насыщено менее чем наполовину, но основным препятствием, по-видимому, будет высокий (отрицательный) потенциал, который будет препятствовать большинству молекул переносчика при стехиометрических коэффициентах 3—5 перемещаться через мембрану во внутрь, в то время как исчезновение этого электрического барьера для перемещения молекулы переносчика в мембране может в принципе значительно увеличить поступление Ca^{2+} в клетку по механизму Na^+ — Ca^{2+} -обмена.

Реальные измерения, осуществленные на аксоне кальмара при введении акворина, показывают (рис. 10.5), что испускание света акворином будет максимально, если все Na^+ заменить ионами K^+ (и, следовательно, E_m будет составлять около $+5$ мВ). Если сохранить в растворе 265 мМ Na^+ (а это насыщающая концентрация для Na^+ -связывающей системы), то реакция на добавление 200 мМ K^+ составляла $\frac{2}{3}$ от таковой в случае, когда весь Na^+ заменяли холином. Для калибровки этих реакций подавали 1800 стимулов 30 с, что давало дополнительный вход Ca^{2+} за счет стимуляции (измеренный с помощью ⁴⁵Ca²⁺) 90 нмоль/см² или 3 нмоль/(см²·с). Результаты этого эксперимента убедительно свидетельствуют пользу мнения, что стадией, лимитирующей скорость входа Ca^{2+} (при неизменном $[\text{Na}^+]_i$), является преодоление кинетического барьера, созданного мембранным потенциалом, а не E_{Na^+} , так как при постоянном E_{Na^+} , но разных E_m (первая и последняя реакции на постоянную деполяризацию на рис. 10.5) ответы отличаются только в 2 раза, что согласуется с результатом, полученным при деполяризации большой величины (450 мМ K^+ по сравнению с

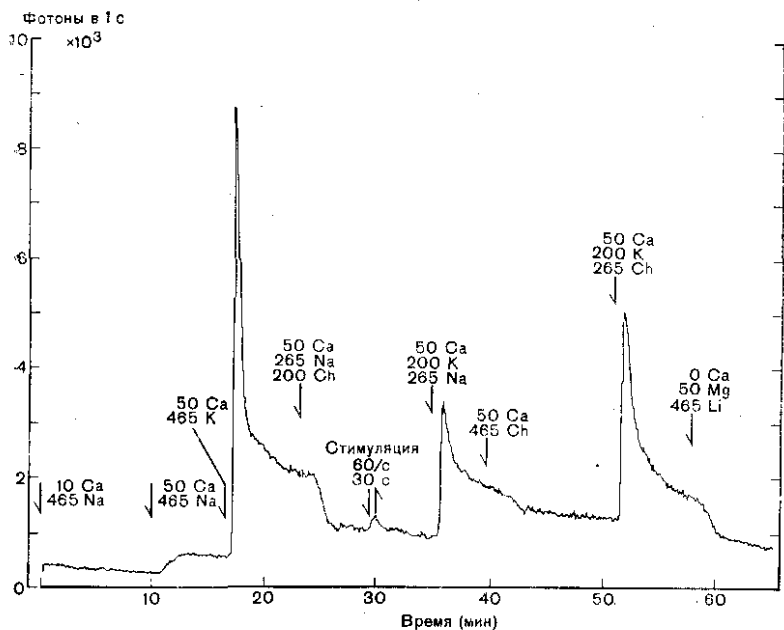
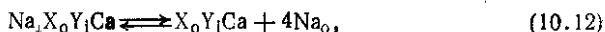
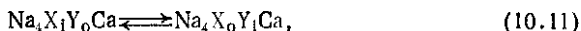
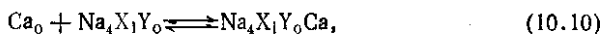


Рис. 10.5. Изменение биолюминесценции акворина (в фотонах) в зависимости от времени при изменении состава внеклеточного раствора, в который помещен аксон кальмара. Смена растворов обозначена стрелками (Mullins, Requena, неопубликованные данные).

200 мМ К⁺). Эти результаты свидетельствуют против концепции конкуренции ионов Na⁺ и Ca²⁺ за общее место связывания на переносчике.

Приведенные на рис. 10.5 данные показывают также, что при реполяризации скорость уменьшения излучения света значительно зависит от того, присутствуют ли ионы Na⁺ в морской воде или нет (сравните первую реполяризацию — морская вода с Na⁺, со второй — морская вода с холином). Эти наблюдения позволяют предположить, что выведение Ca²⁺ по механизму Na⁺—Ca²⁺-обмена является важным для снижения [Ca²⁺]_i.

При использовании модели с отдельными местами связывания и стехиометрией обмена 4Na⁺ : 1Ca²⁺ поступление Ca²⁺ по механизму Na⁺—Ca²⁺-обмена можно описать следующими уравнениями:



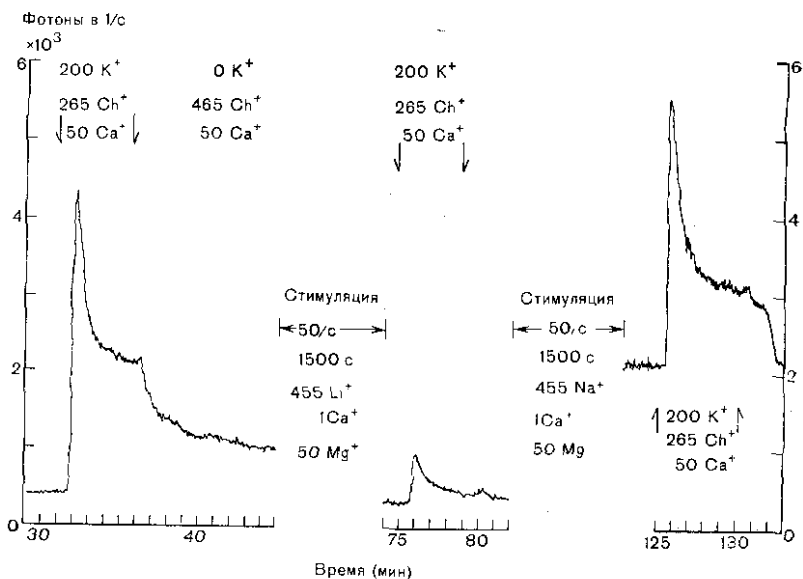


Рис. 10.6. Интенсивность люминесценции акворина, введенного в аксон кальмара, при различном составе внеклеточного раствора.

Слева — контрольная деполяризация в морской воде, содержащей 200 мМ K⁺, 265 мМ холина и 50 мМ Ca²⁺. Затем аксон в течение 1500 с стимулировали с частотой 50 с в растворе, содержащем Li⁺ вместо Na⁺ (1 мМ Ca²⁺, 50 мМ Mg⁺, 455 мМ Li⁺), что приводило к двукратному снижению содержания [Na⁺]_i. После этого деполяризация вызвала существенно меньшую интенсивность люминесценции, составляющую около 1/3 от контроля (в центре). Если затем аксон поместить в морскую воду, содержащую Na⁺ вместо Li⁺, и стимулировать в тех же условиях, что и раньше, то величина [Na⁺]_i возвращается к исходному уровню и восстанавливается нормальное поступление Ca²⁺ при деполяризации (справа) (Mullins, Requena, неопубликованные данные).

где X — место связывания Na⁺, Y — место связывания Ca²⁺, которое появляется, когда с переносчиком связывается необходимое количество ионов Na⁺. Реакция (10.9) подчеркивает важную роль [Na⁺]_i в инициации работы переносчика, приводящей к входу Ca²⁺. В эксперименте (рис. 10.6) на аксонах кальмара, в которые вводили акворин, мы получили (рис. 10.6 запись слева) такую же реакцию на деполяризацию, как показано на рис. 10.5. После этого аксон стимулировали в морской воде с Li⁺ вместо Na⁺, что, как показано, уменьшает величину [Na⁺]_i приблизительно до половины исходной. Повторная проверка реакции на деполяризацию показала, что эта величина составляет 1/3 от предыдущей, в то время как повторная стимуляция аксона в морской воде с Na⁺ для восстановления [Na⁺]_i до исходного уровня приводила к появлению при деполяризации той же реакции, что и наблюдалась вначале.

Кроме [Na⁺]_i, в реакции (10.9) требуется подача X₁. В этом случае общее число молекул переносчика X_T можно представить как X₀ + X₁ + Na_nX₀ + Na_nX₁, где символ Na_nX обозначает все формы X, связанные с Na⁺. Таким образом, если Na₀ находится в насыщающей концентрации, переносчик будет находиться в виде

NaX_0 , Na_2X_0 , Na_3X_0 и Na_4X_0 и все эти формы X_0 с различной степенью связывания Na^+ не могут участвовать в реакциях в качестве X_1 .

Реакция (10.10) описывает связывание Ca_0 с комплексом Na^+ -переносчик. Проведенные в последнее время измерения на аксоне кальмара показали, что концентрация внеклеточного Ca^{2+} , вызывающая половину насыщения переносчика, равна 0,5 мМ, а так как морская вода содержит 10 мМ Ca^{2+} , можно ожидать, что при физиологических значениях $[\text{Ca}^{2+}]_0$ реакция входа Ca^{2+} будет практически насыщена. Перемещение Na^+ наружу и Ca^{2+} внутрь описывается реакцией (10.11). Так как на этой стадии наружу переносятся два нескомпенсированных заряда, то очевидно, что мембранный потенциал будет существенно влиять на эту стадию реакции транспорта. Действительно, так как из всех экспериментальных воздействий наибольший входящий поток Ca^{2+} возникает при деполяризации, поэтому кажется разумным, что при насыщающих концентрациях $[\text{Na}^+]_i$ и $[\text{Ca}^{2+}]_0$ реакция (10.11) является «узким местом», ограничивающим скорость всего процесса обмена. Реакция (10.12) описывает диссоциацию Na^+ с распадом комплекса Na_4X_0 . Трудно сказать, эта ли реакция или увеличение X_1 в результате установления $[\text{Na}^+]_0 = 0$ является более важной для увеличения входящего потока Ca^{2+} , которое, как известно, происходит в условиях безнатриевого раствора. Однако ясно, что вход Ca^{2+} , возникающий в безнатриевых растворах, значительно меньше, чем вход Ca^{2+} , вызванный снижением трансмембранной разности потенциалов до нуля. Реакция (10.13) не может ограничивать скорость процесса обмена, а реакция (10.14) возвращает переносчик к началу цикла. Если «пустой» переносчик обладает зарядом, то эта реакция будет чувствительна к мембранному потенциалу. Она будет протекать медленнее, если переносчик возвращается в начало цикла в процессе выведения Ca^{2+} (т. е. в условиях, когда вход и выход Ca^{2+} уравниваются), но и в этом случае мы не располагаем достаточной информацией, чтобы с уверенностью судить о скорости этой реакции.

Уравнение $2E_{\text{Na}} - E_{\text{Ca}} - E_{\text{M}} = 0$ является термодинамическим и определяет точку равновесия, когда результирующий поток Ca^{2+} будет входящим или выходящим. Оно ничего не сообщает о величине этого потока, и следующий вопрос, который следует обсудить, состоит в том, чем определяется величина потока Ca^{2+} в условиях, близких к равновесию и далеких от равновесия. Полезно заметить, что отношение $[\text{Na}^+]_i / [\text{Na}^+]_0$, равное 1 : 15, может быть получено как при $[\text{Na}^+]_i = 1$ мМ, $[\text{Na}^+]_0 = 15$ мМ, так и при $[\text{Na}^+]_i = 10$ мМ, $[\text{Na}^+]_0 = 150$ мМ. В обоих случаях величина E_{Na} одна и та же, но в первом случае поток Ca^{2+} по механизму $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена будет очень маленьким, в то время как в последнем случае он будет значительно больше. Это связано с тем, что в цепи реакций $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена происходит реакция между переносчиком и Na^+ с образованием NaX , первая стадия в реакции (10.9). Ранее было показано, что вероятным переносчиком Ca^{2+} является форма Na_4X . Эта форма может образоваться при реакции NaX с еще одним

ионом Na^+ с образованием Na_2X и так далее, пока, наконец, не образуется Na_4X . Вследствие этого в реальной ситуации при высоких значениях $[\text{Na}]_i$ все молекулы переносчика X_i будут связаны с ионами Na^+ (и некоторые будут находиться в форме комплексов Na_4X), в то время как при низких величинах $[\text{Na}^+]_i$ будет иметь место небольшое число комплексов NaX (и очень малое Na_4X) а большая часть молекул переносчика будет находиться в свободном состоянии. Таким образом, поток Ca^{2+} будет зависеть от $[\text{Na}^+]_i$, и эта зависимость будет очень крутой (степенной), так как для образования соответствующего комплекса с переносчиком требуется несколько ионов Na^+ .

Второе свойство системы $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена состоит в том, что в мембране имеется некоторое конечное число молекул переносчика и что в действительности все молекулы переносчика X будут распределены между двумя поверхностями мембраны (внешней и внутренней) пропорционально некоторой функции от концентраций Na^+ вблизи этих поверхностей. Ясно, что если $[\text{Na}^+]_o$ является насыщающей, а $[\text{Na}^+]_i$ постепенно увеличивается, то молекулы переносчика, которые раньше были заняты Na_o , будут постепенно становиться доступными для переноса Ca_o внутрь в обмен на Na_i . Реальная взаимосвязь является более сложной, особенно при необходимости учитывать движение как Na^+ , так и Ca^{2+} , но для того чтобы увидеть, как система работает, удобнее рассматривать переносчик в случае, когда в среде присутствуют только ионы Na^+ . В этих условиях реальный транспорт невозможен, но можно определить влияние Na^+ на распределение переносчика.

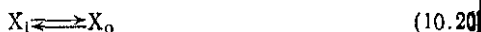
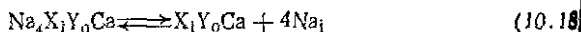
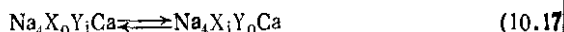
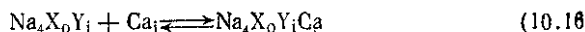
Условие:

$$\begin{aligned} [\text{Na}]_o &= [\text{Na}]_i = 0 \\ [\text{Na}]_o &= [\text{Na}]_i \end{aligned}$$

Переносчик:

$$\begin{aligned} [\text{X}]_o &= [\text{X}]_i = 0,5 \\ [\text{X}]_o &= [\text{X}]_i \\ [\text{Na}_4\text{X}]_o &= [\text{Na}_4\text{X}]_i \end{aligned}$$

Если Ca^{2+} транспортируется переносчиком внутрь и наружу с равными скоростями, то потоки Na^+ и X внутрь и наружу также равны. Если теперь удалить ионы Ca^{2+} из перфузионного раствора так что $[\text{Ca}]_o = 0$, цепь реакций, идущих с участием переносчика будет иметь другой вид:



Если последняя реакция — перемещение X с внутренней стороны мембраны наружу, которое ранее осуществлялось вместе с входом Ca^{2+} , равным его выходу, медленнее, чем реакция входа Ca^{2+} , то возникает новая ограничивающая скорость всего процесса стадия (нехватка X_o), и выходящий поток Ca^{2+} уменьшится. В экспери

ментах иногда удается наблюдать такое явление в бескальциевых условиях, и обычно его считают свидетельством в пользу существования Ca^{2+} — Ca^{2+} -обмена. Проведенный выше анализ дает иное объяснение таким данным.

ПРИМЕНЕНИЕ ГИПОТЕЗЫ Na^+ — Ca^{2+} -ОБМЕНА К СОКРАЩЕНИЮ СЕРДЦА

Миокардиальные клетки любого типа имеют систему генерации потенциала действия, для которой обычным является генерация продолжительных (несколько сотен миллисекунд) деполяризаций. В отличие от клеток нервной системы сопротивление мембраны сердечных клеток во время деполяризации существенно более высоко, т. е. клетки усиленно защищаются от потери ионов K^+ , что является обычным следствием постоянной деполяризации нервных волокон. Как было отмечено ранее в этой главе, в случае если реверсный потенциал Na^+ — Ca^{2+} -обмена находится около -40 мВ, то при потенциале покоя механизма Na^+ — Ca^{2+} -обмена выводит из клеток ионы Ca^{2+} , вошедшие в эти клетки при деполяризации, а во время фазы плато потенциала будет накапливать ионы Ca^{2+} . Такое поступление может быть вызвано как входом Ca^{2+} через потенциалзависимые кальциевые каналы, которые открываются при деполяризации, так и введением Ca^{2+} по механизму Na^+ — Ca^{2+} -обмена, работающего в направлении обмена Ca_o на Na_i . Движение Ca^{2+} в сердечных клетках показано на схеме 10.1, где в качестве ини-

Схема 10.1. Последовательность событий в миокардиальной клетке, запускаемая деполяризацией



цирующего события выступает деполяризация, возникающая во время потенциала действия. Кроме двух упомянутых выше источников Ca^{2+} , имеется также освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных запасников, и поступление Ca^{2+} из этих трех источников приводит к возрастанию внутриклеточной концентрации ионов

Ca^{2+} . Подъем $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в свою очередь запускает три механизма: а) вызывает механическую реакцию в виде сокращения; б) увеличивает скорость поглощения Ca^{2+} обратно во внутриклеточные запасы (саркоплазматический ретикулум); в) активирует Ca^{2+} -чувствительные калиевые каналы, частично ответственные за реполяризацию клетки. Реполяризация сама по себе останавливает все виды поступления Ca^{2+} путем закрытия кальциевых каналов и реверсии направления $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена, который теперь начинает выводить Ca^{2+} из клетки. Отметим, что существует два процесса, снижающих $[\text{Ca}^{2+}]_i$: увеличение скорости поглощения Ca^{2+} внутриклеточными запасниками и $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен. Кроме того, определенный вклад может вносить АТФ-зависимый мембранный насос, скорость работы которого пропорциональна $[\text{Ca}^{2+}]_i$, но трудно ожидать, что он будет чувствителен к мембранному потенциалу, так как использует большую энергию, получаемую при гидролизе АТФ. Однако вследствие такой схемы движения Ca^{2+} практически весь прирост Ca^{2+} , являющийся результатом деполяризации клетки, может быть поглощен внутриклеточными запасниками (саркоплазматический ретикулум), так что расслабление миокарда произойдет еще при деполяризации мембраны. Однако СР не может работать таким образом в течение многих сердечных циклов, так как он быстро насытится ионами Ca^{2+} . Следовательно, необходимо предположить, что во время реполяризации мембраны $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен снова активируется и выводит ионы Ca^{2+} из клетки, снижая $[\text{Ca}^{2+}]_i$ до очень низких значений, при которых происходит утечка ионов Ca^{2+} из СР в миоплазму, в дальнейшем выкачивающихся наружу при работе сарколеммального Са-насоса.

Описанная выше схема не является единственно возможной; доказано, что в миокарде лягушки расслабление наступает после реполяризации мембраны и скорость расслабления сильно зависит от $[\text{Na}^+]_o$, оба эти явления можно объяснить, если предположить, что непосредственным механизмом релаксации является $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен. Почему выведение Ca^{2+} зависит и от $[\text{Na}^+]_o$, и от мембранного потенциала? Для работы переносчика в процессе $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена необходимо, чтобы Са₁ обменивался на Na₁ (отсюда зависимость от $[\text{Na}^+]_o$), и если при выведении одного иона Ca^{2+} поступают четыре иона Na^+ , то большая отрицательная величина мембранного потенциала будет способствовать входу Na^+ (и сопряженному с ним выходу Ca^{2+}).

Если кратко суммировать наши представления относительно расслабления сердечных клеток, то нужно различать два механизма расслабления: а) независящее от мембранного потенциала поглощение Ca^{2+} из миоплазмы в СР, после чего значительная часть этого Ca^{2+} удаляется из клетки Са⁺-насосами сарколеммы, б) непосредственное удаление Ca^{2+} из миоплазмы в межклеточное пространство при работе переносчиков поверхностной мембраны, зависящих от электрохимического потенциала для ионов Na^+ (т. е. $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен).

В подобной ситуации может быть полезно дать определение процесса электрохимического сопряжения в сердце, как его пред-

ставляли 5 лет назад, отметить изменения, произошедшие за последнее время, и указать данные, на основании которых было выдвинуто предположение о более важной роли $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена. В 1978 г. считали, что необходимые для сокращения ионы Ca^{2+} поступают только через медленные каналы и из СР, и спорным был вопрос только об относительном количестве Ca^{2+} , поступающего из каждого из этих источников [4]. Так как эти два источника Ca^{2+} полностью описаны в этой книге в главах 9 и 11, то анализ их здесь не приводится. Было также общепризнано, что электронейтральный $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен играет определенную роль: а) в развитии контрактуры, наблюдаемой в безнатриевом растворе; б) в удалении Ca^{2+} из клеток, когда $[\text{Ca}^{2+}]_i$ становится очень высокой. Изменения представлений о $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмене стали необходимыми, когда выяснилось, что этот процесс чувствителен к мембранному потенциалу и что, как отмечалось ранее в этой главе, он способен вводить Ca^{2+} внутрь клеток при деполяризации. Наблюдение, что $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен является электрогенным или по крайней мере чувствительным к потенциалу, не вызывает никаких серьезных сомнений после того, как это было подтверждено в исследованиях на аксоне кальмара [7], на везикулах сердечной сарколеммы [8] и на миокардиальных клетках [9].

Это единственное изменение концепции $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена, состоящее в замене электронейтрального обмена электрогенным, требует серьезного пересмотра многих характеристик электромеханического сопряжения, которые считались уже окончательно установленными. Например, при электронейтральном обмене максимальный вход Ca^{2+} будет наблюдаться при удалении внеклеточного Na^+ при нормальном потенциале покоя мембраны. В действительности же значительно больший входящий поток Ca^{2+} в безнатриевой среде будет наблюдаться при снижении мембранного потенциала ниже потенциала реверсии $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена (E_p). При деполяризации развивается также медленный входящий ток, который вычитается из выходящего тока, генерируемого при входе Ca^{2+} , так как большее количество зарядов Na^+ , выходящее наружу, обменивается на меньшее количество зарядов Ca^{2+} , поступающих внутрь. Следовательно, не удивительно, что оказалось во всех случаях трудно определить связь между медленным входящим током и сокращением.

В настоящее время не установлено блокаторов, способных избирательно действовать на $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен, не влияя на медленный входящий ток, хотя и появляются сообщения об обнаружении такого блокатора. Поэтому с помощью фармакологических средств пока невозможно отделить друг от друга эти токи, направленные в противоположные стороны. Единственное, что можно сделать, это снизить $[\text{Na}^+]_i$ либо путем увеличения скорости (Na^+ , K^+)-насоса, либо уменьшением входящей утечки Na^+ при небольшом понижении Na_o ; такое изменение $[\text{Na}^+]_i$ практически устранит поступление Ca^{2+} по механизму $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена (как показано на рис. 10.6). Эти данные сами по себе являются подтверждением электрогенности $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена, как будет показано при даль-

нейшем анализе. Если выражение для равновесия $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -омбена при сопряжении $4\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$ ($2E_{\text{Na}} - E_{\text{Ca}} = E_m$) переписать, возведя обе части в экспоненту, то получим:

$$[\text{Ca}]_o \cdot ([\text{Na}]_i)^4 \cdot k = [\text{Ca}]_i \cdot ([\text{Na}]_o)^4 \cdot k^{-1},$$

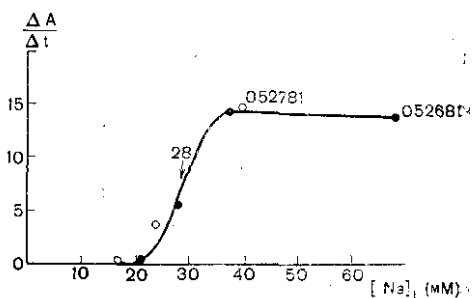
где $k = \exp(E_m F/RT)$. В таком виде это выражение является произведением трех сомножителей: внеклеточной концентрации ионов Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o$), внутриклеточной концентрации ионов Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$), которая ответственна за часть входа Ca^{2+} , зависящую от $[\text{Na}^+]_i$, и некоторой функции мембранного потенциала, приводящей к увеличению входящего потока Ca^{2+} при деполяризации. Так как организмы животных обладают хорошей регуляцией постоянства $[\text{Ca}^{2+}]_o$ и $[\text{Na}^+]_o$, мы можем записать приведенное выше уравнение в следующем виде:

$$[\text{Ca}]_i = ([\text{Na}]_i)^4 \cdot a \cdot \exp(2E_m F/RT),$$

где a — константа, равная $([\text{Ca}^{2+}]_o/[\text{Na}^+]_o)^4$. Следовательно, можно сделать вывод, что в условиях равновесия внутриклеточная концентрация ионов Ca^{2+} пропорциональна $([\text{Na}^+]_i)^4$, умноженной на некоторую функцию мембранного потенциала. Отметим, что это соотношение дает низкие величины $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (а следовательно, и сократительной активности) при малых $[\text{Na}^+]_i$ или же в случаях, когда мембранный потенциал имеет большое отрицательное значение. Если $[\text{Ca}^{2+}]_i$ выше некоторой пороговой величины, то в миокарде разовьется некоторое постоянное механическое напряжение (контрактура), величина которого (в определенных пределах) будет пропорциональна $[\text{Ca}^{2+}]_i$. В недавнем исследовании [10] на волокнах Пуркиньи сердца с использованием Na^+ -чувствительных внутриклеточных электродов в условиях фиксации потенциала было показано, что контрактура увеличивается при увеличении $[\text{Na}^+]_i$, но только при низком мембранном потенциале. При гиперполяризации мембраны изменения $[\text{Na}^+]_i$ не вызывают развития контрактуры, приводя, таким образом, к выводу, что величина $[\text{Ca}^{2+}]_i$ контролируется произведением $([\text{Na}^+]_i) \cdot (E_m)$. При постоянном E_m контрактура была пропорциональна $[\text{Na}^+]_i$ в степени 3,7, а при постоянной $[\text{Na}^+]_i$ была пропорциональна $\exp(E_m/16,5 \text{ мВ})$. Заметим, что это близко к теоретической величине $1,5 E_m F/RT$.

Результаты еще одного исследования [11] показаны на рис. 10.7. В этом случае в аксон кальмара вводили арсеназо III, краску, чувствительную к концентрации свободного Ca^{2+} в волокне. Спектрофотометрия позволяет экспериментатору измерять долю красителя, связанного с Ca^{2+} , и при наличии калибровки определить величину концентрации свободного Ca^{2+} в аксоплазме. Осуществление такого эксперимента позволяет, как показано на рис. 10.7, связать вход Ca^{2+} при деполяризации с внутриклеточной концентрацией $[\text{Na}^+]_i$, измеряемой с помощью Na^+ -чувствительного электрода. Зависимость скорости входа Ca^{2+} с $[\text{Na}^+]_i$ очень резкая, так как коэффициент в координатах Хилла равен 7, что означает образование комплексов высокого порядка с переносчиком и

Рис. 10.7. Зависимость скорости поступления Ca^{2+} в аксон кальмара от $[\text{Na}^+]_i$. Об изменении $[\text{Ca}^{2+}]_i$ судили по поглощению света красителем арсеназо III. Поступление Ca^{2+} вызывали деполяризацией до +65 мВ. Приведены данные, полученные на двух аксонах. Обратите внимание, что скорость поступления Ca^{2+} составляет половину максимальной при $[\text{Na}^+]_i = 28$ мМ, а при 20 мМ ее уже невозможно измерить. По [11].



процессе обмена. Оба описанных выше исследования свидетельствуют в пользу того, что при входе Ca^{2+} во время деполяризации, зависящего от $[\text{Na}^+]_i$, происходит взаимодействие переносчика более чем с 3 ионами Na^+ , вследствие чего вход Ca^{2+} становится зависимым от потенциала и необычайно чувствительным к $[\text{Na}^+]_i$.

До настоящего времени при обсуждении этого вопроса предполагали, что все ионы Ca^{2+} , поступающие в нервное или мышечное волокно, расходуются на увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, в то время как обычно большая часть входящего Ca^{2+} быстро поглощается различными люотрикеточными Са-связывающими структурами, такими, как митохондрии, саркоплазматический ретикулум в мышце и эндоплазматический ретикулум в нервном волокне, и сократительным белком тропонином С в мышце. Гигантский аксон кальмара имеет ряд преимуществ при проведении такого сорта исследований. Одно из них состоит в том, что может быть показано, что вход Ca^{2+} за промежутками времени около 1 мин определяется исключительно $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обменом, если заблокировать натриевые каналы ТТХ. Происходит частичная буферизация вошедших ионов Ca^{2+} в результате их поглощения эндоплазматическим ретикулумом, а также митохондриями (если $[\text{Ca}^{2+}]_i$ достаточно высока). Поглощение Ca^{2+} митохондриями может быть полностью заблокировано с помощью CN (без какого-либо влияния на аксоплазматическую концентрацию АТФ, если длительность воздействия не превышает 100 мип). На рис. 10.8, а показаны результаты эксперимента на аксоне кальмара, внутрь которого введен акворин. Здесь отложено количество испускаемых акворинном фотонов за 1 с в зависимости от времени для аксона, находящегося в морской воде с 50 мМ Ca^{2+} (в 15 раз выше нормы) и с CN. Известно, что в этих условиях вход Ca^{2+} превышает его выведение из аксона, тем не менее излучение света во времени не изменяется в течение 1 ч и более. Если ионы Na^+ в морской воде заменить холином, то произойдет резкое повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, которое может продолжаться бесконечно. Ясно, что митохондрии не участвуют в буферизации Ca^{2+} , так как они блокированы CN еще до замены Na^+ холином, поэтому мы сделали вывод, что в этом случае Ca^{2+} входит в аксон быстрее, чем эндоплазматический ретикулум способен его поглотить. Небольшая деполяризация (20 мВ), возникающая при добавлении 100 мМ K^+ к мор-

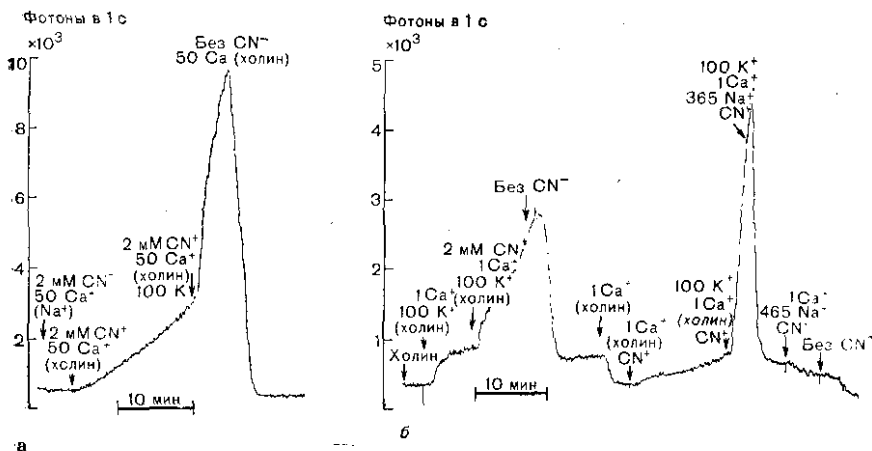


Рис. 10.8. Изменение интенсивности люминесценции акворина, введенного внутрь аксона кальмара, при различных воздействиях.

а — аксон исходно находился в морской воде, содержащей 50 мМ Ca^{2+} и CN^- . Затем в растворе Na^+ заменили холином и через некоторое время деполаризовали раствором, содержащим 100 мМ K^+ ; б — в морской воде содержалось только 1 мМ Ca^{2+} (50 мМ Mg^{2+}), так что поступление Ca^{2+} по механизму Na-Ca -обмена близко к насыщению ($R_{1/2}=0,5$ мМ), но поступление по натриевым и калиевым каналам минимально. Ионы Ca^{2+} , дополнительно поступающие в аксон при $[\text{Na}^+]_o=0$ мМ, могут захватываться митохондриями, судя по реакции на CN . При деполаризации аксона (100 мМ K^+) в присутствии CN величина $[\text{Ca}^{2+}]_i$ повышается и может быть снова снижена до нормы простой заменой холина Na^+ (Requena, Mullins, неопубликованные данные).

ской воде, содержащей холин и CN , существенно увеличивает скорость входа Ca^{2+} , и процесс входа Ca^{2+} в аксон может быть полностью остановлен, если удалить из морской воды CN и 100 мМ K^+ . Так как выведение Ca^{2+} из нервного волокна очень мало, то очевидно, что такое быстрое падение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ обусловлено захватом Ca^{2+} в митохондрии при удалении CN из раствора. На другом аксоне (см. рис. 10.8, б) воздействие 100 мМ K^+ и холина приводило почти к удвоению излучения акворина, когда $[\text{Ca}^{2+}]_o$ составляла 1 мМ вместо 50 мМ (см. рис. 10.8, а). Добавление CN к морской воде, содержащей 100 мМ K^+ и холин, приводило к повышению интенсивности излучения, которое бесконечно возрастало. Эти данные показывают, что выход интенсивности излучения на плато было результатом уравнивания входа Ca^{2+} с его поглощением митохондриями. Поэтому при подавлении поглощения Ca^{2+} митохондриями при действии CN происходит увеличение концентрации ионизированного Ca^{2+} . Отметим, что после удаления CN из раствора произошло восстановление того уровня излучения, которое наблюдалось в растворе, содержащем 100 мМ K^+ и холин, до действия CN ; то же отмечалось при удалении из морской воды избытка ионов K^+ . Если повторить этот эксперимент без добавления 100 мМ K^+ , но в присутствии CN , то сначала при замене Na^+ холином будет наблюдаться небольшое поступление Ca^{2+} , которое бесконечно продолжится, а затем — резкий рост входа Ca^{2+} при добавлении CN , демонстрирующий вклад митохондрий в регуляцию $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Для прекращения этого массивного входа Ca^{2+} не обязательно удалить

из раствора CN или реполяризовать мембрану, так как обратная замена холина ионами Na^+ в морской воде уменьшала поступление Ca^{2+} в достаточной степени, чтобы уровень $[\text{Ca}^{2+}]_i$ снизился до контрольных значений. Значение этих наблюдений состоит в невозможности предположительно определить величину $[\text{Ca}^{2+}]_i$, исходя из допускаемого влияния некоторого воздействия на вход или выход Ca^{2+} без детального учета реакций внутриклеточных Ca^{2+} -связывающих структур. В сердечных клетках невозможно изучать длительное воздействие веществ, блокирующих цепь переноса электрона, таких, как CN , вследствие полной деградации АТФ, а значит, прекращения работы как $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -насоса, так и Ca -насоса CP . Однако следует ожидать, что любые условия, приводящие к угнетению аккумуляции Ca^{2+} с помощью внутриклеточных Ca -секвестрирующих механизмов, будут влиять на процесс сокращения.

РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ В СЕРДЦЕ

Есть все основания полагать, что во многих типах клеток сердца $\text{Na}^+ - \text{Ca}^+$ -обмен является основным механизмом, удаляющим из клеток во время реполяризации (в диастолу) Ca^{2+} , поступающий за время деполяризации. Как было сказано выше, величины $[\text{Ca}^{2+}]_o$, $[\text{Na}^+]_o$ и E_m не изменяются во время диастолы. Можно предположить, что на выход Ca^{2+} из сердечных клеток влияет только величина $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в каждый определенный момент времени. В этом случае можно ожидать, что подъем $[\text{Ca}^{2+}]_i$ приводит к увеличению количества Ca^{2+} , находящегося в запасниках CP , а также ожидать, что на скорость откачки Ca^{2+} из миоплазмы в CP влияет $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в миоплазме по крайней мере при концентрациях ниже насыщающей. Из этого следует, что если условия изменить так, чтобы в сердечные клетки поступило больше Ca^{2+} , то увеличится и выведение Ca^{2+} , и его аккумуляция в CP .

Так как величина минутного объема сердца может изменяться в широких пределах, должны существовать надежные механизмы повышения как частоты сокращений сердца, так и силы каждого сокращения, чтобы удовлетворить существенно изменяющиеся запросы кровообращения. В этом разделе мы собираемся обсудить, какой вклад может вносить $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен в регуляцию минутного объема сердца. Так как последний представляет собой произведение частоты на ударный объем, было бы полезно определить, может ли $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен влиять на частоту сердечного ритма. Частота сердечного ритма обычно определяется СА-узлом, характеристики клеток которого отличаются до некоторой степени от характеристик клеток сократительного миокарда. Во-первых, они имеют низкий потенциал покоя (возможно, -55 мВ) и, во-вторых, их потенциал действия является медленно нарастающим или кальциевым потенциалом действия. С точки зрения $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена можно ожидать, что низкий потенциал покоя приведет к повышению $[\text{Ca}^{2+}]_i$, что следует из связи $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и E_m рассмотренного в той же главе ранее. Вторая характерная черта таких клеток состоит

в том, что если какое-либо воздействие, например адреналин, вызовет увеличение поступления Ca^{2+} по кальциевым каналам и увеличение освобождения Ca^{2+} из СР, то можно ожидать, что повышенная в результате этого величина $[\text{Ca}^{2+}]_i$ вызовет во время диастолы выходящий ток большей величины, происхождение которого обусловлено $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обменом. Таким образом, связь между частотой возбуждения клеток водителя ритма и $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обменом может быть следующей: адреналин \rightarrow увеличение тока через кальциевые каналы \rightarrow повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ \rightarrow усиление работы $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена (во время диастолы) \rightarrow ускорение диастолической деполяризации \rightarrow более высокая частота возбуждения. Одновременно происходит повышение $[\text{Na}^+]_i$ и, следовательно, увеличивается выходящий ток Na^+ -насоса.

Для клеток рабочего миокарда повышение частоты возбуждения, вызванное более частой генерацией потенциала действия в клетках водителя ритма, означает, что в клетки за единицу времени поступает больше Na^+ , входящего с быстрым натриевым током и, что более важно, по механизму $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена вследствие учащения периодов выведения Ca^{2+} , входящего с каждым потенциалом действия. Таким образом описанная выше зависимость будет иметь вид: адреналин \rightarrow увеличение входа Ca^{2+} по кальциевым каналам (в систолу) \rightarrow повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ \rightarrow повышение $[\text{Na}^+]_i$ \rightarrow повышение поступления Ca^{2+} во время деполяризации (по механизму $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена) \rightarrow увеличение силы сокращения при деполяризации. Приведенный выше анализ позволяет, следовательно, предположить, что $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен может играть определенную роль как в регуляции частоты сердечного ритма, так и в регуляции амплитуды каждого отдельного сокращения.

Следует подчеркнуть, что так как $[\text{Na}^+]_i$ определяется суммой всех утечек Na^+ через каналы и по другим механизмам (например, $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен) во время фазы деполяризации потенциала действия, искусственные воздействия (такие, как действие оубаина), которые могут снизить скорость выкачивания Na^+ при работе (Na^+/K^+) -насоса, будут дополнительно способствовать увеличению $[\text{Na}^+]_i$, а следовательно, и силы каждого сокращения. Зависимость силы сокращения от $[\text{Na}^+]_i$ является очень резкой, причем при низких величинах $[\text{Na}^+]_i$ эффект незначителен, а в некотором диапазоне $[\text{Na}^+]_i$ повышение ее на 1 мМ дает явное увеличение силы сокращения. Такой результат будет понятен только в случае, если поступление Ca^{2+} связано с $[\text{Na}^+]_i$ -степенной функцией, причем необходима степень 4 или выше [10].

$[\text{Na}^+]_i$ можно изменить другим способом, не угнетая работу (Na^+/K^+) -насоса, а, наоборот, уменьшая вход Na^+ , что должно привести к снижению $[\text{Na}^+]_i$. При небольших изменениях $[\text{Na}^+]_i$ вблизи нормальной величины (150 мМ) вход Na^+ будет линейно зависеть от внеклеточной концентрации, так что, например, при 5% снижении плазматической концентрации Na^+ должно выразиться в 5% снижении $[\text{Na}^+]_i$. Возможно, это изменение находится в диапазоне, где влияние $[\text{Na}^+]_i$ на $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен будет ощутимым, так что это изменение (порядка 0,5 мМ) может существовать

но повлиять на силу сокращения. Замедление частоты сердечного ритма также вызовет снижение $[Na^+]_i$; не только из-за меньшего количества потенциалов действия за единицу времени и, значит, меньшего входа Na^+ , но и вследствие того, что меньшее число сокращений обуславливает меньшее поступление Ca^{2+} (либо через кальциевые каналы, либо по механизму $Na^+—Ca^{2+}$ -обмена) за единицу времени, а значит, необходимо меньшее поступление Na^+ для выведения входящего Ca^{2+} . Более низкая величина $[Na^+]_i$ означает также существование более высокого электрохимического градиента Na^+ (E_{Na}), следовательно, величина $[Ca^{2+}]_i$ в покое (в диастоле) также будет ниже, что приведет к уменьшению запасов Ca^{2+} в СР, которые определяются средней величиной $[Ca^{2+}]_i$ за цикл. Обзор данных по этому вопросу приведен в работе [13].

Заключение

Проведенные в последнее время исследования, особенно с использованием Na^+ -чувствительных электродов в сердечных клетках, выявили важную роль, которую играет $[Na^+]_i$ в определении не только постоянного (тонического) напряжения миокарда, также имеющего место, но и амплитуды транзиторного (фазического) сокращения, развивающегося при деполяризации. Относительно простое объяснение этих до некоторой степени удивительных наблюдений состоит в том, что давно известный и хорошо описанный процесс $Na^+—Ca^{2+}$ -обмена является электрогенным и, следовательно, чувствительным к мембранному потенциалу. Такое единственное предположение способно объяснить, почему безнатриевые растворы вызывают меньшее повышение поступления Ca^{2+} в клетки, чем деполяризация (несмотря на то что деполяризация вызывает поступление Ca^{2+} в миоплазму другими способами). Этот подход позволяет также понять механизм действия сердечных гликозидов и объяснить различия в способах расслабления сердечных клеток. Только один принцип присутствует повсюду в этом анализе — удивительная роль $[Na^+]_i$ в регуляции сокращения миокарда. Так как величина $[Na^+]_i$ задается при работе (Na^+/K^+)-насоса и зависит от митохондриальной концентрации ионов Na^+ , поглощение и выведение их из организма тесно связаны с регуляцией сократимости сердца.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Langer G. A. Sodium-calcium exchange in the heart. — Ann. Rev. physiol., 1982, vol. 44, p. 389—400.
2. Fabiato A., Fabiato F. Calcium and cardiac excitation coupling. — Ann. Rev. Physiol., 1979, vol. 41, p. 473—484.
3. Chapman R. A. Excitation-contraction coupling in cardiac muscle. — Progr. Biophys. mol. Biol., 1979, vol. 35, p. 1—52.
4. Fozzard H. A. Heart: excitation-contraction coupling. — Ann. Rev. physiol., 1977, vol. 39, p. 201—220.
5. Mullins L. J. Ion Transport in Heart. Raven Press, New York, 1981.
6. Reuter H., Seitz N. The dependence of Ca efflux from cardiac muscle on ion composition. — J. Physiol., 1968, vol. 195, p. 451—470.
7. Mullins L. J., Requena J. The "late" Ca channel in squid axons. — J. gen. Physiol., 1981, vol. 78, p. 683—700.

8. *Pitts B. J. R.* Stoichiometry of sodium-calcium exchange in cardiac sercolemmal vesicles. — *J. Biol. Chem.*, 1979, vol. 254, p. 6232—6235.
9. *Chapman R. A., Tunstall J.* The interaction of Na and Ca ions at the cell membrane and the control of contractile strength in frog atrial muscle. — *J. Physiol.*, 1980, vol. 305, p. 109—123.
10. *Eisner D., Lederer W. J., Vaughan-Jones R.* The control of tonic tension by membrane potential and intracellular Na activity in the sheep cardiac Purkinje fibre. — *J. Physiol.*, 1983, vol. 335, p. 723—743.
11. *Mullins L. J., Tiffert T., Vassort G., Whittembury J.* The effects of internal Na^+ and H^+ and of external Ca^{++} and membrane potential on Ca entry in squid axons. — *J. Physiol.*, 1983, vol. 338, p. 295—319.
12. *Eisner D. A., Lederer W. J., Vaughan-Jones R.* The dependence of sodium pumping and tension on intracellular sodium activity in voltage-clamped sheep Purkinje fibres. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1981, vol. 317, p. 163—187.
13. *Mullins L. J.* The generation of electric currents in cardiac fibers by Na/Ca exchanges. — *Amer. J. Physiol.*, 1979, vol. 263, p. C103—C110.

Глава 11

МЕТОДЫ РЕГИСТРАЦИИ ОСВОБОЖДЕНИЯ КАЛЬЦИЯ ИЗ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА СКИННИРОВАННЫХ МИОКАРДИАЛЬНЫХ КЛЕТОК И СООТНОШЕНИЕ МЕЖДУ ТРАНСМЕМБРАННЫМ ДВИЖЕНИЕМ КАЛЬЦИЯ И ЕГО ОСВОБОЖДЕНИЕМ

А. ФАБИАТО, К. М. БАУМГАРТЕН (FABIATO A., C. M. BAUMGARTEN)

ВВЕДЕНИЕ

Механизм электромеханического сопряжения еще полностью не выяснен для всех типов мышц [1—3]. Относительно миокарда до настоящего времени еще нет даже общепринятого мнения о том, происходит ли освобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума (СР) в процессе электромеханического сопряжения. Этот вопрос является основным из рассматриваемых в этой главе. При его обсуждении основное внимание будет уделено количественным оценкам потока Ca^{2+} через сарколемму и их возможной связи с поступлением Ca^{2+} в СР и выходом его из СР. Подробное описание простейших расчетов, которые можно провести с учетом этой корреляции, дает основу для практического анализа литературы.

Второй вопрос, обсуждаемый в этой главе, касается механизма гипотетического освобождения Ca^{2+} из СР. Для получения ответа на этот вопрос необходимо дать сравнительную оценку различных методов, используемых для выявления освобождения Ca^{2+} из СР скиннированных миокардиальных клеток (препараты, у которых удалена сарколемма). При проведении такой критической оценки нам показалось целесообразным включить ранее неопубликованные данные, касающиеся использования Ca^{2+} -селективных электродов для регистрации транзитного освобождения Ca^{2+} из СР скиннированных миокардиальных клеток (см. рис. 11.6). Затем будут рассмотрены аргументы за и против гипотезы вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} из СР [1, 2]. Мы не будем обсуждать альтернативные гипотезы, предложенные для объяснения механизма освобождения Ca^{2+} из СР, так как они подробно рассмотрены в другой работе [4], позволившей сделать вывод, что эти альтернативные гипотезы, по крайней мере в их настоящем виде, могут быть опровергнуты на основе имеющихся в настоящее время данных. Однако это не означает, что вызванное Ca^{2+} освобождение Ca^{2+} из СР является реальным физиологическим механизмом

электромеханического сопряжения в миокарде взрослых млекопитающих. Существующее мнение об отсутствии бесспорных причин для отказа от этой гипотезы вовсе не означает, что она справедлива.

Обсуждение данных литературы заключается в рассмотрении контраргументов и альтернатив для каждой из выдвигаемых гипотез [4] для того, чтобы показать необходимость проведения дальнейших экспериментов для окончательного решения вопроса об электромеханическом сопряжении в сердце. Мы не будем подробно описывать некоторые из гипотез, чтобы более серьезно сосредоточиться на обсуждении основных вопросов. Для ознакомления с другими точками зрения по этому вопросу, резко противоположными принятым в данной главе, будут приведены ссылки на литературные источники.

НАЛИЧИЕ ИЛИ ОТСУТСТВИЕ ОСВОБОЖДЕНИЯ Ca^{2+} ИЗ СЕРДЕЧНОГО САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

Доказательства освобождения Ca^{2+}

При детальном анализе зависимость силы сокращения сердца взрослого млекопитающего от частоты стимуляции обычно интерпретируется как доказательство того, что проникающие через сарколемму ионы Ca^{2+} во время одного потенциала действия используются не только для активации миофибрилл во время сопутствующего сокращения, но также пополняют запасы ионов Ca^{2+} , которые могут быть освобождены во время последующих сокращений [5—7]. Однако эти эксперименты не информируют о том, где точки зрения ультраструктуры клетки расположены Ca^{2+} -запасники.

Более прямое доказательство освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных запасников было получено в экспериментах с использованием биолюминесценции акворина для определения изменения миоплазматической концентрации свободного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$) в многоклеточных препаратах волокон Пуркинье сердца собаки [8, 9]. В таких препаратах аквориновый сигнал имеет два компонента (рис. 11.4). Различная зависимость этих двух компонентов от протокола стимуляции позволяет предположить, что первый соответствует трансмембранному входу Ca^{2+} , а второй — освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных запасников [8]. Эксперименты фиксации потенциала в этих условиях показали, что трансмембранный поток Ca^{2+} обладает по крайней мере некоторыми характеристиками, типичными для кальциевого тока, а не поступления Ca^{2+} , опосредованного переносчиком [9]. Однако точное расположение внутриклеточных запасников, из которых происходит освобождение Ca^{2+} , связанное со вторым компонентом, в этих опытах не было установлено.

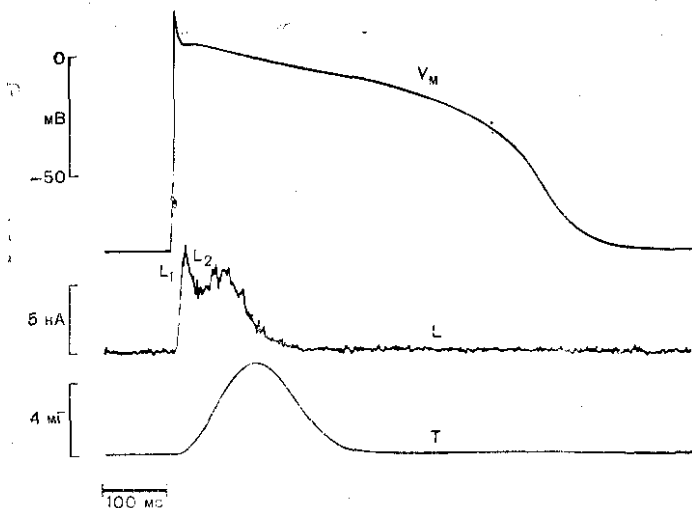


рис. 11.1. Быстрый (L_1)- и медленный (L_2)-компоненты сигнала биолюминесценции акворина в многоклеточном препарате волокна Пуркинье сердца лягушки длиной 1,5 мм. Одновременно регистрировали трансмембранный потенциал (V_M), интенсивность биолюминесценции акворина (L) и силу сокращения (T). Методом микроинъекции под давлением акворин вводили внутрь приблизительно 20 клеток на верхней поверхности препарата волокна Пуркинье. Сигналы, показанные на рисунке, получены путем усреднения 1000 одиночных регистраций. Сигнал биолюминесценции акворина получали с помощью фотомножителя, свет к которому подводился по световоду из люэте, расположенного под прозрачным дном перфузионной камеры. Трансмембранный потенциал регистрировали при помощи стандартной микроэлектродной техники и усилителя с высокоомным входом. Потенциал покоя составлял -82 мВ, овершут потенциала действия $+19$ мВ, полная длительность — 680 мс. Стимулирующий ток подавали один раз в 2 с через второй микроэлектрод. Потенциал действия вызывал развитие сокращения, достигшего максимума к 130 мс, а полное расслабление происходило через 600 мс. Начало сигнала биолюминесценции акворина предшествовало началу развития сокращения, и окончание сигнала также наблюдалось до полного расслабления. Различные реакции двух компонентов сигнала биолюминесценции акворина на изменение протокола стимуляции свидетельствуют о том, что первый компонент (L_1) соответствует поступлению Ca^{2+} через микролемму, а второй компонент (L_2) — освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных запасников. (Воспроизведено из [9] с разрешения авторов и редакции журнала «Pflugers Archiv»).

Фармакологические соединения, специфически действующие на СР, могли бы быть полезными для идентификации СР как внутриклеточного запасника Ca^{2+} [10]. Для этой цели часто используются кофеин, так как хорошо установлено, что он специфически вызывает освобождение Ca^{2+} из СР скелетной мышцы. К сожалению, в сердечной мышце ситуация усложняется, так как в этом случае кофеин имеет несколько мест действия, включая влияние на микролемму [11]. Также из-за отсутствия специфичности можно использовать и многие другие фармакологические вещества, применяемые с целью идентификации СР, как места создания запаса

ионов Ca^{2+} в сердечной мышце. В последнем обзоре [10] детально описана идея постановки эксперимента с использованием фармакологических веществ для критического анализа электромеханического сопряжения в сердце.

Свидетельства в пользу предположения о том, что Ca^{2+} -запасники располагаются в СР, получены в основном в экспериментах на препаратах, позволяющих непосредственно исследовать СР, таких, как изолированные везикулы СР и скиннированные кардиомиоциты. В этих исследованиях было показано, что СР обладает достаточной емкостью, чтобы аккумулировать количество ионов Ca^{2+} , способное вызвать активацию мюфибрилл, соответствующую физиологическому сокращению [12—14]. На скиннированных кардиомиоцитах можно убедительно показать, что освобождаемый при действии кофеина Ca^{2+} поступает из СР, так как такой препарат лишен сарколеммы [15]. Можно также подавить способность СР активно аккумулировать и освобождать ионы Ca^{2+} путем обработки детергентами; тогда внутриклеточные запасы Ca^{2+} исчезают [15]. Некоторые типы скиннированных кардиомиоцитов, такие, как клетки предсердия млекопитающих [15], проводящие сердечные миоциты собаки [16] и желудочка сердца голубя [16], не содержат поперечных трубочек. Изучение освобождения Ca^{2+} на таких препаратах показало, что поперечные трубочки не являются тем участком, где расположены запасы Ca^{2+} [15, 16]. Наконец, митохондрии, по-видимому, не способны аккумулировать Ca^{2+} , когда $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме находится в физиологическом диапазоне, в то время как они действительно аккумулируют Ca^{2+} , но чрезвычайно медленно, в случаях если $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме превышает допустимый физиологический уровень. Кроме того, ингибиторы и разобщители митохондриального дыхания не влияют на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных запасников при физиологической $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме [15]. Эти наблюдения показывают, что митохондрии не могут быть внутриклеточными запасниками Ca^{2+} . Следовательно, данные, полученные на скиннированных кардиомиоцитах, позволяют сделать бесспорное заключение, что Ca^{2+} может освобождаться из СР по крайней мере в таких препаратах.

Аргументы против освобождения Ca^{2+}

Хотя субклеточные препараты позволяют осуществить прямой доступ к СР, методы, используемые для их получения, могут повредить эту органеллу и вызвать появление у нее новых свойств, не являющихся физиологическими [2, 15]. На такое возражение очень трудно ответить определенно. Были приложены определенные усилия для оценки и коррекции некоторых нефизиологических условий в скиннированных кардиомиоцитах: нефизиологический уровень $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме и уровень загрузки СР ионами Ca^{2+} , разбухание СР [15]. Тем не менее выявить и скорректировать все потенциально нефизиологические условия, возникающие при удалении мембраны и замене внутриклеточной среды на некоторый рассчитанный раствор, очевидно невозможно. Следова-

но, мнение о том, что Ca^{2+} может освобождаться из СР, все еще может быть легко заменено некоторой альтернативной гипотезой. Такие гипотезы можно отнести к двум типам: а) в которых допускается существование внутриклеточных запасов Ca^{2+} , но предполагается, что они расположены не в СР, а в других структурах; б) в которых предполагается, что активация миофибрилл возможна вследствие непосредственного поступления Ca^{2+} через сарколемму без участия освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных запасников. У гипотез первого типа, предполагающих существование иных внутриклеточных запасников Ca^{2+} , отличных от СР, в качестве места локализации запасов Ca^{2+} были предложены митохондрии [17]. Однако от этой гипотезы практически полностью отказались, потому что сродство митохондрий к Ca^{2+} и скорость аккумуляции и освобождение Ca^{2+} митохондриями значительно более низкие по сравнению с физиологическими изменениями $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме, которые, как известно, происходят внутри миокардиальных клеток [15, 18, 19].

Согласно другой гипотезе, запасы Ca^{2+} содержатся в высокоаффинных, «зависимых от деполяризации», местах связывания на внутренней поверхности сарколеммы [7, 20]. Было выдвинуто предположение, что эти места связывания могут быть образованы кислыми липидами, такими, как фосфатидилсерин [20], содержание которого в изолированных препаратах сарколеммы велико [21]. Такое предположение невозможно опровергнуть, хотя и нет никаких прямых доказательств в его пользу. Концепция «зависимости от деполяризации» затрудняет опровержение этой гипотезы. Однако изученные на изолированной сарколемме места связывания Ca^{2+} обладают очень низким сродством к этому иону (в большинстве случаев порядка 10^4 M^{-1}) при физиологических концентрациях K^+ и Mg^{2+} [22, 23]. И все же, даже если бы эта гипотеза была подтверждена экспериментальными данными, наличие мест связывания на внутренней поверхности сарколеммы не опровергает возможности существования дополнительных запасов Ca^{2+} в СР.

Гипотезы второго типа отвергают любое освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных запасников [24, 25]. Появление такого предположения кажется справедливым в свете следующих бесспорных результатов; удаление Ca^{2+} из перфузионной среды приводит к исчезновению сокращения сердца в течение нескольких десятков секунд [26], в то время как потенциал действия сохраняется [27]. Эти наблюдения свидетельствуют, что трансмембранное поступление Ca^{2+} является значительной стадией процесса электромеханического сопряжения в миокарде, но они ни в коей мере не исключают возможности дополнительного освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных запасников [2, 22, 28]. Аргумент, наиболее часто приводимый для опровержения возможности освобождения Ca^{2+} из СР, является чисто количественным, на внешней поверхности сарколеммы связано такое количество Ca^{2+} , которого достаточно для прямой активации миофибрилл [24]. Этот аргумент можно оспаривать на двух уровнях. Во-первых, даже если бы удалось показать, что входящий поток ионов Ca^{2+} через сарколемму достаточен

для прямой активации миофибрилл, это не исключило бы возможности изменять количество Ca^{2+} , поступившего через сарколемму, до того, как этот Ca^{2+} достигнет миофибрилл [15], внутриклеточными запасниками Ca^{2+} , такими, как СР. Например, большая часть поступившего через сарколемму Ca^{2+} может быть поглощена СР, в то время как приблизительно такое же количество Ca^{2+} будет освобождено из СР. Во-вторых, этот количественный аргумент все еще не подтвержден экспериментальными данными. До сих пор не установлены ни величина проникающего через сарколемму потока Ca^{2+} , необходимая для прямой активации миофибрилл, ни реальная величина трансмембранного входа Ca^{2+} во время систолы.

Расчет величины входящего через сарколемму потока Ca^{2+} , необходимой для прямой активации миофибрилл, не был еще опубликован в литературе. Для этой цели часто используется работа [29] (см., например [24]). В действительности целью этого исследования [29] была не количественная оценка трансмембранного поступления Ca^{2+} , необходимого для прямой активации миофибрилл, а лишь определение цитоплазматического уровня $\text{Ca}^{2+}_{\text{своб}}$, который требуется для достижения определенной степени активации сократительного механизма, и определение количества Ca^{2+} , связанного с миофибриллами при такой активации. В этом исследовании [29] учитывали связывание Ca^{2+} только с АТФ и тропонином С ниже порога активации сокращения и игнорировали все прочие буферные системы для ионов Ca^{2+} , к которым относятся: кальмодулин [30], места связывания Ca^{2+} на внешней поверхности СР [31] и места связывания Ca^{2+} на внутренней поверхности сарколеммы, которые имеют низкое сродство к Ca^{2+} , но очень высокую емкость [21—23, 32].

Не известен также трансмембранный вход Ca^{2+} во время систолы. Вытеснение Ca^{2+} с помощью лантана [24], иона, который не проникает через сарколемму, позволяет лишь установить наличие пула Ca^{2+} , связанного на внешней поверхности мембраны. Эти данные, по крайней мере качественно, согласуются с большой связывающей способностью изолированных везикул сарколеммы [21—23, 32]. Анализ различных пулов Ca^{2+} на основе данных измерения потоков $^{45}\text{Ca}^{2+}$ [24] существенно затрудняется из-за наличия множества потенциальных пулов Ca^{2+} [33]. Результаты этого анализа подтвердили, что вытесняемые лантаном ионы Ca^{2+} расположены на внешней поверхности мембраны [24]; но вследствие того что анализ проводился при помощи интегрирования величины поступившего Ca^{2+} за несколько циклов сокращения, то невозможно было установить, в какой момент времени в течение сердечного цикла происходит поступление внутрь клетки расположенного на поверхности Ca^{2+} , и количественно оценить, какая часть связанного на поверхности Ca^{2+} входит внутрь клетки. Предварительные сообщения о попытках измерить систолический вход Ca^{2+} с помощью Ca^{2+} -селективных электродов [34, 35] (примечание 3) или с помощью антипирлазо III [36] слишком рано учитывать в этих оценках, и могут появиться еще много технических проблем при проведении таких экспериментов. Следовательно, единственными

данными, которые можно в настоящее время использовать для количественной оценки систолического трансмембранного поступления Ca^{2+} , являются результаты экспериментов по фиксации потенциала. Основная идея расчета трансмембранного входа Ca^{2+} на основе экспериментов по фиксации потенциала будет описана в разделе «Кальциевый ток».

Если принять гипотезу о том, что трансмембранный вход Ca^{2+} способен прямо активировать миофибриллы без освобождения Ca^{2+} из CP, то необходимо рассмотреть роль CP в аккумуляции Ca^{2+} . Одно из предположений [24, 25] заключается в том, что CP участвует в реаккумуляции Ca^{2+} , но не в освобождении Ca^{2+} . Следовательно, необходимо постулировать одноподправленный суммарный вход Ca^{2+} через CP [24, 25]. Хотя эту гипотезу нельзя исключить из обсуждения и на ее основе можно реально объяснить некоторые экспериментальные данные [24, 25], она создает сложную кинетическую проблему для выяснения способов возвращения Ca^{2+} на внешнюю поверхность мембраны для использования его в последующем сокращении [37]. Кроме того, эта гипотеза не согласуется с известными свойствами миокардиального CP [38].

Альтернативная гипотеза прямой активации миофибрилл ионами Ca^{2+} , поступающими через сарколемму, более проста по своей концепции. Она предполагает, что CP не играет абсолютно никакой роли в регуляции миоплазматической концентрации Ca^{2+} в данном сокращении. Выведение Ca^{2+} в этом случае целиком определяется $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обменом через поверхностную мембрану и Ca^{2+} -насосом сарколеммы. Основная идея расчета направления суммарного Ca^{2+} потока, создаваемого $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обменом, и возможная роль сарколеммального Са-насоса будут рассмотрены ниже, в разделах «Натрий-кальциевый обмен» и «Кальциевый насос сарколеммы».

Прямая активация миофибрилл ионами Ca^{2+} , входящими через сарколемму, выведение Ca^{2+} из кардиомиоцитов исключительно вследствие $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена и Са-насоса сарколеммы были предложены в качестве механизма регуляции Ca^{2+} -гомеостаза в кардиомиоцитах. В частности, для клеток желудочка сердца лягушки эта гипотеза была впервые детально разработана авторами работы [39], а затем и другими исследователями [40, 41]. В скринированных одиночных кардиомиоцитах желудочка сердца лягушки и в кардиомиоцитах желудочка сердца эмбрионов млекопитающих не удалось выявить быстрого освобождения Ca^{2+} , вызываемого добавлением в перфузате ионов Ca^{2+} или кофеина [15, 16]. Отсутствие быстрого освобождения Ca^{2+} наблюдалось также в многоклеточных препаратах тех же типов ткани, в которых сарколемму не удаляли полностью, а разрушали, так что сохранялись примембранные цистерны CP [15]. Тем не менее даже в тканях сердца лягушки, особенно в миокарде предсердий (примечание 4), нельзя полностью исключить участие освобождения Ca^{2+} из CP в электромеханическом сопряжении [10, 42].

Для миокарда желудочков сердца взрослых млекопитающих не удалось количественно ни подтвердить, ни опровергнуть аналогич-

ный механизм прямой активации миофибрилл ионами Ca^{2+} , поступающими через сарколемму [24], и их инактиваций путем удаления Ca^{2+} через мембрану при анализе данных о трансмембранных входящих и выходящих потоках Ca^{2+} , что будет обсуждаться в следующей главе. Однако гипотезы прямой активации миофибрилл миокарда взрослых млекопитающих были поставлены под сомнение результатами экспериментов на скиннированных кардиомиоцитах. Эти эксперименты показали, что СР обладает достаточной способностью аккумулировать Ca^{2+} и может изменять путем освобождения Ca^{2+} количество поступающего в миоплазму Ca^{2+} независимо от величины его входа через сарколемму [2, 13, 15]. Таким образом, для обоснования гипотезы прямой активации миофибрилл ионами Ca^{2+} , поступающими через сарколемму, приходится пренебрегать результатами, полученными на скиннированных кардиомиоцитах, на основе того, что эти препараты могут находиться в нефизиологических условиях [24], что, несомненно, является справедливым возражением. Вместе с тем, по-видимому, невозможно приписать все свойства СР в скиннированных кардиомиоцитах системе понеречных трубочек [20], которая отсутствует в ряде типов ткани, используемых для получения препаратов скиннированных кардиомиоцитов [15, 16].

ПРОХОЖДЕНИЕ КАЛЬЦИЯ ЧЕРЕЗ САРКОЛЕММУ И ЕГО ВОЗМОЖНАЯ СВЯЗЬ С ПРОНИКНОВЕНИЕМ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

Кальциевый ток

Эксперименты по фиксации потенциала показали существование медленного входящего тока (I_{si}), который отличается от быстрого патрневого тока тем, что не угнетается тетродотоксином [43]. Возникновение этого тока в основном связывают с входом Ca^{2+} [44]. В ранних исследованиях было трудно оценить амплитуду Ca^{2+} -тока, в частности, вследствие наложения выходящих K^+ -токов. Если I_{si} можно выделить из других ионных токов, то появляется возможность рассчитать величину потока Ca^{2+} , входящего через сарколемму и обусловленного Ca^{2+} -током, и рассмотреть вопрос, является ли величина входящего потока Ca^{2+} достаточной для прямой активации миофибрилл. В опубликованной недавно работе [43] авторы измерили медленный входящий ток в проводящих сердечных миоцитах теленка после блокирования всех остальных токов, накладывающихся на I_{si} . Эксперименты проводили в присутствии тетродотоксина для блокирования Na^+ -тока и после загрузки в клетки ионов Cs^{2+} для блокирования выходящих K^+ -токов. Для расчета входящего потока Ca^{2+} , исходя из медленного кальциевого тока, можно использовать следующее уравнение:

$$\frac{d[\text{Ca}]_{обм}}{dt} = \int_t^0 \left(\frac{J}{zF} \right) \times \left(\frac{S}{V} \right) \times \left(\frac{f_j}{f_v} \right), \quad (11.1)$$

где $d[\text{Ca}]_{\text{общ}}$ представляет собой изменение общего содержания Ca^{2+} в миоплазме (чтобы подчеркнуть, что имеется в виду общий кальций, а не только свободные ионы, мы опустили указание на заряд иона (Ca , а не Ca^{2+}) (мл/л) (М); dt — приращение времени с полным диапазоном от 0 до t (с); J — плотность тока (ток : площадь поверхности) ($\text{K}/\text{с}\cdot\text{см}^2$); z — валентность для $\text{Ca}^{2+} = 2$ безразмерная; F — постоянная Фарадея — $9,65 \cdot 10^4$ ($\text{K}/\text{моль}$); S/V — отношение площади к объему ($\text{см}^2/\text{л}$); f_i — доля I_{si} , переносимая ионами Ca^{2+} (безразмерная); f_v — доля объема клетки, в которую поступают ионы Ca^{2+} , входящие через мембрану (безразмерная).

Величина кальциевого тока, проходящего через единицу площади поверхности [переменная J в уравнении (11.1)], может быть вычислена следующим образом: при деполяризации от -60 мВ до 0 мВ (рис. 11.2, а), входящий ток быстро возрастает и достигает максимума (рис. 11.2, б, сплошная линия) за 5 мс. Затем ток инактивируется в основном за 20 мс и выходит на плато, так что входящий ток сохраняется в течение всего времени, пока поддерживается деполяризация. Воздействие блокатора канала медленного входящего тока (такого, как Д-600) устраняет развитие транзиторного входящего тока и сдвигает ток в выходящем направлении до показанного уровня (см. рис. 11.2, б, пунктир). Разность между уровнем тока, полученным при действии Д-600, и зависимым от времени током, полученным без Д-600, позволяет сделать вывод [45] о временном ходе и величине медленного входящего тока (рис. 11.2, в). На рис. 11.2, в, амплитуда тока равна 5×10^{-6} А/см² [43]. В экспериментах с использованием Д-600 выявлен неинактивирующийся компонент медленного входящего тока, который составляет около 20% от максимума тока при ступеньке до 0 мВ, при реполяризации до -60 мВ также сохраняется некоторая величина неинактивирующегося Ca^{2+} -тока.

Уровень неинактивирующегося Ca^{2+} -тока, показанный на рис. 11.2, не был получен непосредственно из данных [43], а является усредненной оценкой, выведенной на основе критического обзора литературных данных по экспериментам с блокаторами медленных каналов. Точные измерения неинактивирующегося Ca^{2+} -тока требуют высокоспецифичной блокады, достичь которой маловероятно [46]. Оценки, полученные на различных препаратах, сильно варьируют [47], кроме того, получены разные результаты на одном и том же препарате при использовании различных блокаторов. Например, в результате исследования влияния Д-600 на проводящие сердечные миоциты теленка [45, 48] предположили, что при деполяризации до 0 мВ не инактивируется до 50% медленных каналов. После загрузки проводящих сердечных миоцитов теленка ионами Cs^+ для блокирования выходящего тока сдвиг позднего компонента тока в выходящем направлении при действии Д-600 свидетельствовал о том, что только 20% тока не инактивируется при -40 мВ [43]. Воздействие марганца сдвигает поздний компонент тока во входящем направлении, что не может быть объяснено только блокированием неинактивировавшихся медленных каналов [43]. На одиночных изолированных кардиомиоцитах оценки так-

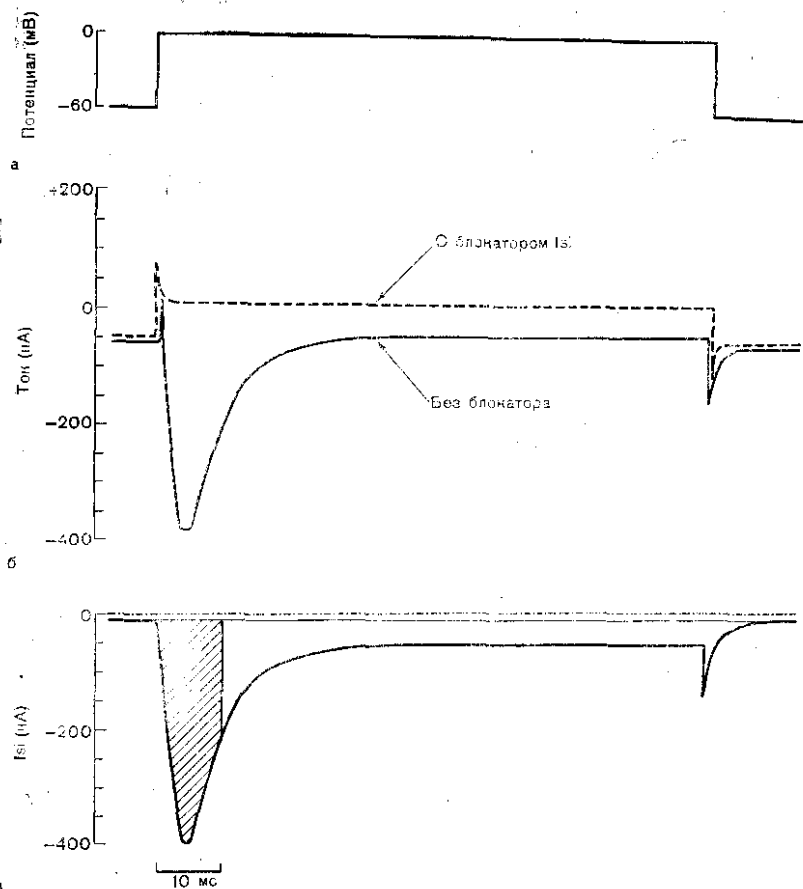


Рис. 11.2. Схематическое изображение быстрого и медленного компонентов медленного входящего тока, полученное на основании экспериментов, проведенных Marban, Tsien [43] и другими авторами, приведено (ссылки в тексте). В раствор добавляли тетродотоксин для блокирования быстрого входящего тока, волокна нагружали ионами Cs^+ для блокирования выходящего калиевого тока.

а — ступенчатая потенциала; б — ток в присутствии D-600 (пунктирная линия) и без него (сплошная линия). Обратите внимание, что форма емкостных токов, возникающих в начале и в конце ступенчатого потенциала, на рисунке уменьшены, чтобы они не искажали формы кривой медленного тока; в — разность между сплошной и пунктирной кривыми, характеризующая развитие медленного входящего тока во времени (I_{s1}). Заштрихована область, использовавшаяся для интегрирования быстрого начального компонента кальциевого тока. Такое интегрирование в течение первых 10 мс дает среднюю величину тока, составляющую 70% от максимального значения I_{s1} .

же варьируют от 15% в клетках желудочков сердца коровы [49] до 50% в клетках желудочков морской свинки [50]. С другой стороны, не получено никаких доказательств существования неинтегрирующегося медленного входящего тока в миокарде желудочков сердца морской свинки или кошки, в СА-узле кролика и в миокарде

де желудочков сердца крысы при воздействии кобальта [51, 52], D-600 [49, 53, 54] или верапамила [55].

Доля медленных каналов, которые остаются в неинактивированном состоянии при потенциале вблизи потенциала покоя вызывает еще больше споров. В одном исследовании [48] не было обнаружено неинактивирующегося тока при потенциале -40 мВ, в то время как в другом [50] при потенциале -60 мВ был зарегистрирован постоянный входящий ток, составляющий 20–25% от максимального.

Не весь ток, регистрируемый как медленный входящий ток, переносится ионами Ca^{2+} . Через медленные каналы проходят также ионы Na^+ и K^+ [44]. Долю медленного входящего тока, переносимую ионами Ca^{2+} , в экспериментах, описанных в [43], можно оценить, используя подход, предложенный в [44]. Если допустить, что в этом случае применимо уравнение постоянного поля, то можно рассчитать относительные проницаемости ионов, исходя из величин реверсного потенциала входящего тока при различных внеклеточных концентрациях ионов Ca^{2+} и из внутриклеточных и внеклеточных активностей ионов. Данные, приведенные в [43], достаточно хорошо аппроксимируются при отношении проницаемостей Ca^{2+} и Na^+ ($P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{Na}^+}$) около 100 и отношении $P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{K}^+}$ около 200. Эти отношения не зависят от потенциала [44], в то время как величина переносимого ионами Ca^{2+} тока зависит от потенциала вследствие того, что от потенциала зависит движущая сила. В этом случае при 0 мВ доля медленного входящего тока, переносимая ионами Ca^{2+} , составляет около 0,9 [переменная f_i в уравнении (11.1)].

Нам не удалось определить величину отношения площади поверхности к объему для проводящих сердечных миоцитов теленка. Однако для другого копытного, овцы, в литературе приведена величина $0,39 \times 10^7$ см²/л [56]. Эту величину мы и будем использовать в качестве значения отношения S/V в уравнении (11.1).

Отсутствуют также данные о доли объема клетки, в которую поступают ионы Ca^{2+} , поступающие через мембрану. В качестве первого приближения мы предположим, что из объема клетки нужно исключить объем митохондрий. Доля объема клетки, занимаемая митохондриями на основании данных для проведения сердечных миоцитов овцы, составляет 0,103 [56]. Таким образом, переменная f_v в уравнении (11.1) составляет 0,897.

Отсутствует также полная определенность в вопросе о том, какая часть ионов Ca^{2+} , поступающих с кальциевым током, может быть использована для активации соответствующего сокращения. Очевидно, что поздний компонент входящего кальциевого тока, соответствующий прохождению ионов через неинактивирующиеся медленные каналы, не может влиять на величину пика сокращения, так как этот компонент тока наблюдается уже после того, как сокращение достигло своего максимума. Трудно даже решить, какая часть ионов Ca^{2+} , входящих во время основного относительного быстрого всплеска кальциевого тока, используется для генерации максимума сокращения. Если предположить, как показано

на рис. 11.2 (заштрихованная область), что за развитие максимума сокращения ответственен ток, протекающий за первые 10 мс, то при интегрировании тока за эти первые 10 мс получим среднюю амплитуду тока, составляющую 70% от максимального кальциевого тока. Так как в экспериментах, описанных в [43], максимум кальциевого тока составлял $5 \cdot 10^{-6}$ А, величина $\int i dt$ в уравнении (11.1) будет равна $0,7 \times 5 \times 10^{-6}$.

Подставляя эти величины в уравнение (11.1), мы получаем скорость поступления Ca^{2+} в клетку:

$$d[\text{Ca}]_{\text{общ}}/dt = (0,70 \times 5 \times 10^{-6}) / (2 \times 9,65 \times 10^4) \\ \times 0,39 \times 10^7 \times (0,90/0,897) = 71 \times 10^{-6} \text{ М/с},$$

что дает увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{общ}}$ в миоплазме, равное 0,71 мкМ за первые 10 мс.

Если предположить, что генерация максимума сокращения определяется ионами Ca^{2+} , входящими за первые 20 мс, то, интегрируя от 0 до 20 мс, мы получаем, что средняя амплитуда тока составляет 50% от максимальной амплитуды. Так что в уравнении достаточно заменить 0,70 на 0,5 и мы получим:

$$d[\text{Ca}]_{\text{общ}}/dt = 51 \times 10^{-6} \text{ М/с},$$

что дает увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{общ}}$ в миоплазме, равное 1 мкМ за 20 мс. Учитывая имеющуюся информацию о внутриклеточных буферах ионов Ca^{2+} , такое повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{общ}}$ вызовет увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$, которое будет несомненно недостаточным для того, чтобы вызвать какую-либо прямую активацию миофибрилл.

Недавние исследования на одиночных кардиомиоцитах позволили рассчитать более высокое повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{общ}}$ во время потенциала действия. Причины получения таких более высоких величин неясны, хотя частично это можно объяснить тем, что наличие высокого последовательного сопротивления в многоклеточных препаратах приводит к завышенным оценкам величины медленного входящего тока [49]. Мы рассчитали увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{общ}}$, связанное с медленным входящим током, измеренным авторами работы [49] в изолированных одиночных клетках желудочка сердца взрослой крысы. Эти исследователи получили максимальную величину тока $2,8 \times 10^{-9}$ А при фиксации потенциала до 0 мВ, но они не рассчитали плотности тока (равной амплитуде тока, деленной на площадь поверхности клетки). Ее можно рассчитать следующим образом. Изолированный кардиомиоцит взрослой крысы имеет среднюю длину 93 мкм, ширину 19 мкм и толщину 11 мкм [13], что дает объем 194×10^{-12} л. Отношение площади поверхности к объему клеток желудочков сердца крысы составляет $0,44 \times 10^7 \text{ см}^2/\text{л}$ [57].

Тогда:

$$S = I/V \cdot V = 0,44 \times 10^7 \times 19,4 \times 10^{-12} = 8,54 \times 10^{-5} \text{ см}^2.$$

В этом случае максимальная величина тока составит:

$$I/S = 2,8 \times 10^{-9} / 8,54 \times 10^{-5} = 32,8 \times 10^{-6} \text{ А/см}^2,$$

Доля объема клетки, занятой митохондриями, в клетках желудочков сердца крысы составляет 0,34 [57]. Поэтому переменная f_v в уравнении (11.1) равна 0,66. Можно допустить также, что, как и в предыдущих расчетах, доля медленного входящего тока, переносимая ионами Ca^{2+} (переменная f_i), равна 0,90. Наконец, мы предположили, что кальциевый ток в исследовании, проведенном авторами работы [49], развивается во времени точно так же, как наблюдали авторы работы [43]. С одной стороны, можно ожидать, что развитие медленного входящего тока во времени в одиночных клетках будет быстрее, чем в многоклеточных препаратах, так как последовательное сопротивление в первом случае ниже. С другой стороны, временной ход, описанный в [43] для медленного входящего тока, является значительно более быстрым, чем полученный на других многоклеточных препаратах.

Подставляя эти величины в уравнение (11.1) и интегрируя ток за первые 10 мс, получаем, что скорость увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{общ}}$ равна 714×10^{-6} М/с, т. е. за первые 10 мс увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{общ}}$ составит 7,14 мкМ. Если проводить интегрирование за первые 10 мс, то увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{общ}}$ в миоплазме будет равно 10,2 мкМ. При таком изменении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{общ}}$ для выяснения достаточности входящего через сарколемму потока Ca^{2+} для частичной активации миофибрилл необходимы точные расчеты количества Ca^{2+} , связываемого внутри клетки буферными системами.

О результатах таких расчетов было сообщено другими исследователями, пришедшими к выводу, что такой вход Ca^{2+} недостаточен для прямой активации миофибрилл.

Даже наличие возможности некоторой прямой активации миофибрилл ионами Ca^{2+} , входящими во время кальциевого тока большой амплитуды, зарегистрированной в одиночных кардиомиоцитах, не доказывало бы, что такая активация действительно происходит. Как подчеркивалось ранее, СР способен изменить поступающий через сарколемму поток ионов Ca^{2+} до того, как он достигнет миофибрилл путем активного освобождения и аккумуляции Ca^{2+} . Механизм взаимодействия СР с быстрым и медленным компонентами кальциевого тока будет обсуждаться в одном из следующих разделов.

Натрий-кальциевый обмен

Для определения направления суммарного потока кальция через сарколемму в покое и во время освобождения Ca^{2+} из СР, как показано на рис. 11.3, необходимо критическое рассмотрение самой современной информации относительно $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$, $[\text{Na}^+]_{\text{своб}}$ и коэффициента сопряжения $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена. Для свободных ионов необходимо рассматривать их внутриклеточную активность. Перевод активности ионов в концентрацию осуществляется делением на коэффициент активности при 37 °С: 0,74 для Na^+ и 0,32 для Ca^{2+} [58]. Активность иона обозначается символом «а» с нижним индексом, обозначающим вид иона, и верхним индексом «о» для активности во внеклеточной среде или «i» — во внутриклеточ-

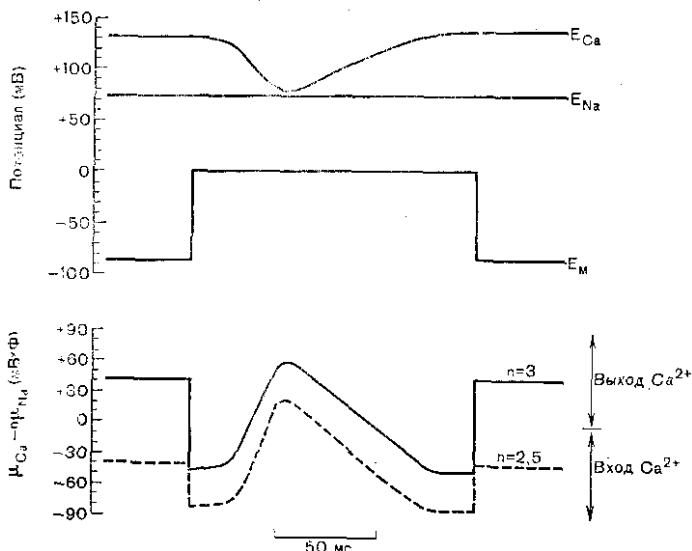


Рис. 11.3. Направление суммарного потока Ca^{2+} по механизму $Na^{+}-Ca^{2+}$ обмена при деполяризации в условиях фиксации потенциала до уровня критического потенциала и при потенциале покоя миокарда млекопитающих. Расчеты основаны на данных критического обзора литературы по вопросу внутриклеточных и внеклеточных активностей ионов Ca^{2+} и Na^{+} . Рассмотрены два крайних значения коэффициента сопряжения для $Na^{+}-Ca^{2+}$ -обмена; $n=3$ (сплошная линия) и $n=2,5$ (пунктирная линия).

E_M — трансмембранный потенциал; E_{Na} — равновесный Na^{+} -потенциал по Nernst; E_{Ca} — равновесный Ca^{2+} -потенциал по Nernst; Na — электрохимический градиент для ионов Na^{+} ; Ca — электрохимический градиент для ионов Ca^{2+} . Стрелки справа в нижней части рисунка указывают направление движения Ca^{2+} в процессе $Na^{+}-Ca^{2+}$ -обмена. Горизонтальная черта соответствует положению равновесия, когда $Na^{+}-Ca^{2+}$ -обмен не транспортирует ионы Na^{+} или Ca^{2+} .

ной жидкости. Мы приняли следующие величины для активности ионов:

$$a_{Na}^o = 115 \times 10^{-3} M; a_{Na}^i = 6,4 \times 10^{-3} M [59]; a_{Ca}^o = 0,58 \times 10^{-3} M;$$

в покое $a_{Ca}^i = 2,56 \times 10^{-6} M$ (из экспериментов, проведенных на скиннированных кардиомиоцитах) [13]; критический обзор данных для Ca^{2+} -селективных электродов [59—61] дает несколько более высокие величины, но потенциальные ошибки этого метода могут приводить к завышенным оценкам a_{Ca}^i . В гипотезе освобождения Ca^{2+} из СР поступление Ca^{2+} через сарколемму должно приводить к повышению a_{Ca}^i по крайней мере до $6,4 \times 10^{-3} M$ [13]. Максимальная активность Ca^{2+} , достигаемая во время освобождения Ca^{2+} из СР, должна составлять $1,28 \times 10^{-6} M$ [13]. В гипотезе прямой активации миофибрилл ионами Ca^{2+} , поступающими через сарколемму, входящий поток ионов должен вызывать увеличение a_{Ca}^i не менее чем до $1,28 \times 10^{-6} M$. Такая активность Ca^{2+} в миоплазме вызывает развитие максимального уровня напряжения, которого способны достигать интактные кардиомиоциты [13]. Это напряжение значительно меньше создаваемого при полной акти-

вадии миофибрилл, которое никогда не достигается в интактной клетке [13].

Электрический градиент для Na^+ ($\tilde{\mu}_{\text{Na}}$) рассчитывается согласно следующей формуле:

$$\tilde{\mu}_{\text{Na}} = zFE_M - RT \ln(a^0_{\text{Na}}/a^i_{\text{Na}}), \quad (11.2)$$

где: $\tilde{\mu}_{\text{Na}}$ — электрохимический градиент для Na^+ (мВ·Ф); R — газовая постоянная 8,3151 Дж/моль·К°; T — температура (°К); z — валентность; F — постоянная Фарадея ($9,65 \times 10^{10}$ К/моль); E_M — мембранный потенциал (мВ).

Уравнение Нернста позволяет рассчитать равновесный потенциал для Na^+ (E_{Na} , мВ):

$$E_{\text{Na}} = + (RT/zF) \cdot \ln(a^0_{\text{Na}}/a^i_{\text{Na}}), \quad (11.3)$$

что дает величину для E_{Na} +77 мВ. Тогда

$$\tilde{\mu}_{\text{Na}} = zF(E_M - E_{\text{Na}}), \quad (11.4)$$

где отрицательная величина для $\tilde{\mu}_{\text{Na}}$ означает, что градиент способствует движению Na^+ во входящем направлении. Предполагая $E_M = -85$ мВ в покое и 0 мВ во время деполяризации, можно рассчитать $\tilde{\mu}_{\text{Na}}$ в соответствующие интервалы сердечного цикла.

Аналогичные уравнения позволяют рассчитать E_{Ca} , который оказался равным +134 мВ в покое и +85 мВ во время освобождения Ca^{2+} , а также получить величину μ_{Ca} в покое, во время входа Ca^{2+} через сарколемму и во время освобождения Ca^{2+} из СР.

Энергия, которая может быть использована для транспорта ионов при $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмене, зависит от электрохимических градиентов ($\tilde{\mu}_{\text{Na}}$ и $\tilde{\mu}_{\text{Ca}}$) и коэффициента сопряжения (n) для Na^+ и Ca^{2+} в процессе транспорта. Коэффициент сопряжения все еще окончательно не установлен [62], однако допустимым кажется диапазон 2,5—3, т. е. 2,5—3,0 иона Na^+ переносятся на один ион Ca^{2+} [63]. Расчеты были соответственно проведены для этих двух крайних величин (см. рис. 11.3), однако коэффициент сопряжения, по-видимому, ближе к 3, чем к 2,5, так как величина 2,6 в работах [59, 63] была получена в предположении, что a^i_{Ca} выше, чем мы выбрали для своих расчетов. Снижение a^i_{Ca} до выбранного уровня увеличит коэффициент сопряжения до 2,7.

В условиях равновесия величины энергии, которые можно получить из электрохимических градиентов ионов $\tilde{\mu}_{\text{Na}}$ и $\tilde{\mu}_{\text{Ca}}$, равны, и ионы не транспортируются:

$$nzF(E_M - E_{\text{Na}}) = zF(E_M - E_{\text{Ca}}). \quad (11.5)$$

Это эквивалентно равенству:

$$n(E_M - E_{\text{Na}}) = 2(E_M - E_{\text{Ca}}).$$

Если градиент Na^+ , умноженный на n , больше по величине, чем градиент Ca^{2+} , то ионы Na^+ будут поступать в клетку по механизму $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена, обуславливая выведение Na^+ . Если больше величина градиента Ca^{2+} , тогда будет наблюдаться поступление Ca^{2+} , сопряженное с выведением Na^+ .

Эти расчеты показывают, что во время диастолы $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен будет вызывать либо поступление Ca^{2+} , если коэффициент сопряжения равен 2,5, или выведение Ca^{2+} , если коэффициент сопряжения равен 3. В действительности наиболее вероятно, что $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен находится примерно в равновесии без какого-либо значительного поступления или выведения Ca^{2+} [59, 63].

Для описания систолического движения Ca^{2+} по механизму $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена необходимо, во-первых, рассмотреть гипотезу освобождения Ca^{2+} из СР и, во-вторых, гипотезу прямой активации миофибрилл ионами Ca^{2+} , поступающими через сарколемму. В первом случае $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен будет вызывать дополнительное поступление Ca^{2+} во время начальной фазы трансмембранного входа Ca^{2+} , обусловленного кальциевым током. Скорость $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена, полученная в экспериментах на изолированных везикулах сарколеммы [64, 65], по-видимому, является достаточной, чтобы по механизму $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена в клетку успело поступить некоторое количество ионов Ca^{2+} приблизительно за те 20 мс между началом трансмембранного входа Ca^{2+} и моментом, когда освобождение Ca^{2+} из СР приведет к реверсии направления $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена. Можно предположить, однако, что количество ионов Ca^{2+} поступающее за это время по механизму $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена, мало по сравнению с переносимым кальциевым током, так как K_m для $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена высока [64]. Если в течение этого времени поступит значительное количество ионов Ca^{2+} , то возникающее в результате движение Na^+ в выходящем направлении до некоторой степени затруднит измерение кальциевого тока. Когда освобождение Ca^{2+} из СР достигнет максимума, обеспечивая активацию миофибрилл, $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен начинает работать в режиме выведения Ca^{2+} из клетки. И все же эта система будет эффективно работать только в случае, когда количество $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме все еще высоко, так как величина K_m большая: $1,5 \times 10^{-6}$ [64]. При низкой концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме во время диастолы выведение Ca^{2+} из клетки, по-видимому, осуществляется Ca^{2+} -насосом сарколеммы.

В случае гипотезы о том, что активация миофибрилл происходит непосредственно ионами Ca^{2+} , поступающими через мембрану [24], $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен и в этом случае будет двухфазным во время систолы. Он будет транспортировать ионы Ca^{2+} внутрь в начале развития трансмембранного поступления Ca^{2+} , пока уровень $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ низок, а затем ионы Ca^{2+} будут транспортироваться наружу, когда количество ионов Ca^{2+} , поступившее через сарколемму, станет достаточным для активации миофибрилл. Таким образом, даже в этом случае механизм $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена не будет во время ПД работать лишь в одном направлении, вводя ионы Ca^{2+} , как это предположил Mullins [66].

Кальциевый насос сарколеммы

Первое описание Ca^{2+} -АТФазы в сарколемме, чувствительной к концентрации свободного Ca^{2+} в микромолярном диапазоне, было сделано в обзоре [67]. Однако оставалось неясным, не обусловлена ли эта АТФазная активность сарколеммы примесями везикул СР в препарате сарколеммы [68]. Но в работах [69, 70] были представлены неопровержимые доказательства, что эта АТФаза действительно находится на сарколемме и что ее сродство к Ca^{2+} значительно более низко, чем для $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена с $K_m = 0,3 \times 10^{-6}$ М. Скорость транспорта также оказалась ниже таковой для $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена.

Таким образом, Ca^{2+} -насос сарколеммы вероятнее работает при концентрациях около диастолического уровня. Расчеты, приведенные на рис. 11.3, позволяют предположить, что при коэффициенте сопряжения 2,5 и при выбранной активности Ca^{2+} в покое $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен может работать во время диастолы в режиме введения Ca^{2+} в клетку. Следует повторить, что поступление Ca^{2+} во время диастолы, полученное при коэффициенте сопряжения, равном 2,5, является крайним маловероятным случаем. Однако вполне допустимо, что если в фазе диастолы и происходит какое-либо поступление Ca^{2+} по механизму $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена, то входящий Ca^{2+} может быть выведен Ca^{2+} -насосом сарколеммы.

Общее количество кальция, которое может быть выведено из кардиомиоцита Ca^{2+} -насосом сарколеммы во время одного сокращения и между двумя сокращениями, можно теоретически рассчитать, исходя из сродства насоса к Ca^{2+} , его максимальной скорости транспорта на 1 мг белка сарколеммы и концентрации его в сарколемме на 1 мг массы сырой ткани. Получаемое при этом изменение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме можно рассчитать, если разделить результат предыдущих вычислений на произведение содержания воды в ткани, выраженное в процентах к сырой массе, на количество внутриклеточной воды, выраженной в процентах от общего количества всей воды в ткани. Все еще остается очень много неясного в вопросе чистоты изолированных препаратов сарколеммы, и важное значение в настоящее время имеет соотношение доли везикул с правильной ориентацией мембраны к везикулам, у которых внутренняя сторона мембраны повернута наружу.

Если предположить, что такие расчеты допустимы, то можно количественно проверить справедливость гипотезы Langer [24] об направленном движении кальция через СР (выведение Ca^{2+}). Если такой путь действительно существует, то суммарный вход кальция за одно сокращение должен превышать его суммарное выведение Ca^{2+} -насосом и по механизму $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена на величину, равную количеству Ca^{2+} , выводимого этим специальным механизмом через СР. Однако в настоящее время количество Ca^{2+} , выводимого по механизму $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена и Ca^{2+} -насосом сарколеммы, неизвестно. Неизвестна также величина суммарного входа Ca^{2+} в кардиомиоциты за время одного сокращения; не все ясно относительно количества ионов Ca^{2+} , переносимых с кальциевым то-

ком, нет надежных данных о количестве ионов Ca^{2+} , поступающих по механизму $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена, и, кроме того, ничего не известно о пассивной утечке Ca^{2+} через мембрану по градиенту концентраций, которая, по-видимому, приводит к поступлению в клетку дополнительного количества Ca^{2+} во время периода покоя между сокращениями.

Для выяснения относительных вкладов различных путей поступления и выведения ионов Ca^{2+} через сарколемму было бы полезно иметь специфические фармакологические факторы, ингибирующие каждый из этих путей в отдельности. Блокаторы кальциевого тока, по-видимому, не влияют на $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен [71], но, с другой стороны, они могут изменять не только кальцевую, но и другие виды проводимости [46]. Изменение концентрации АТФ влияет не только на Ca^{2+} -насос, но также и на $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен [64]. Недавно появилось сообщение, что доксорубин, кардиотоксичный антибиотик, специфически блокирует $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен, однако, еще слишком рано подходить к этим результатам с критической оценкой [72].

В заключение отметим, что имеющиеся в настоящее время данные относительно количественных оценок поступления и выведения Ca^{2+} за одно сердечное сокращение не дает каких-либо убедительных оснований для признания роли СР в процессе электромеханического сопряжения в сердце или отрицания ее. Независимо от путей трансмембранного движения ионов Ca^{2+} по различным путям, когда бы они не были точно определены, и даже если движение Ca^{2+} по этим путям будет достаточным для объяснения активации или инактивации миофибрилл, это все равно не позволит исключить участие СР в этих процессах. Как подчеркивалось ранее, аккумуляция Ca^{2+} в СР и освобождение Ca^{2+} из него могут влиять на изменения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме, возникающие в результате движения Ca^{2+} через сарколемму до активации миофибрилл и после окончания активации. С другой стороны, результаты, полученные на субклеточных препаратах, доказывают существенные освобождения Ca^{2+} из СР и его аккумуляции при каждом цикле сокращения. В настоящее время вполне справедливо сомневаться в достоверности этих результатов вследствие того, что они получены на препаратах, где СР находится не в физиологических условиях. Хотя на изолированных везикулах СР из сердечной [73, 74] и скелетной [75] мышц удалось продемонстрировать освобождение Ca^{2+} из СР. Скорость освобождения Ca^{2+} , полученная в этих работах, была слишком низкой, чтобы прямо соответствовать соответствующему физиологическому явлению. Кроме того, для получения такого освобождения требовалась слишком высокая точка зрения физиологии концентрация свободного Ca^{2+} в миоплазме и слишком низкая — для Mg^{2+} . Именно поэтому и вопреки интересу, который вызывают данные, полученные на изолированных везикулах СР, предлагаемый обзор будет сконцентрирован на результатах, полученных на скринированных кардиомиоцитах. Прежде чем приступить к оценке аргументов в пользу механизма освобождения Ca^{2+} из СР и против него, которые могут быть под-

чены из этих результатов, следует критически рассмотреть метод, используемый для определения освобождения Ca^{2+} из СР скиннированных кардиомиоцитов.

ОЦЕНКА МЕТОДОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСВОБОЖДЕНИЯ КАЛЬЦИЯ ИЗ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА СКИННИРОВАННЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ

Величину освобождения Ca^{2+} из СР скиннированных кардиомиоцитов можно определить двумя способами: путем регистрации получаемого в результате повышения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме или путем регистрации уменьшения количества Ca^{2+} , связанного внутри СР. Кроме того, можно определять изменения распределения зарядов на мембране СР, которые сопровождают освобождение Ca^{2+} из СР, для чего используются красители, чувствительные к потенциалу.

Непрерывная регистрация изменений $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме осуществлялась при помощи четырех различных методов, основанных на: а) измерении механического напряжения, развиваемого миофибриллами, отражающего изменения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме; б) регистрации биолюминесценции акворина; в) использовании Ca^{2+} -селективных микроэлектродов; г) использовании арсеназо III. Определение изменений количества Ca^{2+} , связанного на внутренней поверхности СР, осуществляли путем регистрации флуоресценции кальций-хлортетрациклинового хелатного комплекса. Наконец, в экспериментах на скиннированных кардиомиоцитах использовали три потенциальнчувствительных красителя: мероцианин 540, мероцианин оксазолон (NK-2367) и di-S-C₃ (5).

Использование развиваемого миофибриллами механического напряжения в качестве датчика изменений концентрации свободных ионов кальция в миоплазме

Во всех экспериментах с использованием скиннированных кардиомиоцитов необходимо использовать этиленгликоль-бис (β -аминоэтилэфир) — N,N'-тетрауксусную кислоту (ЭГТА) для снижения уровня $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ (а при высоком $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ используется также АТФ). Для расчета состава этих растворов, содержащих большое количество различных металлов и лигандов, необходимо использование программы для компьютера [76].

Первый метод, применяемый для детектирования освобождения Ca^{2+} в скиннированных кардиомиоцитах, использовали при низких величинах $[\text{ЭГТА}]_{\text{общ}}$ [77]. Пример результатов, полученных при таком протоколе, показан на рис. 11.4, где приведены записи, полученные на скиннированных кардиомиоцитах предсердия кролика. Небольшое увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в большом объеме перфузионного раствора при низкой величине $[\text{ЭГТА}]_{\text{общ}}$ приводило к появлению циклических сокращений (рис. 11.4, а). Когда такое же увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ создавали при высоком значении $[\text{ЭГТА}]_{\text{общ}}$,

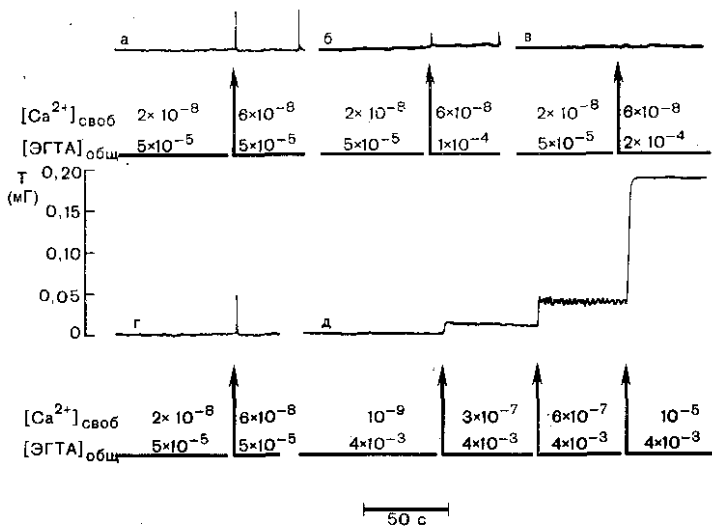


Рис. 11.4. Использование метода регистрации механического напряжения при низкой величине $[ЭГТА]_{общ}$ для демонстрации освобождения Ca^{2+} из СР скипнированных кардиомиоцитов. В экспериментах применяли скипнированные рованные кардиомиоциты предсердия кролика диаметром 5 мкм, длиной 25 мкм. $[Ca^{2+}]_{своб}$ рассчитывали, используя кажущуюся константу устойчивости комплекса Ca-ЭГТА, которая, как было установлено недавно, является преувеличенной [13]. В табл. IV, приведенной в [76], показано соответствие между величинами $[Ca^{2+}]_{своб}$, рассчитанными при использовании этой ошибочной кажущейся константы устойчивости, и величинами $[Ca^{2+}]_{своб}$, полученными с помощью константы, применяемой в данном случае. Величины $[Mg^{2+}]_{своб} = 3,16 \times 10^{-4}$ М; во время проведения этих экспериментов считали находящейся в физиологическом диапазоне концентраций. В настоящее время используют в 10 раз более высокую концентрацию свободных ионов Mg^{2+} [76]. Такое изменение $[Mg^{2+}]_{своб}$ привело лишь к более выраженному освобождению Ca^{2+} из СР [13]. Наконец, рН в этом эксперименте был равен 7,00 вместо 7,10, величины, применяемой в настоящее время [76]. И в этом случае повышение рН лишь усиливало освобождение Ca^{2+} из СР [79]. Ионная сила раствора составляла 160 мМ, температура 22°C. Стрелками отмечены моменты смены растворов.

а — в — наличие внутриклеточных запасников Ca^{2+} в скипнированных кардиомиоцитах (объяснение в тексте); г, д — доказательство существования вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} из СР (объяснение в тексте). Амплитуда фазического сокращения, вызванного небольшим повышением $[Ca^{2+}]_{своб}$ в присутствии низкого уровня $[ЭГТА]_{общ}$ (г), сравнивается с механическим напряжением, вызванным прямой активацией миофибрилл при различных содержаниях $[Ca^{2+}]_{своб}$ в присутствии высокой $[ЭГТА]_{общ}$ (д), что предотвращает существенные изменения $[Ca^{2+}]_{своб}$ в результате освобождения Ca^{2+} из СР (Воспроизведено из [15] с разрешения издательства.)

амплитуда циклических сокращений уменьшалась так, что они становились практически нерегистрируемыми (рис. 11.4, б, в). Это свидетельствует о конкуренции между ЭГТА и внутриклеточными кальциевыми запасниками за ионы Ca^{2+} . Так как эти данные были получены на предсердной ткани, клетки которой не имеют системы поперечных трубочек, то последние не могут быть резервуаром

Ca^{2+} . Эксперименты, в которых использовались ингибиторы и защитители митохондриального дыхания, позволяют исключить митохондрии из числа возможных запасников Ca^{2+} [77]. И наоборот, ингибирование способности СР активно аккумулировать и освобождать Ca^{2+} при обработке детергентами угнетает циклические сокращения. Таким образом, развитие этих циклических сокращений показывает, что СР является запасником Ca^{2+} в скиннированных кардиомиоцитах, из которого Ca^{2+} может освобождаться и который может вновь поглощать Ca^{2+} .

Следует подчеркнуть, что утверждение о расположении резервуара Ca^{2+} в СР является единственным выводом, который может быть сделан на основании этих циклических сокращений. Описанные эксперименты не позволяют выявить механизм освобождения Ca^{2+} из СР. Однако предположение о механизме освобождения Ca^{2+} можно сделать на основе экспериментов, показанных на рис. 11.4, г, д, которые будут обсуждены ниже. Именно вследствие этого принципа метода использования низких величин $[ЭГТА]_{общ}$, заключающегося в конкуренции между СР и $CaЭГТА$ -ферром, на основании $[Ca^{2+}]_{своб}$ в перфузионном растворе невозможно охарактеризовать значения $[Ca^{2+}]_{своб}$ в миоплазме между циклическими сокращениями или во время их развития [2, 77]. Вероятно, $[Ca^{2+}]_{своб}$ в миоплазме вблизи внешней поверхности СР будет ниже, чем в других участках миоплазмы, потому что СР связывает и активно поглощает Ca^{2+} .

Для того чтобы иметь возможность определить $[Ca^{2+}]_{своб}$ в миоплазме, был разработан метод использования высокого $[ЭГТА]_{общ}$ при индуцировании освобождения Ca^{2+} [1, 78]. Этот метод был применен на скиннированных кардиомиоцитах [15, 79], пример такого эксперимента показан на рис. 11.5. Так как используется высокая $[ЭГТА]_{общ}$, при освобождении Ca^{2+} не наблюдается никаких изменений механического напряжения при различных манипуляциях (рис. 11.5, а—г). Освобождение Ca^{2+} можно определить впоследствии путем оценки количества Ca^{2+} , остающегося в СР. Такую оценку получают при измерении амплитуды сокращения, вызываемой кофеином в присутствии низкого $[ЭГТА]_{общ}$ [15, 79]. На скиннированных кардиомиоцитах амплитуда сокращения, вызываемая кофеином, лучше воспроизводится в последующем опыте, чем площадь под кривой этого сокращения. Площадь под кривой сокращения использовалась в исследованиях скиннированных волокон скелетных мышц [1, 78] за счет другого выхода, так как амплитуда сокращения в этом случае обычно насыщается на уровне максимального механического напряжения, которое способны развивать миофибриллы. Таким образом, получение вызванной кофеином контрактуры с амплитудой меньше, чем в контроле (рис. 11.5, б, в по сравнению с а и г) свидетельствует о том, что во время экспериментальных манипуляций, произведенных на фоне высокого $[ЭГТА]_{общ}$, произошло освобождение Ca^{2+} . Большое различие с контролем (см. рис. 11.5, в по сравнению с б) указывает на освобождение большего количества Ca^{2+} . Для статистического анализа результатов, полученных на

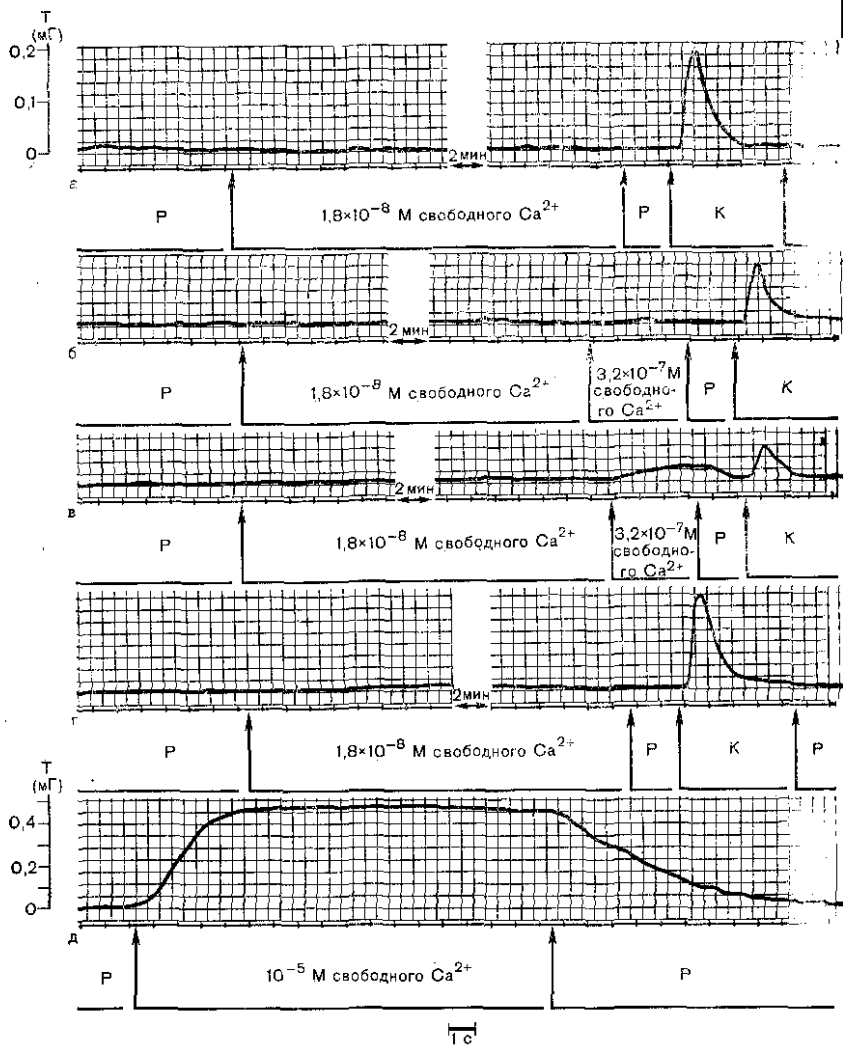


Рис. 11.5. Использование метода регистрации механического напряжения в присутствии высокой $[\text{ЭГТА}]_{\text{общ}}$ для демонстрации освобождения Ca^{2+} из СР. Эксперименты осуществляли на скиннированных кардиомиоцитах желудочка сердца взрослой крысы. Все растворы содержали ЭГТА в концентрации 4×10^{-3} М, за исключением раствора с кофеином (К). Общее содержание ЭГТА в растворе с кофеином составляло 2×10^{-4} М, концентрации свободных ионов Ca^{2+} равнялась 5×10^{-9} М, концентрация кофеина 10 мМ. Расслабляющий раствор (Р) содержал 10^{-8} М ионов Ca^{2+} в свободном состоянии. Остальные характеристики растворов и константы устойчивости те же, что и в экспериментах, описанных на рис. 11.4. Тоническое напряжение (Т) при кратковременной перфузии раствором, содержащим $3,2 \times 10^{-7}$ М Ca^{2+} (рис. в), связано с прямым действием ионов Ca^{2+} в такой $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ на миофибриллы. В начале каждого эксперимента клетки падали в расслабляющем растворе. Затем в течение около 2½ мин производили загрузку ионов Ca^{2+} в СР, причем концентрация свободных ионов Ca^{2+} в растворе составляла $1,8 \times 10^{-8}$ М, которая, как было показано, является

различных препаратах, амплитуда сокращения, вызываемого кофейном, может быть выражена в процентах к максимальному механическому напряжению, развиваемому при полной активации миофибрилл в присутствии высокого $[Ca^{2+}]_{общ}$ (см. рис. 11.5, д).

Этот метод дает лишь качественные результаты относительно количества освобождаемого Ca^{2+} , так как воздействие кофеина не вызывает освобождения всего Ca^{2+} , содержащегося в СР кардиомиоцитов [15]. Кроме того, кофеин увеличивает чувствительность миофибрилл к Ca^{2+} [2, 15, 80]. Если использовать достаточно высокую величину $[ЭГТА]_{общ}$ при работе с препаратами малого диаметра в присутствии сильного буфера рН, то при этом методе можно получить убедительные данные о том, что $[Ca^{2+}]_{своб}$ в миоплазме однородна во всем препарате и равна по величине $[Ca^{2+}]_{своб}$, установленной буфером Ca^{2+} в перфузионном растворе. Поэтому применение этого метода целесообразно для сравнительных исследований влияния различных воздействий на освобождение Ca^{2+} из СР [1, 79], хотя точные значения $[Ca^{2+}]_{своб}$ не являются строго физиологическими, поскольку основной принцип метода заключается в получении однородного распределения $[Ca^{2+}]_{своб}$ в миоплазме. В интактной клетке $[Ca^{2+}]_{своб}$ в миоплазме не является однородной и скорее всего она ниже на внешней поверхности СР, чем в других областях, как объяснялось ранее.

Прямая регистрация изменений концентрации свободных ионов кальция в миоплазме с помощью биолюминесценции акворина

Биолюминесценция акворина, одного из фосфобелков, в присутствии Ca^{2+} использовалась во многих экспериментальных системах для регистрации изменений $[Ca^{2+}]_{своб}$ [81, 82], включая скиннированные кардиомиоциты [13, 16]. Этот фосфобелок, по-видимому, не является токсичным для скиннированных кардиомиоцитов, по крайней мере в случае партий акворина, использованных для получения приводимых здесь результатов [13, 16] (другие коммер-

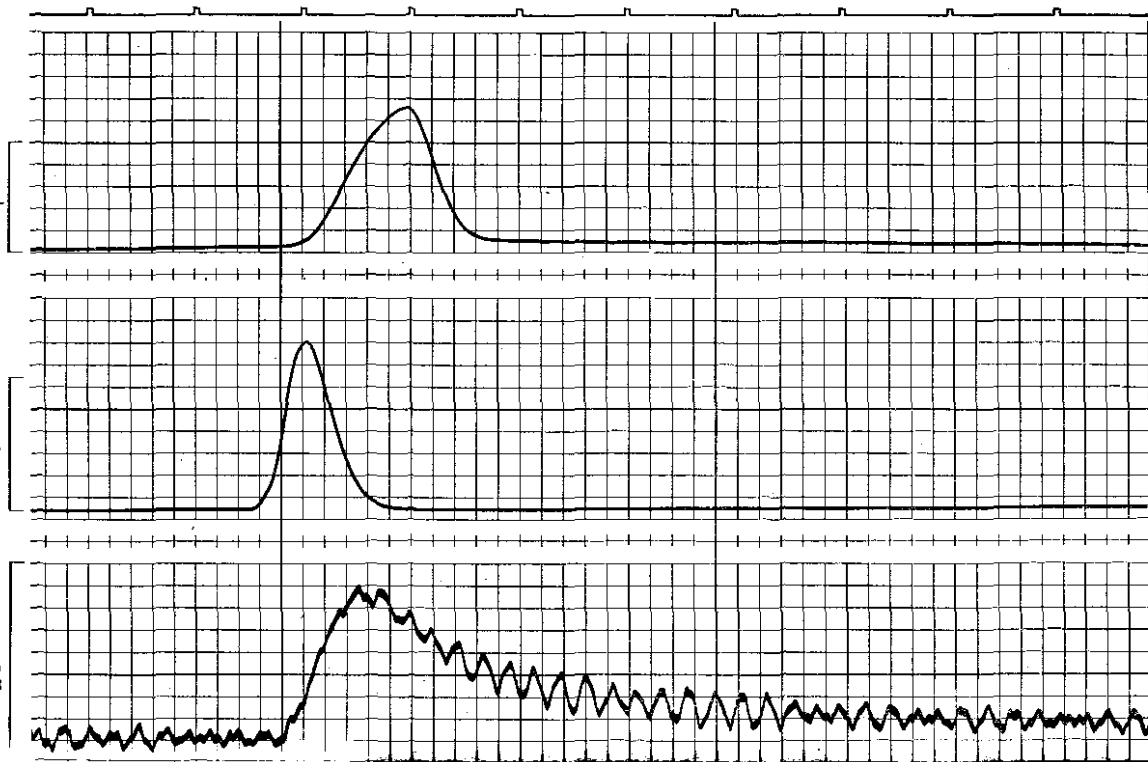
ципимальной для загрузки такого скиннированного препарата. Значение $[Ca^{2+}]_{своб}$ в «загружающем» растворе не дает никаких сведений о величине $[Ca^{2+}]_{своб}$ внутри полости СР. Затем подавали раствор с более высокой концентрацией $[Ca^{2+}]_{своб}$ (б, в), которая, как было показано ранее, вызывает освобождение Ca^{2+} из СР. На контрольных записях этот этап эксперимента пропускали (а, г). Такое освобождение Ca^{2+} не вызывает механической нагрузки в результате высокой концентрации $[ЭГТА]_{общ}$, за исключением случая, показанного на рис. в, что было объяснено выше. После воздействия высокого уровня $[Ca^{2+}]_{своб}$ в контроле после загрузки в течение 2 с клетку отмывали расслабляющим раствором. Каждый эксперимент заканчивался перфузией раствора, содержащего кофеин. Амплитуду контрактуры, вызываемой кофеином, использовали для оценки количества Ca^{2+} , остающегося в СР. Для статистического анализа результатов, полученных на разных препаратах, амплитуду вызванной кофеином контрактуры нормализовали в процентах от максимального механического напряжения, развиваемого при прямой активации миофибрилл (д). Обратите внимание, что калибровка напряжения на рис. е в 2 раза больше, чем на рис. а—д. По [15].

1 с

Механическое
напряжение
2
мг

Интенсивность
биолюминесцен-
ции акворина
4
нА

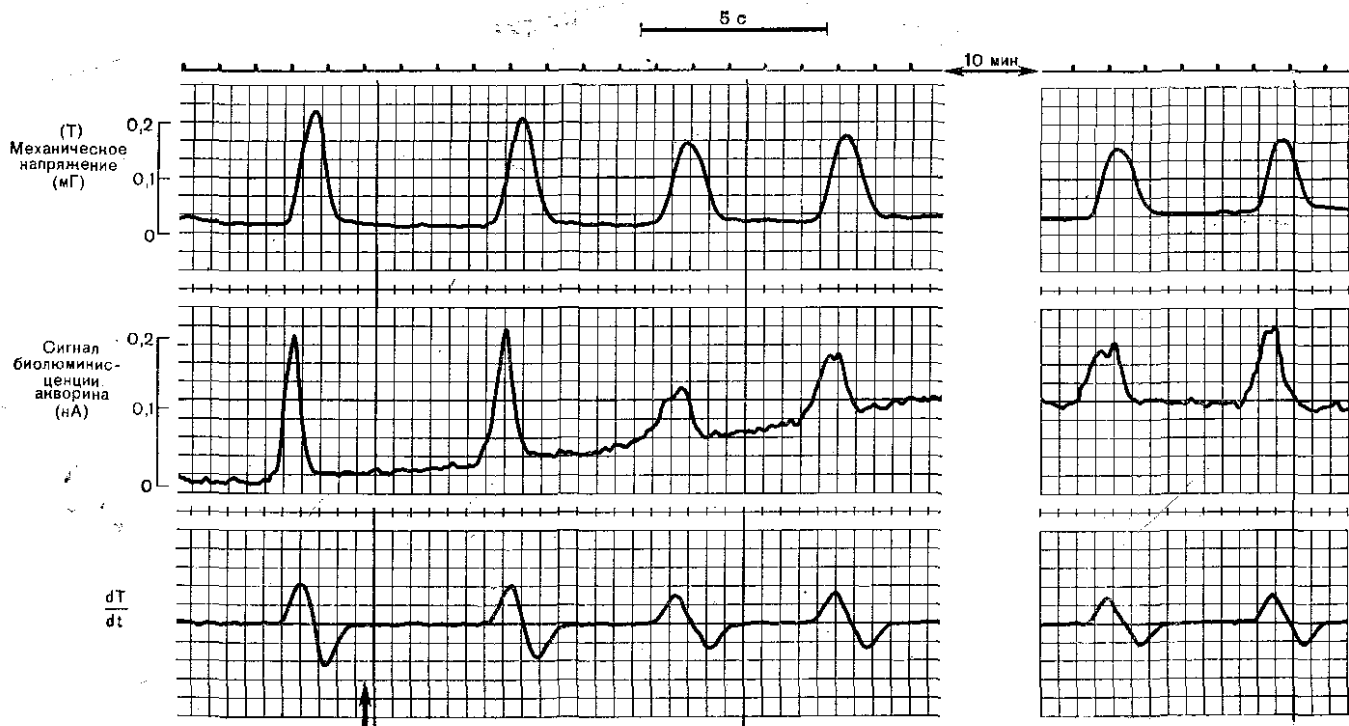
Сигнал
кальциевого
электрода
25
мВ



ческие партии акворина действительно являются кардиотоксичными, механизм такого действия изучается). То, что результатом реакции является биолюминесценция, делает этот сигнал нечувствительным к сокращению. Как будет объяснено ниже, это является огромным преимуществом данного метода по сравнению с другими, использующими иные способы оптической регистрации, в которых основной проблемой является преодоление механических артефактов. Сигнал люминесценции акворина предшествует развитию механического напряжения (рис. 11.6, 11.7).

Сигнал люминесценции акворина можно откалибровать в соответствии с величиной $[Ca^{2+}]_{своб}$ с помощью метода, предложенного первоначально в работе [82]. Это достигается путем создания в растворе концентрации свободного Ca^{2+} , равной 3,16 мМ, что полностью инактивирует весь акворин, содержащийся в скиннированной клетке. В результате наблюдается транзиторный всплеск биолюминесценции акворина большой амплитуды [13, рис. 12]. Во время такого высокоамплитудного всплеска микрокомпьютер вычисляет площадь под кривой и выводит ее на самописец со скоростью протяжки 1 см/с в виде прямоугольников, высота которых равна постоянной времени спада биолюминесценции акворина, измеренной в камере с быстрым перемешиванием раствора при поддержании ионного состава (особенно $[Mg^{2+}]$) и температуры в соответствии с основным экспериментом. В качестве первого приближения можно считать спад люминесценции чисто экспоненциальным. Хорошо известным свойством экспоненциальной функции является то, что точка пересечения кривой с осью ординат равна площади между кривой и двумя осями, деленной на постоянную времени. Поэтому длина прямоугольника, генерируемого компьютером, непосредственно равна максимальной амплитуде люминесценции, которая была бы получена при мгновенном смешивании избытка Ca^{2+} со всем количеством акворина, содержащимся в скиннированной клетке. Калибровочная кривая [82], полученная при

рис. 11.6. Освобождение Ca^{2+} из CP с помощью одновременной регистрации сигнала кальциевого селективного электрода, интенсивности биолюминесценции акворина и силы сокращения. Эксперимент ставили на проводящем кардиомиоците собаки, имеющем диаметр 21 мкм, толщину 12 мкм и длину 60 мкм. Ca^{2+} -селективный электрод с диаметром кончика 3 мкм вводили внутрь области, занятой миофибриллами, вдоль их оси. Индифферентный электрод помещали в раствор вблизи скиннированной клетки. Интенсивность биолюминесценции акворина регистрировали с помощью описанного ранее метода [13]. Раствор содержал 50 мМ ЭГТА; $3,12 \times 10^{-7}$ М свободных ионов Ca^{2+} ; $3,12 \times 10^{-3}$ М Mg^{2+} ; $1,0 \times 10^{-4}$ М Mg-АТФ; полная сила составляла 160 мМ; основные ионы: K^+ и Cl^- ; рН 7,10; буфер 30 мМ ТЭС; температура 22°C. При такой концентрации $[Ca^{2+}]_{своб}$ в препарате наблюдается циклическое освобождение Ca^{2+} , приводящее к циклическим сокращениям, амплитуда которых составляет приблизительно 10% от максимального механического напряжения. Концентрацию Mg-АТФ выбирали ниже физиологической, чтобы увеличить задержку между освобождением Ca^{2+} и возвращением. Использовали наиболее современные значения констант устойчивости [13].



быстром смешивании в кювете акворина и растворов с различными уровнями $[Ca^{2+}]_{своб}$ в условиях поддержания соответствующего ионного состава и температуры, может быть использована для определения величины $[Ca^{2+}]_{своб}$ в миоплазме, достигаемой во время освобождения Ca^{2+} из СР. Эта кривая представляет собой зависимость величины $-\log_{10}[Ca^{2+}]_{своб}$ (т. е. p_{Ca}) в миоплазме от величины $-\log_{10} L/L_{макс}$ (где L — амплитуда всплеска люминесценции акворина, $L_{макс}$ — максимальная величина излучения, рассчитанная компьютером) [13] (см. рис. 13).

Основная проблема, возникающая при использовании акворинового метода, состоит в том, что излучение некоторых ограниченных областей, где $[Ca^{2+}]_{своб}$ достигает высоких значений, может вносить непропорционально высокий вклад в суммарную люминесценцию вследствие стехиометрии связывания Ca^{2+} с акворином (2—3 иона Ca^{2+} на одну молекулу акворина) [81, 82]. Поэтому калибровка сигнала люминесценции в терминах $[Ca^{2+}]_{своб}$ может приводить к неверным результатам. Такое влияние может быть сведено к минимуму в скиннированных кардиомиоцитах благодаря тому, что акворин, по-видимому, однородно распределяется внутри всей клетки и, в частности, в решетке, образуемой миофибриллами. В интактных клетках акворин, по-видимому, распределяется в поверхностном слое по отношению к миофибриллам. И хотя нет никаких прямых доказательств, подтверждающих это предположение, приняв его, можно было бы объяснить, почему в скиннированных кардиомиоцитах наблюдаются сигналы значительно большей амплитуды, чем можно было бы ожидать на основании амплитуды сигналов, полученных на многоклеточных препаратах, и отношения соответствующих объемов жидкости, содержащей акворин [13]. Кроме того, по крайней мере в скиннированных кардиомио-

рис. 11.7. Влияние арсеназо III в концентрации 5×10^{-5} М на циклическое освобождение Ca^{2+} из СР, определяемое по сокращению препарата (шкала в миллиграммах) или по изменению интенсивности биолюминесценции акворина (шкала в наноамперах). Использовали скиннированный кардиомиоцит желудочка сердца взрослой крысы. Вначале препарат перфузировали раствором, содержащим $5,0 \times 10^{-5}$ М ЭГТА; $5,6 \times 10^{-7}$ М свободных ионов H^+ ; $3,2 \times 10^{-3}$ М свободных ионов Mg^{2+} ; $3,2 \times 10^{-3}$ М Mg-АТФ; рН 7,10; ионная сила 0,160 М; температура 22°C. Использовали самые современные значения констант устойчивости [13]. В момент времени, отмеченный стрелой, этот раствор заменяли раствором, имеющим тот же состав, но содержащим $5,0 \times 10^{-5}$ М арсеназо III. В более подробном объяснении, приведенном в другой работе [13], нулевой уровень интенсивности биолюминесценции акворина устанавливали до начала эксперимента введенным кончиком всех микрошпателей для инъекции акворина в поле зрения фотоумножителя. Поэтому смещение нулевой линии на записи биолюминесценции определяется физиологическими изменениями, а не простой сменой раствора. Растворы постоянно находятся в поле зрения фотоумножителя, и в момент, когда они обнаружат клетку, и тогда, когда они находятся в кончике перфузионной иглы. Были получены подробные данные, свидетельствующие о том, что уменьшение всплесков концентрации Ca^{2+} , детектируемых акворином и с помощью регистрации силы сокращения, не было вызвано снижением содержания $[Ca^{2+}]_{своб}$ вследствие связывания Ca^{2+} с арсеназо III. По [87].

цитах освобождение Ca^{2+} может происходить не только из терминальных цистерн, но и во всех других частях СР, тесно прилегающих к миофибриллам. Поэтому расстояние, на которое диффундируют ионы Ca^{2+} на своем пути от СР к миофибриллам, может быть очень коротким. Размеры молекулы акворина велики по сравнению с расстоянием между СР и миофибриллами. По этой причине биолюминесценция акворина может представлять собой интегральную картину изменений $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$, возникающих при многократных перемещениях ионов Ca^{2+} на очень короткое расстояние между СР и миофибриллами. Это могло бы объяснить поразительно хорошее соответствие, которое наблюдается, когда $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме, достигаемая во время освобождения Ca^{2+} , рассчитывается на основании калибровки всплесков люминесценции акворина и для сравнения на основании измерения механического напряжения, развиваемого миофибриллами и используемого в качестве меры изменений $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме [13]. И хотя аквориновый метод может дать надежную информацию о максимальных значениях $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме, достигаемых во время освобождения Ca^{2+} в скитнированных кардиомиоцитах, он, по-видимому, неприменим для определения уровня $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме в скитнированных кардиомиоцитах в состоянии покоя [13].

Измерение концентрации свободных ионов кальция в миоплазме с помощью кальций-селективных электродов

Уровень $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме в покое может быть точно измерен с помощью ион-селективных электродов. Комбинирование этого метода с использованием акворина могло бы быть полезным для точного определения амплитуды изменений $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$, происходящих во время освобождения Ca^{2+} . В этом случае появилась бы возможность точной интерпретации сигнала люминесценции акворина в покое. Это действительно необходимо для гарантирования точности калибровки амплитуды всплесков люминесценции акворина в терминах $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$. Кроме того, сигнал ион-селективных электродов измеряют с помощью предусилителя с высокоомным входом. Поэтому запись таких сигналов можно вести одновременно с регистрацией оптического сигнала. Это очень ценно для калибровки изменений $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ вместе с регистрацией биолюминесценции акворина. Как будет показано ниже, этот метод имеет еще большее значение для интерпретации предварительных результатов, полученных с красителями, чувствительными к потенциалу.

Ион-селективные электроды с диаметром кончика 2—5 мкм были изготовлены с использованием смеси ЕТН-1001, содержащей нейтральный лиганд [83]. Для того чтобы удержать нейтральный лиганд микроэлектрода, необходимо сделать стеклянный микроэлектрод гидрофобным (силанизация). Этого достигали, опуская кончики микроэлектродов в свежеприготовленный 10% раствор три-*n*-бутилхлорсилана (представленного фирмой «Columbia Organic Chemicals, Колумбия, шт. Южная Каролина, США) в кислой среде. После этого проводили реакцию силиконизации при температуре

200 °С в течение 1 ч. В кончик микроэлектрода всасывали столбик смолы ЕТН-1001 длиной не менее 5 мм. Остальную часть микроэлектрода заполняли раствором 100 мМ СаСl₂ через широкую часть для обеспечения электрического контакта с хлорированной серебряной проволокой. После выдерживания полностью заполненных электродов в течение нескольких часов их калибровали в последовательности растворов, содержащих буфер СаЭГТА с рСа 5,00—8,00 с шагом 0,5. Эти растворы содержали 140 мМ КСl, 10 мМ ЭГТА, 10 мМ N-трис(гидроксиметил)-метил-2-аминоэтан сульфоновую кислоту (ТЕС) при рН 7,40. Для расчета состава этих растворов использовали самые последние значения констант связывания [13] и компьютерную программу, о которой сообщалось ранее [76]. Использовали стандартные методы расчета активности, исходя из параметров калибровки [61, 85] (для более подробного ознакомления с расчетами). К моменту использования Са²⁺-селективные электроды имели сопротивление (2—9) × 10⁹ Ом.

Ион-селективные электроды вводили в скиннированные кардиомиоциты из волокон Пуркинье собаки. Введение осуществляли продольно по отношению к оси миофибрилл, чтобы быть уверенным, что кончик микроэлектрода находится в центре пучка миофибрилл и остается там во время сокращения. Волокна Пуркинье собаки были выбраны потому, что из этой ткани можно получить скиннированные кардиомиоциты более крупных размеров, так как исходные интактные клетки в этой ткани имеют больший диаметр, чем другие миокардиальные ткани млекопитающих. Кроме того, регистрация биоломинесценции акворина показала, что при транскрипторных увеличениях Са²⁺ в таких препаратах достигается более высокий уровень [Са²⁺]_{своб}, чем в скиннированных клетках рабочего миокарда желудочков собаки или других видов млекопитающих [16].

Регистрацию осуществляли с помощью предусилителя с входным сопротивлением 10¹³ Ом, на который подается разность потенциалов между ион-селективным микроэлектродом и индифферентным электродом, расположенными очень близко друг к другу. Индифферентный электрод заполняли тем же раствором, в котором находились и сами скиннированные кардиомиоциты. Раствор содержит ЭГТА в общем количестве 5 × 10⁻⁵ М; 8 × 10⁻⁸ М свободного Са²⁺; 3,16 × 10⁻³ М свободного Mg²⁺; 3,16 × 10⁻³ М Mg АТФ, общая молярность раствора составляла 0,160 М; рН 7,40 при использовании 30 мМ ТЕС в качестве буфера и t=22 °С. Сигнал Са²⁺-селективного электрода регистрировали одновременно с величиной механического напряжения и биоломинесценцией акворина (см. рис. 11.6). Все три сигнала пропускали через низкочастотный фильтр с частотой ниже 5 Гц, так что никакие задержки между ними не могли объясняться разной фильтрацией этих сигналов. Фильтрация с такой низкой частотой пропускания, как 5 Гц, была обусловлена частотной характеристикой датчика механического напряжения и, как было показано, не вызывает какого-либо уменьшения амплитуды всплесков биоломинесценции акворина в скиннированных кардиомиоцитах. Низкочастотный шум на регистраци-

ях сигнала Ca^{2+} -чувствительного электрода (см. рис. 11.6) был вызван близким расположением (менее 1 мм) кончика этого электрода и катода фотоумножителя.

Циклы освобождения Ca^{2+} индуцировали путем увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ с $8,00 \times 10^{-8}$ М до $3,12 \times 10^{-7}$ М. В этих оптимальных условиях (большой размер кончика пипетки и крупные скиннированные кардиомициты из ткани, в которой достигается высокий уровень $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме) появляется возможность с помощью Ca^{2+} -селективного электрода детектировать транзиторные повышения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ во время освобождения Ca^{2+} из СР (см. рис. 11.6). Пиковое значение повышения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$, регистрируемого Ca^{2+} -селективным электродом, достигается раньше, чем пик сокращения, и все же сигнал Ca^{2+} -селективного электрода задержан по отношению к сигналу акворина. Это свидетельствует о том, что этот метод еще не позволяет точно регистрировать скорость освобождения Ca^{2+} . При сравнении величин изменения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме, полученных на основании калибровки ион-селективного электрода и калибровки сигнала биолюминесценции акворина, обнаружилось, что при первом методе отмечаются более низкие значения. Опубликование этих данных в настоящее время кажется преждевременным, тем не менее они показывают, что использование ион-селективных электродов приводит к занижению изменений активности Ca^{2+} вследствие того, что реакция этих электродов слишком медленна, чтобы надежно отслеживать восходящую фазу транзиторного всплеска Ca^{2+} , как уже было предположено на основании задержки сигнала ион-селективного электрода по отношению к сигналу люминесценции акворина (см. рис. 11.6). Задержка реакции ион-селективного электрода была значительно больше во время нисходящей фазы, по-видимому, вследствие гистерезиса, наблюдавшегося ранее другими исследователями [85]: при уменьшении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ обычно отмечалась более медленная реакция, чем при увеличении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$.

Регистрация изменения концентрации свободных ионов кальция в миоплазме с помощью разностной спектроскопии при использовании арсеназо III

Арсеназо III является очень чувствительным датчиком изменений $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме в микромолярном и даже в наномолярном диапазоне [86]. Он был использован для обнаружения увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме, вызванном освобождением Ca^{2+} из СР в скиннированных кардиомиоцитах [87]. Применение разностной спектроскопии при длине волны 660 и 685 нм недостаточно для устранения артефакта механического движения, который значительно больше, чем Ca^{2+} -сигнал. Поэтому было необходимо использовать скиннированные кардиомиоциты, из которых был удален миозин путем воздействия раствора с высокой ионной силой [87]. В этих условиях получали хорошее отношение сигнала к шуму (см. рис. 11.9, в), однако, из-за короткой длины светового пути через такие очень тонкие скиннированные кардиомиоциты (менее

8 мкм толщиной) было невозможно откалибровать сигнал, полученный во время освобождения Ca^{2+} из СР, в величинах $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме.

Недостатки применения арсеназо III вместо акворина следующие: а) невозможность регистрировать сокращение одновременно с Ca^{2+} -сигналом, по крайней мере в скиннированных кардиомиоцитах. Однако это было доступно в значительно более крупных миоцитах морской утки [88]; б) в скиннированных кардиомиоцитах, по-видимому, невозможно откалибровать сигнал в величинах $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$, хотя это несомненно доступно в препаратах более крупных размеров [86, 88]; в) арсеназо III в концентрации 50 мкМ, которая необходима для получения удовлетворительного сигнала, угнетает способность СР активно аккумулировать и освобождать Ca^{2+} (см. рис. 11.7), но в то же время не влияет на чувствительность миофибрилл к Ca^{2+} [87]. Такое влияние наблюдалось только относительно СР миокарда, но не для других типов ткани [86, 88] и может быть обусловлено связыванием арсеназо III с СР миокарда, которое было описано в [89] на скелетной мышце кролика. По-видимому, связывание арсеназо III внутри клетка характерно только для некоторых типов тканей, так как Scarpa [86], являющийся наиболее опытным в использовании арсеназо III, обнаружил лишь незначительное связывание его с различными клеточными органеллами в большинстве тканей, включая мышцу морской утки [86, 88].

Регистрация изменений количества кальция, связанного на внутренней поверхности мембраны саркоплазматического ретикулума, путем мониторинга флюоресценции хлортетрациклина

Хлортетрациклин использовался для непрерывной регистрации количества Ca^{2+} , связанного с различными биологическими мембранами и мицеллами [90, 91]. Для устранения затруднений, обусловленных низкой проницаемостью хлортетрациклина через мембрану СР, прежде чем начинать освобождение Ca^{2+} из СР, его предварительно нагружали хелатным комплексом кальция с хлортетрациклином [92]. В этом случае изменения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ внутри полости СР, вызванные движением Ca^{2+} в СР и из него, вызывают изменение количества Ca^{2+} , связанного мембраной СР, в то время как хлортетрациклин остается захваченным внутри СР. Это в свою очередь приводит к изменениям количества хелатных комплексов кальция с тетрациклином, связанных на внутренней поверхности мембраны СР. Для устранения сокращений, вызывающих артефакты на записях флюоресценции, эксперименты необходимо было проводить либо в условиях высокой $[\text{ЭГТА}]_{\text{общ}}$ [92], либо на препаратах скиннированных кардиомиоцитов, из которых удаляли миозин [87]. Флюоресценцию хелатного комплекса кальция с хлортетрациклином можно отличить от флюоресценции хелатного комплекса магния с хлортетрациклином при использовании возбуждающего света с подходящей длиной волны (400 нм). Испус-

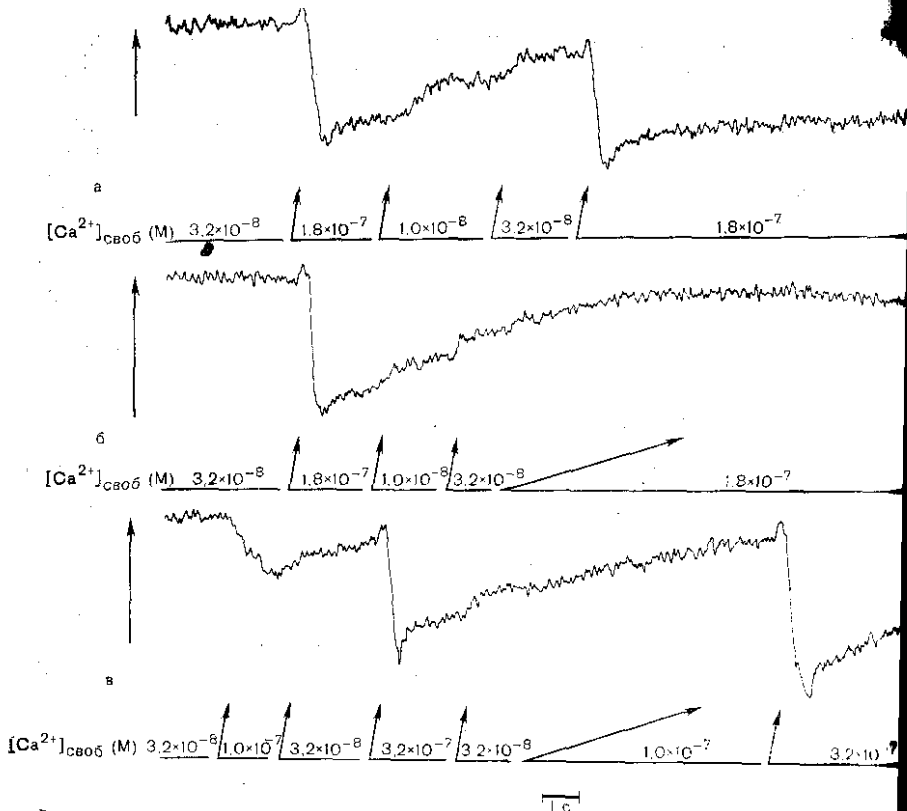


Рис. 11.8. Демонстрация освобождения Ca^{2+} из СР путем определения количества Ca^{2+} , связанного на внутренней поверхности мембраны СР, с помощью регистрации интенсивности флуоресценции хелатного комплекса Ca^{2+} -хлортетрациклин.

Стрелка, обозначенная буквой F слева от каждой записи, показывает направление увеличения интенсивности флуоресценции; размер стрелки соответствует 5% величины полной интенсивности флуоресценции, регистрируемой при перфузии препарата раствором, содержащим свободные ионы Ca^{2+} в концентрации $3,2 \times 10^{-8}$ М. Такое измерение проводили в самом начале эксперимента. Повышение интенсивности флуоресценции указывает на накопление Ca^{2+} в СР, а ее уменьшение — на освобождение Ca^{2+} . Стрелками под записями отмечены моменты смены растворов. Угол наклона этих стрелок показывает скорость замены одного раствора другим. Этот эксперимент проводили на трех различных сканированных кардиомиоцитах диаметр которых составлял 9–10 мкм, длина — 55–60 мкм. $[\text{ЭГТА}]_{\text{общ}} = 1,0 \times 10^{-4}$ М; $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{своб}} = 3,16 \times 10^{-4}$ М; $[\text{Mg-АТФ}] = 3,16 \times 10^{-3}$ М; рН 7,10; ионное насыщение $0,160$ М; температура 22°C . Использовали скорректированную константу устойчивости комплекса Ca-ЭГТА , ту же, что и в [13], но концентрация $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{своб}}$ был в порядок ниже, чем применяемая в настоящее время, а — воспроизводимость явления освобождения Ca^{2+} с последующим поглощением Ca^{2+} в СР. Однако обратное явление на постепенное смещение нулевой линии вследствие влияния различных факторов, объясняемого в тексте; б — одно и то же повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ вызывает освобождение Ca^{2+} из СР, если производится быстро (0,2 с), но вызывает поглощение Ca^{2+} в СР, если производится медленно (5,4 с, подробное объяснение в тексте) — вызванное освобождение Ca^{2+} может изменяться градуально в зависимости от уровня $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$, используемого в качестве триггера (сравните первое освобождение со вторым), а также в зависимости от уровня предзагрузки ионов Ca^{2+} в СР (сравните второе освобождение с третьим). Предзагрузку осуществляли путем постепенного увеличения содержания $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$. Таким образом, на рисунке продемонстрированы три фактора, определяющие градуальное изменение количества Ca^{2+} , освобождаемого в процессе вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} : 1) скорость изменения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ вне СР; 2) уровень $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$, используемый в качестве триггера; 3) степень предзагрузки ионов Ca^{2+} в СР. По [92].

каемое при флюоресценции излучение регистрировали при 530 нм. Ослабление флюоресценции указывает на освобождение Ca^{2+} из СР, в то время как ее усиление соответствует аккумуляции Ca^{2+} в СР (рис. 11.8).

Применение этого метода ограничивается следующими недостатками: а) невозможностью регистрировать сокращение одновременно с изменением концентрации Ca^{2+} ; б) результаты измерений не могут быть выражены количественно в терминах изменения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ внутри полости СР. Невозможно с уверенностью утверждать, что изменения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ внутри полости СР вызывают изменения содержания Ca^{2+} , связанного на внутренней поверхности мембраны СР, так как такой связанный Ca^{2+} , по-видимому, быстро уравнивается со свободным Ca^{2+} внутри полости СР, а связь между величиной $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ внутри полости СР и количеством Ca^{2+} , связанным на внутренней поверхности мембраны СР, до настоящего времени не известна и мало вероятно, что она является линейной [87]; в) эксперименты необходимо проводить за несколько секунд вследствие фотодинамического разрушения СР, вызываемого влиянием освещения на препарат в присутствии хлортетрациклина и способностью самого хлортетрациклина оказывать слабое ионофоретическое действие [92], кроме того, несмотря на низкую проницаемость мембран, происходит все же медленная уточка хлортетрациклина через них, что приводит к прогрессирующему сдвигу нулевой линии (см. рис. 11.8). Несмотря на эти недостатки, регистрация флюоресценции хлортетрациклина имеет исключительное значение, так как она является единственным методом, позволяющим непрерывно учитывать изменения содержания Ca^{2+} в СР, происходящие в противофазе с изменениями $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме, являющимися следствием освобождения Ca^{2+} из СР.

Регистрация изменений распределения зарядов на мембране саркоплазматического ретикулума с помощью потенциалчувствительных красителей

Для регистрации изменения мембранного потенциала в различных тканях и клеточных органеллах используется ряд красителей [93]. В скиннированных кардиомиоцитах применялись три потенциалчувствительных красителя: мероцианин 540 с измерением флюоресценции; мероцианин оксазолон (NK-2367) с измерением поглощения света и di-S-C₃ (5) с измерением как флюоресценции, так и поглощения [87, 94]. И в этом случае при оптических методах регистрации необходимо устранить сокращение, используя высокую $[\text{ЭГТА}]_{\text{общ}}$ или удаляя миозин из препарата. Это необходимо предпринять даже в случае, если препараты растянуты до такой длины саркомера, когда толстые и тонкие нити не перекрываются по крайней мере для препаратов клеток миокарда и скелетной мышцы толщиной 8—10 мкм [94]. По мнению авторов [95], наоборот, в скиннированных волокнах скелетной мышцы толщиной

70 мкм можно полностью устранить артефакты сокращения путем разностной схемы регистрации.

В первой серии экспериментов (рис. 11.9,а) было продемонстрировано, что изменение распределения зарядов на поверхности мембраны СР может быть в принципе зарегистрировано с помощью указанных красителей. Такие изменения обычно вызывали после того, как препарат уравнивался в течение более чем 10 мин в среде, где основным катионом был калий (K^+) и основным анионом — пропионат (P^-). Затем этот раствор быстро заменяли другим, содержащим в качестве основного катиона холин (Ch^+), а в качестве основного аниона хлор (Cl^-). Так как Ch^+ медленнее диффундирует внутрь СР, чем K^+ наружу, на внешней поверхности мембраны должно произойти транзитное увеличение концентрации катионов, а значит, и появление положительного заряда. Одновременно должно происходить транзитное увеличение концентрации анионов и, следовательно, появление отрицательного заряда на внутренней поверхности мембраны СР вследствие того, что Cl^- диффундирует быстрее в СР, чем P^- из него. Появление зарядов, обусловленных перераспределением анионов и катионов, приводит к тому, что наружная поверхность мембраны СР становится более положительной (или менее отрицательной) по отношению к внутренней поверхности. В дальнейшем это будет называться результирующим увеличением положительного заряда внешней поверхности мембраны СР. Смена растворов с K^+P^- на Ch^+Cl^- вызывает транзитное изменение поглощения или флуоресценции света (рис. 11.9), а при возвращении в исходный раствор регистрируемый сигнал также возвращается к исходному уровню (см. рис. 11.9, а).

Был опровергнут ряд возможных объяснений наблюдаемых сигналов артефактами измерений [94]: 1) показано, что появление сигнала связано с наличием красителя, так как он не наблюдался в отсутствие красителя; 2) сигнал не являлся особым признаком данного красителя или артефактом данного метода регистрации оптического сигнала, так как записи поглощения света и флуоресценции красителя, полученные при использовании трех различных красителей, показывали качественно один и тот же результат; 3) сигнал не являлся следствием артефакта механического сокращения, так как были устранены все возможности развития сокращения; 4) на сигнал не влияла поляризация света в пределах от 0° до 90° ; 5) сигнал был связан с наличием СР, так как в препаратах, в которых СР был разрушен вследствие обработки детергентом, не наблюдали никакого сигнала; 6) сигнал не был связан с изменением разности потенциалов на мембране митохондрий, так как во всем раствору добавляли 10 мМ азиды для диссипации мембранного потенциала митохондрий. Сравнительные эксперименты, поставленные на скиннированных волокнах быстрых скелетных мышц толщиной 10 мкм, которые практически не содержали митохондрий, также позволили исключить роль митохондрий в генерации транзитных сигналов; 7) сигнал не был вызван осмотическим действием изменения ионного состава на СР. Замена K^+P^-

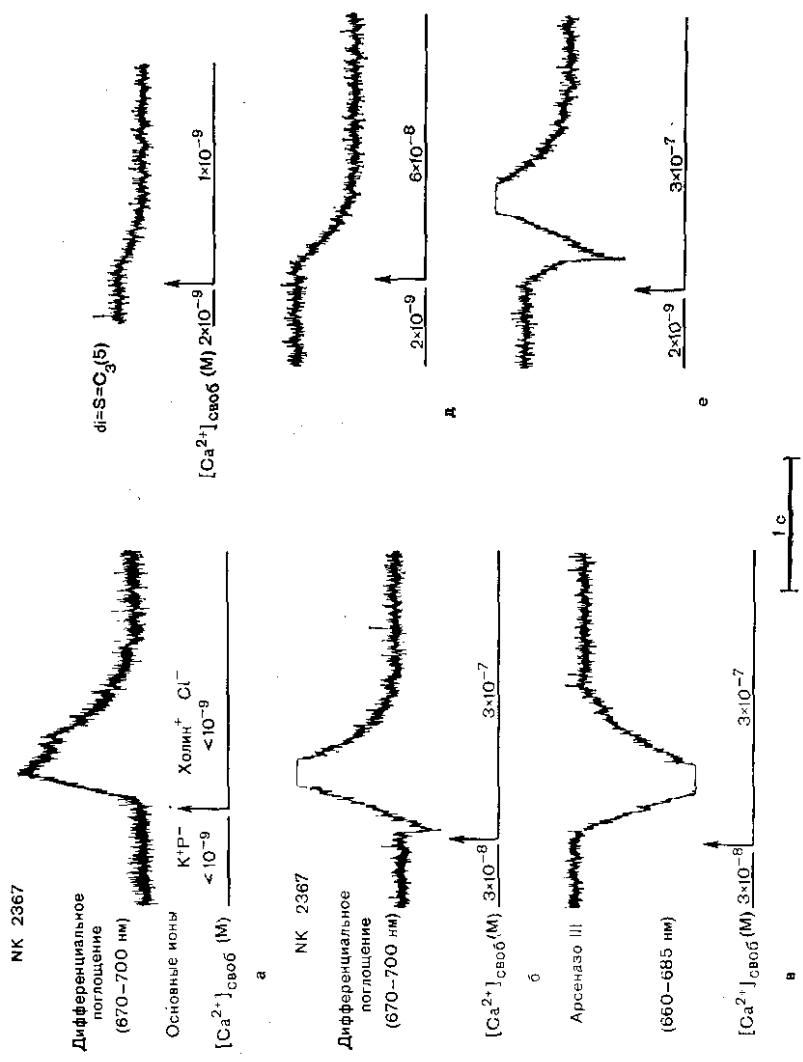


Рис. 11.9. Регистрация изменений распределения заряда на мембране SR окрасившихся кардиомиоцитов желудочка сердца взрослой крысы. Препараты окрашивали с помощью потенциалчувствительных красителей: NK 2367 (0,3 мг/мл) (а, б); di-S-C₃(5) (г-е). Для сравнения показаны также физические изменения количества [Ca²⁺]_{своб}, зарегистрированные с помощью арсеназо III (в). Все эксперименты проводили на разных клетках; диаметр ядра — 9–10 мкм, длина — 57–61 мкм; [ЭГТА]_{общ} = 4 × 10⁻⁴ М; [Mg²⁺]_{своб} = 3,2 × 10⁻³ М; (Mg-АТФ) = 3,2 × 10⁻³ М; рН 7,10; ионная сила раствора — 0,160 М; температура 22 °С. Использовали уточненные значения констант устойчивости [13]. Во всех случаях раствор содержал азид (1 × 10⁻² М) для диссипации мембранного потенциала митохондрий (см. [14]). Обратите внимание, что на рис. б, в, е величина сигнала превышала допустимый диапазон амплитуд регистрирующего устройства. По [87].

на K^+Cl^- и замена K^+P^- на Ch^+P^- вызывали появление односторонних сигналов, а именно в ту сторону, которая предполагалась при увеличении результирующего положительного заряда на внешней поверхности мембраны СР. Такие изменения ионного состава должны приводить к противоположному осмотическому действию: разбухание при замене K^+P^- на K^+Cl^- , сморщивание при замене K^+P^- на Ch^+P^- ; 8) причиной возникновения сигнала не было перемещение Ca^{2+} через мембрану СР, так как он наблюдался и тогда, когда СР не нагружен Ca^{2+} , а свободные ионы Ca^{2+} в растворе практически отсутствовали (см. рис. 11.9, а). Следует отметить, однако, что такие сигналы, вызванные изменением распределения зарядов на мембране СР, но не связанные с движением Ca^{2+} , не наблюдались в крупных препаратах скринированных волокон скелетной мышцы [95]. В таких препаратах необходимым условием регистрации сигналов при помощи метода, использованного в работе [95], является движение Ca^{2+} через мембрану СР [95].

Однако эти эксперименты не позволили окончательно решить, действительно ли сигналы, регистрируемые с помощью потенциалчувствительных красителей, соответствуют изменению трансмембранной разности потенциалов, а не изменению потенциала на поверхности мембраны [96, 97].

Во второй серии экспериментов было показано, что при аккумуляции Ca^{2+} наблюдался сигнал, свидетельствующий об уменьшении положительного заряда на внешней поверхности мембраны СР (рис. 11.9, г, д), в то время как при освобождении Ca^{2+} из СР регистрировали сигнал, соответствующий уменьшению положительного заряда (рис. 11, 9.5, б, е) [87, 94, 98]. Эти результаты будут обсуждаться в следующем разделе этой главы.

Основным недостатком экспериментов с потенциалчувствительными красителями является то, что они не подтверждают и не отвергают изменения разности потенциалов на мембране СР во время поглощения и освобождения Ca^{2+} . Кроме того, эксперименты невозможно проводить на сокращающемся препарате.

МЕХАНИЗМ ОСВОБОЖДЕНИЯ КАЛЬЦИЯ ИЗ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

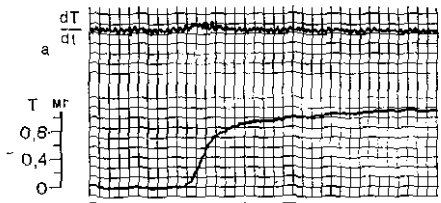
Доказательство вызванного кальцием освобождения кальция из саркоплазматического ретикулума сердечной мышцы

Гипотеза вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} первоначально была предложена для скелетной мышцы [99, 100]. Прямая проверка этой гипотезы была осуществлена в экспериментах на скринированных волокнах скелетной мышцы [101, 102], миокарда [103] и даже гладкой мышцы [104]. Для миокарда гипотеза заключается в том, что трансмембранный вход Ca^{2+} не активирует миофибриллы непосредственно, а вызывает освобождение Ca^{2+} из СР, который и активирует миофибриллы.

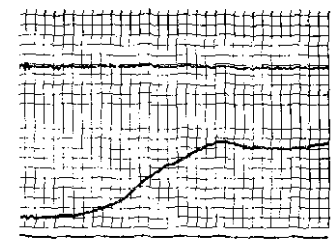
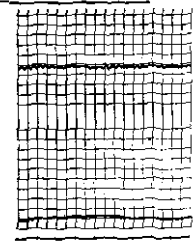
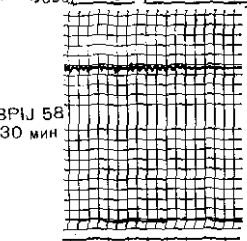
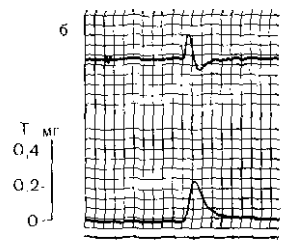
В скиннированных кардиомиоцитах, полученных из всех типов сердечной ткани взрослых млекопитающих, можно вызвать освобождение Ca^{2+} из СР при повышении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ до значительно более низкого уровня, чем необходимо для прямой активации миофибрилл. Это можно количественно продемонстрировать в экспериментах с использованием высокой $[\text{ЭГТА}]_{\text{общ}}$ и кофеина для детектирования освобождения Ca^{2+} , как было показано на рис. 11.5 [1, 15, 79]. В противоположность результатам, полученным на скиннированных волокнах скелетной мышцы [1, 78], высокая, по-видимому, физиологическая величина $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{своб}}$ (3,16 мМ) не угнетает освобождения Ca^{2+} в миокарде, а, наоборот, увеличивает количество освобождаемого Ca^{2+} [13, 105]. Повышение $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{своб}}$ приводит к увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$, необходимой для запуска освобождения Ca^{2+} , но также вызывает уменьшение чувствительности миофибрилл к Ca^{2+} . Следовательно, и при росте $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{своб}}$ величина $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$, необходимая для запуска вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} , остается значительно ниже необходимой для прямой активации миофибрилл [13, 105].

Однако эксперименты, осуществляемые в присутствии высокой $[\text{ЭГТА}]_{\text{общ}}$, создают в клетке условия, далекие от физиологических, хотя бы потому, что распределение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в клетке становится однородным. Кроме того, в концентрации свыше 1 мМ ЭГТА способна изменять распределение зарядов на мембране СР, что выявляется с помощью потенциалчувствительных красителей [16, 87, 94]. Эксперименты, проводимые при низкой $[\text{ЭГТА}]_{\text{общ}}$, демонстрируют вызванное Ca^{2+} освобождение Ca^{2+} в условиях, более приближенных к физиологическому буферу Ca^{2+} , имеющемуся в интактных клетках, как показано на рис. 11.4, г, д. К сожалению, такие эксперименты не позволяют определить величину $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$, необходимую для запуска освобождения Ca^{2+} .

Таким образом, в настоящее время невозможно представить количественную информацию о величине потока Ca^{2+} , необходимого для запуска освобождения Ca^{2+} , т. е. информацию, которую можно было бы сравнить измерениями входящего потока Ca^{2+} через сарколемму интактной клетки. Тем не менее результаты некоторых экспериментов позволяют предположить, что никакой трансмембранный вход Ca^{2+} независимо от его величины не способен активировать миофибриллы, если он сначала не запустит освобождение Ca^{2+} из СР. Такой эксперимент проиллюстрирован на рис. 11.10. В этом эксперименте проводилась оценка величины $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$, необходимой для развития механического напряжения, и скорости развития механического напряжения в одной и той же скиннированной клетке миокарда до разрушения СР и после его разрушения с помощью незаряженного детергента. Контрольные эксперименты показали, что детергент существенно не изменяет чувствительность миофибрилл к Ca^{2+} (рис. 11.10, а, в). Эксперименты проводили в присутствии низкой неизменной величины $[\text{ЭГТА}]_{\text{общ}}$, равной 5×10^{-5} М (рис. 11.10, б). Была выбрана самая толстая скиннированная клетка (14 мкм) из всех возможных, для того чтобы увеличить диффузионные задержки реакции на пода-



$[Ca^{2+}]_{своё}$ 10^{-9} 10^{-5}
 $[ЭГТА]_{общ}$ 4×10^{-3} 4×10^{-3}

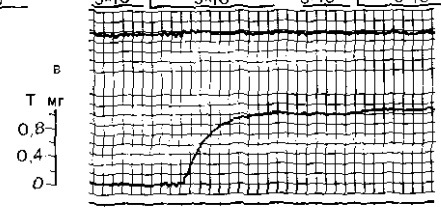


ВР1У 58
30 мин

$[Ca^{2+}]_{своё}$ 2×10^{-8} 4×10^{-8} 2×10^{-8} $3,2 \times 10^{-7}$
 $[ЭГТА]_{общ}$ 5×10^{-5} 5×10^{-5} 5×10^{-5} 5×10^{-5}

2×10^{-8} 4×10^{-8} 2×10^{-8} $3,2 \times 10^{-7}$
 5×10^{-5} 5×10^{-5} 5×10^{-5} 5×10^{-5}

2×10^{-8} 10^{-6}
 5×10^{-5} 5×10^{-5}



$[Ca^{2+}]_{своё}$ 10^{-9} 10^{-5}
 $[ЭГТА]_{общ}$ 4×10^{-3} 4×10^{-3}

иные извне растворы. Были получены следующие результаты: а) сокращение вызывается при значительно меньших величинах $[Ca^{2+}]_{своб}$ (или, что идентично, при более низком общем содержании кальция при той же величине $[ЭГТА]_{общ}$), когда в клетке сохраняется СР, чем после его разрушения; б) механическое напряжение, развивающееся в препарате с разрушенным СР, даже при более высокой $[Ca^{2+}]_{своб}$ имеет значительно меньшую скорость нарастания, чем когда СР в клетке не разрушен.

Так как эти данные получены при низкой величине $[ЭГТА]_{общ}$, они не позволяют точно определить величину $[Ca^{2+}]_{своб}$, необходимую для запуска освобождения Ca^{2+} . Тем не менее на основании этих данных можно предположить, что никакой трансмембранный вход Ca^{2+} любой величины не способен вызывать прямую активацию миофибрилл без запуска вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} из СР, если только СР скиннированных кардиомиоцитов не приобретает в результате нефизиологических экспериментальных условий новые свойства, которые отсутствуют у СР-интактных клеток.

Кальциевый «триггер» зависит не просто от изменения $[Ca^{2+}]_{своб}$ вблизи внешней поверхности СР (т. е. $d[Ca^{2+}]_{своб}$), но также и от скорости этого изменения: $d[Ca^{2+}]_{своб}/dt$. Поэтому

рис. 11.10. Сравнительные записи амплитуды механического напряжения и скорости его развития, вызванного повышением количества $[Ca^{2+}]_{своб}$, до и после разрушения СР. Эксперимент проводили на исключительно крупном скиннированном кардиомиоците желудочка сердца крысы (диаметр — 100 мкм, длина — 50 мкм). Такой крупный препарат был выбран для более наглядной демонстрации различия в скорости развития напряжения, обусловленного разрушением СР в препарате. В более мелких препаратах, шириной менее 10 мкм, обычно наблюдаются значительно меньшие диффузионные задержки при прямой активации миофибрилл ионами Ca^{2+} , находящимися в растворе без освобождения Ca^{2+} из СР. Записи приведены в порядке увеличения. Способность СР активно аккумулировать и освобождать Ca^{2+} в зависимости от воздействия 0,5% раствора нейтрального детергента — полиэтиленцетилаэфира 20 (Brij-58) в течение 30 мин. Обратите внимание, амплитудовка механического напряжения на рис. а и в в 2 раза больше, чем на рис. б. Стрелками отмечены моменты смены растворов.

— контроль отсутствия влияния детергента на чувствительность миофибрилл к Ca^{2+} , что ранее уже было показано [77]; б — непосредственно эксперимент, позволяющий сравнить сократительную активность до и после обработки препарата детергентом при постоянной концентрации ЭГТА в растворе ($5,10 \times 10^{-5}$ М). Если допустить, что процедура удаления клеточной мембраны и использование искусственных растворов для перфузии скиннированного кардиомиоцита не изменяют физиологических свойств СР, то данный эксперимент показывает, что поступление Ca^{2+} через мембрану независимо от его уровня не способно активировать миофибриллы, оно не вызовет предварительного освобождения Ca^{2+} из СР. Аналогичные эксперименты были проведены на скиннированных кардиомиоцитах желудочка сердца взрослых кроликов, у которых вызванное Ca^{2+} освобождение Ca^{2+} из СР имеет наибольшее значение среди всех других видов животных [15]. Даже на скиннированных кардиомиоцитах сердца кролика результаты качественно были аналогичны полученным на миокарде взрослой крысы, у которой вызванное Ca^{2+} освобождение Ca^{2+} выражено в наибольшей степени. Таким образом, вывод, сделанный в результате этих экспериментов, распространяется на сердечную ткань всех млекопитающих. Однако необходимо повторить, что вывод будет справедливым только в том случае, если скиннированные кардиомиоциты действительно находятся в физиологических условиях, но это нельзя утверждать со всей определенностью. По [15]: Т — механическое напряжение; dV/dt — производная механического напряжения по времени.

быстрое изменение $[Ca^{2+}]_{своб}$ вызывает освобождение Ca^{2+} из СР, в то время как медленное повышение $[Ca^{2+}]_{своб}$ приводит к загрузке ионов Ca^{2+} в СР (см. рис. 11.8, б). Таким образом, было предположено [92], что начальный относительно быстрый всплеск входа Ca^{2+} через сарколемму (см. рис. 11.2, заштрихованная область) может запускать освобождение Ca^{2+} из СР. Последующий более медленный компонент входящего потока Ca^{2+} , соответствующий прохождению тока через неинактивирующиеся кальциевые каналы (см. рис. 11.2), будет приводить к загрузке в СР Ca^{2+} калии, который освободится из него во время следующего сокращения [92].

Вызванное Ca^{2+} освобождение Ca^{2+} не происходит по принципу «все или ничего». Предложены три фактора, градуирующие этот процесс; уровень предзагрузки СР ионами Ca^{2+} , скорость изменения $[Ca^{2+}]_{своб}$ в миоплазме и уровень $[Ca^{2+}]_{своб}$, запускающий освобождение Ca^{2+} из СР (см. рис. 11.8). Зависимость количества освобождаемого из СР Ca^{2+} от величины $[Ca^{2+}]_{своб}$, запускающей процесс освобождения, наблюдалась в экспериментах, в которых освобождение Ca^{2+} детектировалось с помощью: а) транзиторных изменений механического напряжения препарата в присутствии низкой $[ЭГТА]_{общ}$ [77]; б) регистрации механического напряжения в присутствии высокой $[ЭГТА]_{общ}$ (см. рис. 11.5, б и в) в билюминесценции акворина [13]; г) флюоресценции хлоретрациклина (см. рис. 11.8). Такая тесная зависимость вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} от скорости и амплитуды изменения $[Ca^{2+}]_{своб}$ качественно согласуется с зависимостью величины сокращения желудочка сердца млекопитающих от трансмембранного кальциевого тока [28, 106, 107]. В случаях когда величина $[Ca^{2+}]_{своб}$ превышает оптимальную, количество освобождаемого из СР Ca^{2+} уменьшается, свидетельствуя об инактивации процесса освобождения Ca^{2+} , вызванной чрезмерным повышением $[Ca^{2+}]_{своб}$ с внешней стороны СР [13]. Эти данные также согласуются с наблюдением, что амплитуда сокращения интактного миокарда желудочка крысы уменьшается, когда внеклеточная $[Ca^{2+}]$ превышает некоторый оптимальный уровень [108, 109].

Сравнительные исследования, проведенные на различных видах животных, а также на одной и той же миокардиальной ткани находящейся на разных стадиях развития, выявили наличие хорошей корреляции между выраженностью вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} и малой длительностью плато потенциала действия [16]. В скиннированных клетках волокон Пуркинье собаки уровень $[Ca^{2+}]_{своб}$, необходимый для запуска освобождения Ca^{2+} , выше, чем в клетках рабочего миокарда желудочков, но достигается более высокое освобождение Ca^{2+} . Кроме того, в волокнах Пуркинье собаки миофибриллы менее чувствительны к Ca^{2+} , чем в рабочем миокарде желудочков сердца собаки или миокарде любых других взрослых особей млекопитающих [16].

Как было сказано выше, обнаружение циклических сокращений (см. рис. 11.4) непосредственно не является демонстрацией вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} ; тем не менее после того как

быстрое повышение $[Ca^{2+}]_{своб}$ в миоплазме вызывает освобождение Ca^{2+} , такое освобождение затем циклически повторяется. Ясно, что это явление не является физиологическим. Однако повторение циклов освобождения Ca^{2+} может быть прекращено, если $[Ca^{2+}]_{своб}$ в миоплазме понизить до той самой небольшой величины, которая использовалась для первого запуска освобождения Ca^{2+} (рис. 11.11, а по сравнению с б). Это позволяет предположить, что реаккумуляция Ca^{2+} в СР недостаточна для понижения $[Ca^{2+}]_{своб}$ в миоплазме до уровня, достаточно низкого для предотвращения повторных циклов освобождения Ca^{2+} . Таким образом, реаккумуляция Ca^{2+} в СР должна быть поддержана каким-либо другим процессом, который, по-видимому, происходит на сарколемме. Как обсуждалось в главе «Натрий-кальциевый обмен», этот процесс, по-видимому, не может сводиться только к $Na^+—Ca^{2+}$ -обмену, который работает в направлении выведения Ca^{2+} из клетки после того, как освобождение Ca^{2+} из СР вызывает повышение $[Ca^{2+}]_{своб}$ в миоплазме. В поддержании низкого уровня $[Ca^{2+}]_{своб}$ в миоплазме и предотвращении повторного запуска освобождения Ca^{2+} из СР во время диастолы существенную роль играет также Ca^{2+} -насос сарколеммы (см. «Сарколеммальный кальциевый насос»). Если справедлива гипотеза о том, что циклическому повторению вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} из СР препятствует выведение Ca^{2+} из клетки через сарколемму, то должна существовать возможность вызвать повторное освобождение Ca^{2+} в интактных препаратах путем ингибирования выведения Ca^{2+} через сарколемму. По-видимому, это происходит в условиях, вызывающих повышение $[Ca^{2+}]_{своб}$ в миоплазме. Например, следовые сокращения наблюдаются при интоксикации гликозидами [112, 113], когда может быть усилено выведение Ca^{2+} как по механизму $Na^+—Ca^{2+}$ -обмена, так и Ca^{2+} -насосом.

На вызванное Ca^{2+} освобождение Ca^{2+} влияет ряд факторов, которые, как известно, воздействуют на сокращение интактного миокарда. Многие виды фармакологических вмешательств или изменений ионного состава среды, увеличивающие аккумуляцию Ca^{2+} в СР, также облегчают освобождение Ca^{2+} . Следовательно, при этом нужны более низкие величины $[Ca^{2+}]_{своб}$, чтобы вызвать освобождение Ca^{2+} , и при измерении механического напряжения или биолюминесценции акворина наблюдается транзиторное повышение $[Ca^{2+}]_{своб}$ более высокой амплитуды. На рис. 11.11, в показан такой эффект при действии цАМФ. Для проведения этого эксперимента была выбрана скиннированная миокардиальная сетка желудочка сердца кролика, так как в скиннированных клетках этой ткани слабо проявляется вызванное Ca^{2+} освобождение Ca^{2+} , и скорость расслабления в контрольных условиях мала. Результаты экспериментов такого типа позволяют предположить существование взаимодействия между механизмом вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} и Ca^{2+} насосом СР [15, 74, 75, 79], исключением является действие Mg^{2+} , так как он усиливает аккумуляцию Ca^{2+} в СР и одновременно увеличивает величину $[Ca^{2+}]_{своб}$, необходимую для запуска освобождения Ca^{2+} . Таким образом, ги-

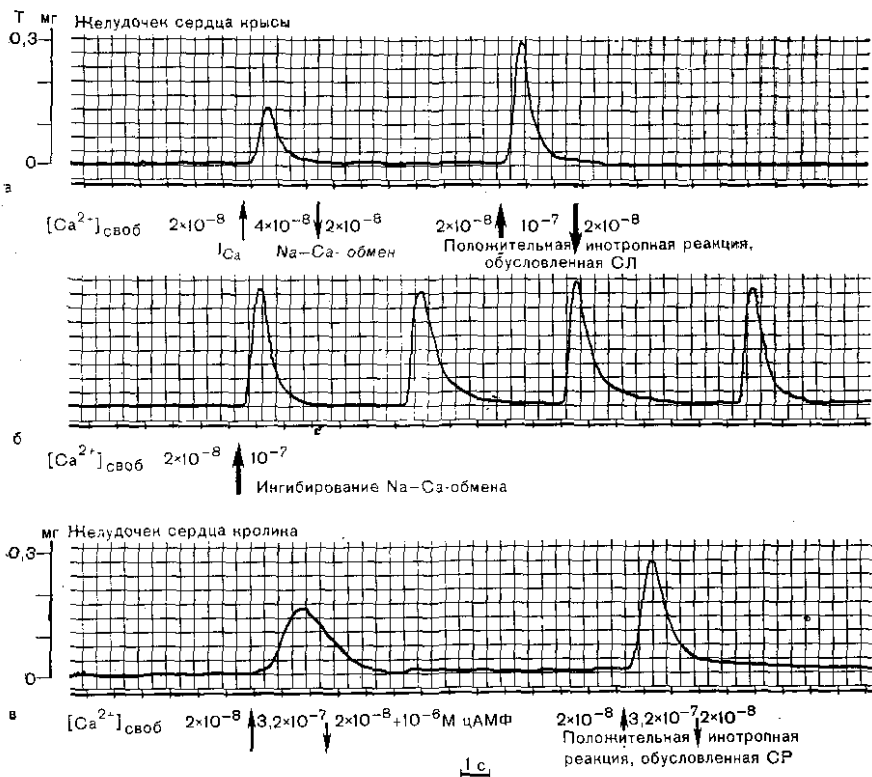


Рис. 11.11. Примеры экспериментов, результаты которых позволяют предположить, что свойства вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} из СР, наблюдаемого в скиннированных кардиомиоцитах, не противоречат известным характеристикам процесса электромеханического сопряжения.

а, б — скиннированный кардиомиоцит желудка сердца крысы (диаметр — 10 мкм, длина — 48 мкм); в — скиннированный кардиомиоцит желудка сердца кролика (диаметр 11 мкм, длина — 42 мкм); СЛ — сарколемма; СР — саркоплазматический ретикулум. Стрелками показаны моменты замены раствора. Величины $[Mg^{2+}]_{своб}$ pH и нажущей константы устойчивости комплекса Ca-ЭГТА те же, что и в экспериментах, показанных на рис. 11.4 и 11.5. Если сравнить первое и второе сокращение препарата на рис. а, то можно увидеть, что количество Ca^{2+} , освобождаемого в результате вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} из СР, увеличивается при повышении уровня $[Ca^{2+}]_{своб}$, используемого в качестве триггера. Такое градуальное увеличение освобождения Ca^{2+} из СР в физиологических условиях может быть вызвано усилением поступления Ca^{2+} через СЛ, например, при действии катехоламинов [114], или снижением выведения Ca^{2+} из клетки по механизму Na- Ca^{2+} -обмена, предложенного в качестве механизма положительного инотропного действия дигиталиса. Сравнение записей на рис. а и б показывает, что циклическое повторение вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} из СР можно предотвратить, удалив из перфузионного раствора такое количество Ca^{2+} , которое было необходимо добавить в раствор для запуска механизма освобождения Ca^{2+} . Это означает, что в процессе электромеханического сопряжения необходимо, чтобы имел место механизм удаления Ca^{2+} через сарколемму, способствующий поглощению Ca^{2+} в СР. При первоначальной публикации этих данных [15] считали, что Ca^{2+} -насос сарколеммы не способен обеспечить такое выведение Ca^{2+} из миоплазмы. Поэтому механизм восстановления низкой величины $[Ca^{2+}]_{своб}$ был отнесен на счет Na- Ca^{2+} -обмена. В действительности же оказалось, как уже обсуждалось в тексте, что хотя Na- Ca^{2+} -обмен и способствует удалению ионов Ca^{2+} из миоплазмы при максимальном освобождении Ca^{2+} из СР, наиболее вероятным механизмом поддержания низкого диастолического уровня $[Ca^{2+}]_{своб}$ в миокарде и предотвращения повторного запуска освобождения Ca^{2+} из СР является Ca^{2+} -насос. Поэтому аномальные условия, косвенным образом угнетающие механизмы удаления Ca^{2+} через сарколемму интактных миокардиальных клеток, должны привести к появлению повторяющихся циклов вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} из СР, обуславливающих осцилляторные коле-

гипотеза прямого участия механизма аккумуляции Ca^{2+} в процессе вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} , по-видимому, должна быть отвергнута (примечание 6). Одной из возможностей, предложенной в работе [110], является то, что связывание Ca^{2+} с высокоаффинными местами связывания на Ca^{2+} -насоса сарколеммы разрешает освобождение Ca^{2+} из СР.

Эксперименты с использованием потенциалчувствительных красителей [87, 94] могут стать первой проверкой гипотезы, предложенной в работе [110]. Когда освобождение Ca^{2+} вызывается увеличением $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в миоплазме, то сначала наблюдается небольшой короткий сигнал, свидетельствующий об уменьшении положительного заряда на внешней поверхности мембраны СР, и лишь затем регистрируется продолжительный сигнал высокой амплитуды, свидетельствующий об увеличении положительного заряда на внешней поверхности мембраны СР. Второй из этих сигналов соответствует освобождению Ca^{2+} из СР (см. рис. 11.9, б), в то время как первый гораздо быстрее всех сигналов того же направления, наблюдаемых во время аккумуляции Ca^{2+} . Это продемонстрировано в экспериментах, показанных на рис. 11.9 г—е. Для более ясной иллюстрации фазы аккумуляции Ca^{2+} скиннированную клетку перед началом каждой из этих регистраций помещали в среду с низкой $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$. Поэтому СР был пустым, и, когда $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в перфузионном растворе повышали, наблюдалась продолжительная фаза аккумуляции Ca^{2+} . Повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ до более высокого уровня приводило к появлению сигнала высокой амплитуды, свидетельствующего об уменьшении положительного заряда на внешней поверхности мембраны СР (см. рис. 11.9, г, д). Когда $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ достигает уровня, достаточного для запуска освобождения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$, за сигналом, соответствующим аккумуляции Ca^{2+} , следует в 50 раз более быстрый сигнал в том же направлении. За этим сигналом в свою очередь следует изменение полярности сигнала на все время освобождения Ca^{2+} и СР.

Было выдвинуто предположение [87, 94], что этот небольшой быстрый сигнал может быть первым признаком связывания Ca^{2+} с высокоаффинными местами связывания на Ca^{2+} -насосе, как предполагается согласно гипотезе, предложенной в [110]. Прежде чем появится возможность проверить эту гипотезу, необходимо

Влияние механического тонуса после основного сокращения, что наблюдается при интросикации дигиталисом [112, 113]. На рис. в показано, что цАМФ, одним из эффектов действия которого является прямое влияние на СР [114], вызывает увеличение количества освобождаемого Ca^{2+} и повышение скорости расслабления. Это является примером положительного инотропного эффекта, вызываемого действием фармакологического медиатора на СР. Такой эксперимент был проведен на скиннированном кардиомиоците желудочка кролика, в котором слабо выражено вызванное Ca^{2+} освобождение Ca^{2+} . В контроле без воздействия цАМФ также наблюдалась низкая скорость расслабления. Сравнение записей, приведенных на рис. в, а и б, показывает, что при добавлении цАМФ свойства СР скиннированного кардиомиоцита желудочка сердца кролика становятся аналогичными таковым для скиннированного кардиомиоцита желудочка сердца крысы, в котором вызванное Ca^{2+} освобождение Ca^{2+} выражено наиболее сильно по сравнению со всеми другими видами млекопитающих [15, 16]. По [15].

решить много экспериментальных проблем. Тот факт, что похожий сигнал, предшествующий освобождению Ca^{2+} , наблюдается при использовании хлортетрациклина (см. рис. 11.8) [87], позволяет предположить, что он соответствует некоторому событию, происходящему внутри СР. С другой стороны, можно также предположить, что хлортетрациклин и потенциалчувствительный краситель в действительности регистрируют один и тот же процесс трансмембранного перемещения ионов или же изменение распределения зарядов, или невыявленные конформационные изменения. Например, в работе [111] кратко упомянуто, что сигнал флюоресценции, регистрируемый при использовании хлортетрациклина, зависит от мембранного потенциала в аксоне кальмара. В случае СР миокарда на его мембране может вообще не быть никакого потенциала, но и хлортетрациклин, и все три потенциалчувствительных красителя могут регистрировать одно и то же изменение распределения зарядов, связанное с движением Ca^{2+} через мембрану СР. Однако контрольные эксперименты показали, что переключение ионного состава с K^+P^- на Ch^+Cl^- не приводит к возникновению какого-либо сигнала в скиннированных кардиомиоцитах, окрашенных хлортетрациклином (Fabiato, неопубликованные данные). Следует отметить, что, хотя такое переключение ионного состава и вызывает появление сигнала в присутствии потенциалчувствительных красителей, оно не приводит к освобождению Ca^{2+} из СР, даже когда СР перегружен ионами Ca^{2+} [2, 80, 123], в противоположность результатам, полученным на скиннированных волокнах скелетной мышцы [4].

Другая потенциальная проблема, связанная с экспериментом, показанном на рис. 11.9 б и г—е, заключается в том, что короткий сигнал в направлении уменьшения положительного заряда на внешней поверхности мембраны СР может соответствовать перераспределению красителя на мембране СР в начале освобождения Ca^{2+} . Такие осцилляции сигнала наблюдаются при использовании потенциалчувствительных красителей во время регистрации изменения трансмембранного потенциала в аксоне кальмара, когда препарат разрушается, например, при введении микроэлектрода. Таким образом, было бы интересно убедиться, что этот короткий сигнал в направлении уменьшения суммарного положительного потенциала на внешней поверхности мембраны СР действительно предшествует освобождению Ca^{2+} . Так как невозможно одновременно провести два оптических измерения, теоретически наилучшим подходом была бы регистрация $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ с помощью нон-селективных электродов. Именно поэтому мы провели исследования с одновременным использованием этих методов, которые проиллюстрированы на рис. 11.6. К сожалению, результаты указывают, что при регистрациях, осуществляемых с помощью нон-селективных электродов, получается слишком большая задержка, чтобы можно было ответить на вопрос, предшествует ли очень быстрый сигнал, регистрируемый с помощью потенциалчувствительного красителя, освобождению Ca^{2+} из СР.

Аргументы против вызванного кальцием освобождения кальция из саркоплазматического ретикулума сердечной мышцы

По-видимому, наиболее важным аргументом против гипотезы вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} из СР является отсутствие какого-либо приемлемого механизма для объяснения того, каким образом увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ около внешней поверхности мембраны СР вызывает освобождение Ca^{2+} из полости СР и почему это освобождение может градуально изменяться, а не развивается по принципу «все или ничего». Однако формулировка этой проблемы не содержит никаких неотразимых аргументов против этой гипотезы.

Существование такой проблемы непосредственно указывает на необходимость проведения большой работы для возможности тщательной проверки этой гипотезы.

Другой важный аргумент против признания физиологической роли вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} из СР состоит в том, что, как многократно упоминалось в этой главе, условия, далекие от физиологических, могут придать СР свойства, которыми не обладает СР в интактных клетках. Такие потенциально нефизиологические условия могут быть двух типов: структурные изменения и перфузионные растворы, которые не точно моделируют физиологическую внутриклеточную среду.

Среди других структурных изменений в скиннированных кардиомиоцитах наблюдается расширение СР [15, рис. 6]. Добавление в раствор 100 мМ сахарозы для уменьшения разбухания СР [115, 116] не угнетало вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} в скиннированных кардиомиоцитах, а, наоборот, способствовало его осуществлению [15]. В качестве альтернативного объяснения было предположено, что разбухание СР может быть пассивным и обуславливаться разбуханием миофибриллярной решетки, наблюдаемым в препаратах скиннированных волокон [117]. Усадка миофибриллярной решетки при добавлении в раствор поливинилпирролидона не изменяет вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} [15, 77].

Другая возможность заключается в том, что во время процедуры скиннирования могут быть удалены некоторые важные структуры, принимающие участие в электромеханическом сопряжении, такие, как контакты между сарколеммой и поверхностными цистернами СР [118]. Такая возможность была исследована путем сравнения результатов, полученных на одиночных скиннированных кардиомиоцитах, с полученными на группах кардиомиоцитов с разрушенной, но не удаленной сарколеммой. Некоторые результаты, полученные на препаратах с разрушенной сарколеммой из желудочка сердца лягушки, уже обсуждались в этой главе. Результаты, полученные на аналогичных препаратах из миокардиальной ткани млекопитающих, обсуждались ранее [16, 80, 123] и привели к выводу, что эти данные очень трудно интерпретировать. Тем не менее даже в таких препаратах фазические сокращения могут быть вызваны небольшим повышением $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в растворе [16, 80].

Несовершенство моделирования внутриклеточной среды обусловлено проблемами двух типов. Первые касаются ионного состава внутриклеточной среды. По мере расширения информации относительно внутриклеточных концентраций ионов мы изменяли растворы, используемые в экспериментах на скиннированных кардиомиоцитах [76]. Ингредиенты, не являющиеся физиологическим для внутриклеточной среды, такие, как глюкоза [8], которую использовали в ранних экспериментах [77], были удалены из растворов, в то время как в ряде экспериментов, в которых оценивали работу митохондрий, добавляли такие внутриклеточные метаболиты, как пируват и малат [76]. При получении результатов, о которых сообщалось выше, не применялось систематического добавления в растворы метаболитов и медиаторов, таких, как цАМФ-зависимая протеинкиназа и кальмодулин.

Повышение точности, с которой растворы, используемые для скиннированных кардиомиоцитов, воспроизводят внутриклеточную среду, становится очевидным, если сравнивать раздел описания методов в ряду последовательных публикаций. Такое повышение точности происходит медленно по двум причинам. Во-первых, очень долго выясняется состав внутриклеточной среды, концентрации метаболитов и медиаторов и константы устойчивости таких соединений, как кальмодулин, которые связывают Ca^{2+} . Во-вторых, после определения концентрации иона, метаболита или фармакологического медиатора необходимо еще тщательно изучить эффекты, возникающие при добавлении его в раствор, и его действие на свойства скиннированных кардиомиоцитов. Затем публикуются результаты сравнения данных, полученных без добавления нового компонента раствора, и данных с новым модифицированным раствором, так что результаты предыдущих экспериментов можно по-новому интерпретировать.

Примером такого медленного уточнения состава раствора является последовательное изменение рН буфера, применяемого в экспериментах. Первоначально [103] использовали имидазол, потому что этот рН-буфер применяли большинство исследователей в экспериментах на скиннированных волокнах скелетной мышцы [104]. Затем было выяснено, что имидазол, являясь стимулятором фосфодиэстеразы, угнетает сокращение, вызываемое освобождением Ca^{2+} из СР [119]. Поэтому имидазол заменили трис-(гидроксиметил)-аминоэтаном (трис), который был тщательно проверен автором работы [102] на отсутствие нежелательных эффектов при действии на скиннированные волокна скелетной мышцы. Однако трис является плохим буфером при рН около 7,0. Эта проблема стала ключевой, когда стали применять метод Эндо [1, 78] с использованием высокой $[\text{ЭГТА}]_{\text{общ}}$ для запуска освобождения Ca^{2+} . Освобождение Ca^{2+} из СР приводит к вытеснению H^+ из ЭГТА. Возникающее в результате уменьшение рН приводит к снижению кажущейся константы устойчивости комплекса СаЭГТА. Поэтому эффективная Ca^{2+} буферная емкость комплекса СаЭГТА существенно снижается во время освобождения Ca^{2+} . Поэтому, когда этот метод начал применяться на скиннирован-

ных кардиомиоцитах, возникла необходимость вновь вернуться к использованию имидазола, особенно при изучении эффекта понижения рН; однако контрольные опыты в экспериментах, проводимых при кислых рН, осуществляли при использовании (бис[2-гидроксиэтил]амино)-трис(гидроксиметил)метана (бис-трис, рK_a 6,46). В дальнейшем было показано [120], что TES не оказывает никаких нежелательных действий на скиннированных волокнах скелетной мышцы и в то же время имеет более высокую буферную емкость при физиологических рН по сравнению с трис. Поэтому в последующих экспериментах на скиннированных кардиомиоцитах использовали TES [13, 16, 76, 87, 92, 94]. Это было целесообразно, так как к этому времени было установлено, что в физиологических условиях внутриклеточный рН, по-видимому, немного более щелочной, чем 7,0 [76]; однако TES имеет слишком щелочной рK_a (7,44 при 22 °C), чтобы быть идеальным буфером. Позднее тщательные тесты, осуществленные А. Fabiato и Дж. К. Кенгшем в Отделе физиологии Лидского Университета (личное сообщение, 1980), показали, что N,N-бис(2-гидроксиэтил)-2-аминоэтан сульфоновая кислота (BES) с рK_a 7,14 не вызывает токсического действия на скиннированные кардиомиоциты. Поэтому в будущих экспериментах на таких препаратах рекомендуется использовать BES в качестве буфера.

Итак, заканчивая обсуждение вопроса о последовательных коррекциях искусственной внутриклеточной среды, следует отметить, что ни одна из таких коррекций не приводила к угнетению вызванного Ca²⁺ освобождения Ca²⁺ из CP, в то время как некоторые из них усиливают освобождение Ca²⁺. Однако, несомненно, следует провести еще много коррекций.

К этим аргументам против гипотезы вызванного Ca²⁺ освобождения Ca²⁺ из CP в работе [10] добавлено ряд других, заслуживающих пристального рассмотрения, поскольку они привели автора этой работы к твердой уверенности в том, что гипотеза должна быть отвергнута. Прежде чем подробно рассматривать эти аргументы, необходимо отметить, что они составляют лишь малую часть этой блестящей работы, которая представляет собой, по-видимому, наиболее полный современный обзор по электрохимическому сопряжению в миокарде.

При оценке метода с использованием низкой величины [ЭГТА]_{общ} [10] Шарпан счел загадочным, что поддерживаемый уровень механического напряжения в присутствии низкой [ЭГТА]_{общ} ниже, чем в присутствии высокой [ЭГТА]_{общ}. В действительности в этом и заключается сущность метода, так как этот факт свидетельствует о конкуренции между Ca²⁺-запасником внутри клетки и CaЭГТА-буфером, как это было тщательно описано в статье, которую Шарпан обсуждал [77]. Он справедливо подчеркивает, что [Ca²⁺]_{своб} в растворе, содержащем низкую [ЭГТА]_{общ}, не позволяет судить о величине [Ca²⁺]_{своб} вблизи поверхности CP. Но именно это и утверждалось во всех статьях, авторы которых использовали этот метод [2, 3, 77]. Как подробно объяснялось в литературных источниках [2, 13, 15], аргументы,

используемые для демонстрации вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} , совершенно не используют реальные величины $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ вблизи СР. Один из таких аргументов проиллюстрирован на экспериментальной записи, приведенной на рис. 11.10. И хотя Шарпан, по-видимому, предпочитает метод, в котором применяется высокая $[\text{ЭГТА}]_{\text{общ}}$ и кофеин [10] для демонстрации освобождения Ca^{2+} , он не обсуждает результаты, полученные этим методом на скиннированных кардиомиоцитах, о которых сообщалось в статьях, рассматриваемых в его обзоре.

Шарпан справедливо подчеркивает, что имидазол оказывает угнетающее действие на СР сердца [119], тем не менее он не точен, пытаясь использовать этот факт в качестве аргумента [10], позволяющего отвергнуть результаты, полученные в работе [77], в которой имидазол не использовался в качестве буфера рН, и в то же время не критикуя другого исследования [121], в котором концентрация имидазола была не только очень высока, но и изменялась для коррекции ионной силы при различных величинах $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$. Так как имидазол лишь частично ионизован, необходимы большие изменения его концентрации для компенсации относительно небольших изменений ионной силы.

Даже если все перечисленные выше аргументы, приведенные Шарпаном против гипотезы вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} , и не являются доказательными, в обзоре, сделанном им, выдвигается еще один очень интересный довод: гипотеза должна быть отвергнута для СР сердца потому, что Endo [102], первым выдвинувший эту гипотезу для скелетной мышцы, в настоящее время сам отказался от нее [1]. И действительно сходство между сердечной и скелетной мышцами позволяет предположить, что процесс, происходящий в одной из тканей, по-видимому, не может отсутствовать в другой. Поэтому одним из наиболее продуктивных путей к изучению физиологии сердечной мышцы является расширение на этот тип мышц выводов, сделанных на основании экспериментов на волокнах скелетной мышцы, как это очень хорошо объяснил Шарпан [10].

Однако не менее продуктивным может быть использование противоположного подхода, по крайней мере относительно процесса электромеханического сопряжения. Механизм такого сопряжения в сердечной мышце может быть более простым, более рудиментарным, чем в скелетной мышце, потому что путь диффузии Ca^{2+} в кардиомиоцитах короче. В результате этого была разработана следующая рабочая гипотеза [16, 87, 122]: сложный механизм электромеханического сопряжения может возрасти с увеличением диаметра поперечнополосатой мышечной клетки. Наиболее простым этот процесс будет в клетках желудочка сердца лягушки, диаметр которых находится в пределах 3—5 мкм, что позволяет входящим через сарколемму ионам Ca^{2+} прямо активировать миофибриллы. В миокардиальных клетках млекопитающих, которые имеют в 5 раз больший диаметр, чем миокардиальные клетки лягушки, трансмембранный вход Ca^{2+} может усиливаться с помощью вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} из СР

В волокнах скелетной мышцы, диаметр которых в 5 раз больше диаметра миокардиальных клеток млекопитающих, вызванному Ca^{2+} освобождению Ca^{2+} будет предшествовать некоторый неизвестный пока процесс.

Вероятно, в этом процессе принимают участие поперечные трубочки, но не внеклеточные ионы Ca^{2+} [100].

Эта рабочая гипотеза привела к пересмотру аргументов против вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} в скиннированных волокнах скелетной мышцы, основанному на опыте, полученном при исследовании скиннированных миокардиальных клеток, в которых легче продемонстрировать вызванное Ca^{2+} освобождение Ca^{2+} [1, 2]. Как было сказано ранее, эксперименты на скиннированных миокардиальных клетках показали, что запуск освобождения Ca^{2+} при повышении $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ зависит от скорости изменения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ вблизи внешней поверхности СР. В скиннированных волокнах скелетной мышцы, имеющих диаметр приблизительно 100 мкм, изменения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ происходят исключительно медленно.

Это позволяет объяснить, почему очень значительные изменения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в течение первых 200 мс приводят к тому, что величина $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$, необходимая для запуска освобождения Ca^{2+} , оказывается на 2—3 порядка меньше, чем полученная в работах Endo [1, 78]. Кроме того, для такого вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} [16, 87], не требуется сильная предварительная загрузка СР ионами Ca^{2+} , и оно происходит в присутствии высокой $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{своб}}$ ($3,16 \times 10^{-3}$ М), угнетающей вызванное Ca^{2+} освобождение Ca^{2+} в скиннированных волокнах большого диаметра [1, 78]. Однако следует отметить, что такие эксперименты все еще не были проведены на скелетных мышцах земноводных, которые Endo [1, 78] использовал в своих дальнейших исследованиях, позволяющих ему отказаться от какого бы то ни было применения вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} для активации сокращения скелетных мышц. Сделанные им выводы пока не подвергаются сомнению по крайней мере для этого конкретного типа скелетной мышцы.

При таком сравнении сердечной и скелетной мышц необходимо продолжать рассматривать параллельно и противоположную гипотезу, поддерживаемую Charman [10]. До тех пор пока не будет установлен механизм инициации освобождения Ca^{2+} из СР скелетной мышцы, будут оставаться некоторые сомнения относительно его возможной роли в интактном миокарде в дополнение к вызванному Ca^{2+} освобождению Ca^{2+} или вместо него. Для объяснения этого механизма предложено несколько гипотез. Как было отмечено во «Введении», они будут рассмотрены в другой главе. Поэтому мы должны закончить эту главу без каких-бы то ни было определенных выводов относительно участия освобождения Ca^{2+} из СР в процессе электромеханического сопряжения в миокарде в физиологических условиях, и того является ли механизмом такого возможного освобождения Ca^{2+} описанное в этой главе вызванное Ca^{2+} освобождение Ca^{2+} из СР.

Примечания

1. Работа [123] опубликована после того, как данная глава была принята к печати.

2. Эти внутриклеточные фиксированные и растворимые Ca^{2+} -буферные системы принимались во внимание при расчетах взаимосвязи между механическим напряжением и повышением полного содержания кальция, происходящей вследствие трансмембранного поступления Ca^{2+} , о которых сообщалось в другой статье, опубликованной после того, как эта глава была принята к печати [124].

3. После подписания к печати этой главы работа [35] была опубликована в виде блестящей и удивительно исчерпывающей статьи [125]. Количественный расчет увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ в митохондриальной плазме на основе истощения содержания кальция во внеклеточном пространстве, измеренного в этой работе, обсуждается в статье [124].

4. См. работу Fabiato [124].

5. Результаты этих расчетов приведены в работе [124], в которую также было включено обсуждение относящихся к этому вопросу оценок увеличения общего содержания кальция в клетке за счет Ca^{2+} -тока в изолированных кардиомиоцитах быка, измеренного в работе [126], которая не была опубликована к тому моменту, когда был написан первый вариант этой главы. Кроме того, в опубликованной недавно серии статей [127—129] подробно описываются устойчивость к Ca^{2+} и электрические свойства препаратов интактных изолированных кардиомиоцитов взрослых животных, получение которых разработали авторы этих статей.

6. Дальнейшее рассмотрение этого вопроса приводится в работе [124], в которой текущая рабочая гипотеза относительно механизма вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} описана более подробно.

7. Однако в работе [124] предлагается механизм вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} из СР и объяснено, что он функционирует не по типу «все или ничего» вследствие наличия отрицательной обратной связи: повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$ до уровня, достигнутого во время пика транзиторного всплеска Ca^{2+} , инактивирует вызванное Ca^{2+} освобождение Ca^{2+} .

Следует отдать должное доктору Х. И. Менсингу из Тюбингенского университета за то, что он в личном письме ко мне заинтересовался, почему в используемых растворах присутствует глюкоза. Однако этот вопрос был получен в тот момент, когда мы уже исключили глюкозу из применяемых растворов. Глюкозу добавляли потому, что первые эксперименты проводили на гомогонатах разрушенных, но не лишенных сарколеммы клетках [103]. Однако было ошибочным оставлять в растворах глюкозу в дальнейших экспериментах, в которых исследовались одиночные сканированные кардиомиоциты. Тем не менее 7 мМ глюкозы, по видимому, не оказывает никакого влияния, так как исключение

не из растворов не привело к каким-либо значительным изменениям результатов.

9. Уже после подписания этой главы к печати дальнейшие исследования, проводимые Шарпан, вынудили его значительно менее негативно смотреть на возможную физиологическую роль названного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} из СР в процессе электромеханического сопряжения в сердце [130]. Поэтому большая часть материала этого раздела уже потеряла свою актуальность и мы приносим за это свои извинения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Endo M.* Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. — *Physiol. Rev.*, 1977, vol. 57, p. 71—108.
2. *Fabiato A., Fabiato F.* Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. — *Circulat. Res.*, 1977, vol. 40, p. 119—129.
3. *Oetliker H.* An appraisal of the evidence for a sarcoplasmic reticulum membrane potential and its relation to calcium release in skeletal muscle. — *J. Muscle. Res. cell. Motil.*, 1982, vol. 3, p. 247—272.
4. *Platt J. R.* Strong inference certain systematic methods of scientific thinking may produce much more rapid progress than others. — *Science*, 1964, vol. 146, p. 347—353.
5. *Antoni H., Jacob R., Kaufmann R.* Mechanische Reaktionen des Frosch- und Saugertiermyokards bei Veränderung der Aktionspotential-Dauer durch konstante Gleichstromimpulse. — *Pflügers. Arch.*, 1969, vol. 306, p. 33—57.
6. *Boyett M. R., Jewell B. R.* Analysis of the effects of changes in rate and rhythm upon electrical activity in the heart. — *Progr. Biophys. mol. Biol.*, 1980, vol. 36, p. 1—52.
7. *Wohlfart B., Noble M. I. M.* The cardiac excitation-contraction cycle. — *Pharmacol. Ther.*, 1982, vol. 16, p. 1—43.
8. *Wier W. B.* Calcium transients during excitation-contraction coupling in mammalian heart: aequorin signals of canine Purkinje fibers. — *Science*, 1980, vol. 207, p. 1085—1087.
9. *Wier W. G., Isenberg C.* Intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ transients in voltage clamped cardiac Purkinje fibers. — *Pflügers Arch.*, 1982, vol. 392, p. 284—290.
10. *Chapman R. A.* Excitation-contraction coupling in cardiac muscle. — *Progr. Biophys. mol. Biol.*, 1979, vol. 35, p. 1—52.
11. *Blinks J. R., Olson C. B., Jewell B. R., Braveny P.* Influence of caffeine and other methylxanthines on mechanical properties of isolated mammalian heart muscle: evidence for a dual mechanism of action. — *Circulat. Res.*, 1972, vol. 30, p. 367—392.
12. *Solaro R. J., Briggs F. N.* Estimating the functional capabilities of the sarcoplasmic reticulum in cardiac muscle: calcium binding. — *Circulat. Res.*, 1974, vol. 34, p. 531—540.
13. *Fabiato A.* Myoplasmic free calcium concentration reached during the twitch of an intact isolated cardiac cell and during calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned cardiac cell from the adult rat or rabbit ventricle. — *J. gen. Physiol.*, 1981, vol. 78, p. 457—497.
14. *Levitsky D. O., Benevolensky D. S., Levchenko T. S.* et al. Calcium-binding rate and capacity of cardiac sarcoplasmic reticulum. — *J. mol. cell. Cardiol.*, 1981, vol. 13, p. 785—796.
15. *Fabiato A., Fabiato F.* Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1978, vol. 307, p. 491—522.
16. *Fabiato A.* Calcium release in skinned cardiac cells: variations with species, tissues, and development. — *Fed. Proc.*, 1982, vol. 41, p. 2238—2244.
17. *Affolter H., Chiesi M., Dabrowska R., Carafoli E.* Calcium regulation in

Глава 12

ПОГЛОЩЕНИЕ КАЛЬЦИЯ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКИМ РЕТИКУЛУМОМ, ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ

М. ТАДА, М. ШИГЕКАВА, Й. НИМУРА
(M. TADA, M. SHIGEKAWA, Y. NIMURA)

ВВЕДЕНИЕ

Физиологическая регуляция цикла сокращения — расслабления миокарда определяется изменением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [1—3]. Сократительная система сердца, подобно скелетной мышце, максимально активизируется при достижении величины концентрации ионизованного Ca^{2+} 10^{-5} М, а активное состояние может перейти в состояние покоя, когда концентрации ионизованного Ca^{2+} падает ниже 10^{-7} М. В быстрой скелетной мышце такое изменение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} регулируется исключительно саркоплазматическим ретикулумом (СР). Освобождение и последующее поглощение Ca^{2+} этой внутриклеточной структурой вызывают сокращение и расслабление сократительной системы. Однако в сердечной мышце внутриклеточная концентрация Ca^{2+} во время цикла сокращения — расслабления контролируется не только СР, но также и другими клеточными органеллами, такими, как сарколема [4—8]. Степень участия СР в регуляции движения Ca^{2+} от сокращения к расслаблению варьирует у различных видов животных [5—6]. В желудочке сердца млекопитающих СР довольно хорошо развит [9], и имеются данные о том, что он играет основную роль в инициации сокращения и расслабления [5—7]. В сердечной мышце низших позвоночных, такой, как желудочек сердца лягушки, СР, по-видимому, наоборот, развит плохо, и имеющиеся данные свидетельствуют, что сарколема в этом случае играет более важную роль [5, 6]. Хотя митохондрии длительное время включались в число структур, участвующих в регуляции расслабления сердца, последние эксперименты указывают, что в физиологических условиях они не играют существенной роли как в миокарде земноводных, так и в миокарде млекопитающих [5, 9].

Поглощение и освобождение Ca^{2+} из СР исследовались в различных экспериментальных системах, начиная от препаратов изолированных везикул СР и кончая интактными клетками, выделенными в основном из миокарда млекопитающих. Довольно хорошо объяснены механизм поглощения Ca^{2+} саркоплазматическим ретикулумом, вызывающим расслабление миокарда, а также его регуляция, имеющая важное значение для физиологии и

фармакологии. Механизм же освобождения Ca^{2+} из СР, приводящий к инициации сокращения, наоборот, еще не ясен. Так как последний вопрос обсуждается в главе 11, то в настоящей главе суммирована информация, относящаяся к транспорту Ca^{2+} через мембрану СР, и регуляции этого процесса, причем основное внимание уделено процессам, происходящим на молекулярном уровне, благодаря которым кальциевый насос СР сердца аккумулирует Ca^{2+} .

СТРУКТУРА И СОСТАВ МЕМБРАНЫ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

СР миокарда млекопитающих представляет собой ограниченную мембраной структуру, которая образует сеть, окружающую пучки миофибрилл [9]. Внутреннее пространство СР образует замкнутую внутриклеточную систему, которая не связана непрерывно с внеклеточным пространством. Система поперечных трубочек (Т-система) представляет собой другую, состоящую из трубочек, структуру, ориентированную преимущественно перпендикулярно длинной оси миокардиальной клетки, разделяя СР по линиям, которая непрерывно соединена с поверхностной мембраной, а ее внутренняя полость сообщается с внеклеточным пространством. СР можно разделить на два компонента: свободный СР и контактный СР (КСР) [9, 10]. Первый из них не образует никаких контактов с другими мембранами, а окружает миофибриллы в основном в средней части саркомера. Второй расположен под клеточной поверхностью мембраны и образует периферийные контакты с сарколеммой или же располагается вдоль Т-системы, образуя внутренние контакты с мембранами Т-системы. Внутренние контакты выявляются в виде диад или триад, когда один или два элемента КСР образуют контакты с одной или с обеих сторон Т-тубулы. Участки КСР, которые входят в состав периферических или внутренних контактов, часто называют субсарколеммальными цистернами и терминальными цистернами соответственно. Для контактов, образованных КСР и клеточной поверхностной мембраной или мембраной Т-системы, характерно наличие «колонн», особых выступов между мембраной СР, расположенных с регулярной периодичностью [9, 10]. Эти структуры могут служить анатомической основой для передачи сигнала от сарколеммы к СР. Кроме «колонн», другой характерной чертой КСР является наличие плотного вещества в виде гранул внутри его полости. Эти плотные образования заряжены отрицательно, и считается, что они образованы Ca^{2+} -связывающим белком, аналогичным калеквестрину в СР скелетных мышц. Кроме того, в миокарде могут быть обнаружены особые формы контактного СР, которые отличаются от обычного контактного СР по своей геометрической форме и расположению внутри клетки [9]. В свободном СР, наоборот, отсутствуют все эти признаки КСР. Следовательно, различные участки СР имеют специфически

структурные признаки, что позволяет предположить наличие разных функций у этих компонентов СР. В соответствии с таким представлением считается, что хранение и освобождение Ca^{2+} происходит преимущественно в терминальных цистернах в волокнах скелетной мышцы [11, 12], в то время как поглощение Ca^{2+} по всей поверхности мембраны СР.

Ионный состав среды внутри СР *in situ* изучался на скелетной мышце с помощью метода регистрации характеристического рентгеновского излучения при облучении препарата потоком электронов (electron-probe analysis) [12]. Содержание K^+ , Na^+ и Cl^- СР покоящейся мышцы не значительно отличается от такового в цитоплазме, но существенно отличается от их содержания в внеклеточном пространстве. Эти результаты указывают на то, что СР представляет собой внутриклеточный компартмент, и свидетельствуют против наличия потенциала покоя на мембране СР, если она *in situ* так же проницаема для K^+ , Na^+ и Cl^- , как и изолированные везикулы СР. Если на короткое время вызвать тетанус в скелетной мышце лягушки, то, как было показано, из терминальных цистерн в миоплазму освобождается больше половины содержащихся в них ионов Ca^{2+} [12]. Такое освобождение Ca^{2+} сопровождается значительным поглощением Mg^{2+} и K^+ терминальными цистернами. Так как количество освобожденного Ca^{2+} значительно превышает суммарное поглощение других катионов, то было выдвинуто предположение, что терминальные цистерны также захватывают протоны и (или) органические ионы, чтобы компенсировать большой дефицит заряда. Эти результаты, таким образом, указывают, что во время активации и расслабления мышечного волокна происходит перемещение различных ионов в СР и из него, сцепленное с движением ионов Ca^{2+} .

Препараты фрагментированного саркоплазматического ретикулула

При гомогенизации миокарда происходит фрагментация мембран СР, а затем эти фрагменты спонтанно принимают форму маленьких замкнутых везикул. Последние могут быть изолированы в виде микросомальных фракций путем дифференциального центрифугирования гомогената ткани миокарда [13—17]. Микросомы, осаждающиеся между 8000—10 000 г и 37 000—40 000 г, и дальнейшем обычно обрабатывались 0,6 М раствором KCl для удаления сократительных белков, загрязняющих выделенную фракцию микросом. Полученные при такой процедуре препараты, которые обычно используются в большинстве лабораторий, сильно обогащены мембранами СР, если судить по активности маркерных ферментов (поглощению Ca^{2+} и Ca^{2+} -зависимой АТФазной активности и Ca^{2+} -зависимое образование ацилфосфофермента; см. ниже). Общая масса такого препарата, выделенного из сердца собаки, равна приблизительно 0,63 мг/г, что соответствует около 10% мембран СР, находящихся в гомогенате мышцы [16]. Такие препараты загрязнены фрагментами митохондрий, так что на

АТФазная активность существенно угнетается азидом натрия, являющимся ингибитором митохондриальной ферментативной активности [13, 18—20]. Однако их способность поглощать Ca^{2+} не изменяется при действии этого вещества [13, 16]. Такие препараты также существенно загрязнены мембранами сарколеммы, содержание которых, согласно оценкам, составляет около 15% [21]. Везикулы СР можно отделить от загрязняющих их мембранных фракций путем центрифугирования в градиенте плотности сахарозы после того, как микросомальную фракцию до центрифугирования нагружают оксалатом кальция в присутствии АТФ [17, 21, 22]. Мембраны сарколеммы концентрируются в легкой фракции и практически отсутствуют в самой тяжелой фракции, содержащей оксалат кальция. Исходя из того, что *in situ* СР состоит из различных участков в пределе одного саркомера, можно предположить, что изолированные фрагменты мембраны СР не являются гомогенными. Автор работы [23] разделил фрагментированные мембраны СР, выделенные из скелетной мышцы, на две субфракции различной плотности путем центрифугирования в градиенте сахарозы. В легкой и тяжелой фракциях выявлены некоторые отличия в белковом составе [23] и способности освобождать Ca^{2+} [24]. Результаты биохимических и морфологических исследований свидетельствуют о том, что легкая и тяжелая фракции получаются соответственно из продольного СР (свободного СР) и терминальных дистерн (КСР) [23, 25]. На фрагментированных мембранах СР сердца аналогичные исследования не проводились, однако недавно было показано [26], что мембраны СР сердца также состоят из гетерогенных субпопуляций. Авторы этой работы установили, что алкалоид рианодин способен селективно увеличивать поглощение Ca^{2+} одной из субпопуляций мембран СР сердца и что эту чувствительную к рианодину фракцию СР можно отличить от остальных мембран СР и по другим биохимическим свойствам, включая белковый состав. Однако в настоящее время физиологическое значение этих результатов неясно.

Изолированные везикулы мембран СР сердца имеют преимущественно сферическую форму диаметром около 0,1—0,2 мкм, как показывают исследования с применением электронной микроскопии [27]. Считается, что эти везикулы замкнуты и сохраняют исходную ориентацию внешней стороной наружу, поэтому Ca^{2+} транспортируется внутрь везикул.

Белковый и липидный состав

Если везикулы СР сердца подвергнуть электрофорезу в поликриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, в результате получается большое количество полос, соответствующих различным белкам (рис. 12.1). Основным компонентом является полипептид с молекулярной массой (М.м.) около 100 000 дальтон. Этот полипептид представляет собой белок СР, обладающий АТФ-азной активностью, который играет основную роль в транс-

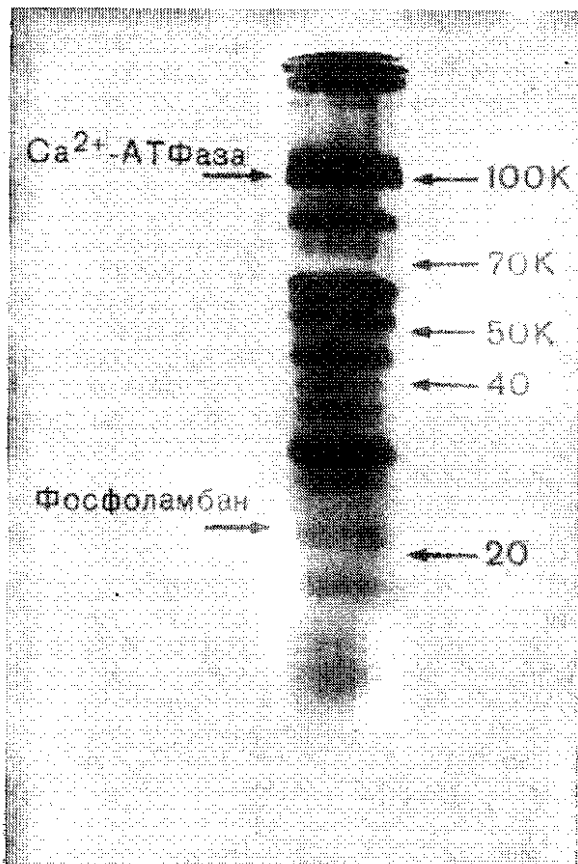


Рис. 12.1. Электрофорез препарата СР сердца собаки в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия.

порте Ca^{2+} в СР. Эта АТФаза недавно была получена в частично очищенном виде из мембран СР сердца голубя [17] и сердца собаки [28, 29] после солюбилизации мембранных белков с помощью деоксихолата. Миокардиальная АТФаза иммунологически отличается от АТФазы быстрой скелетной мышцы [27]. При электрофорезе мембран СР сердца обнаруживаются также полосы, соответствующие белкам с молекулярной массой 50 000—60 000 дальтон. Эти компоненты могут соответствовать кальсеквестрину — Ca -связывающему белку с высоким сродством к Ca^{2+} и (или) гликопротеину СР скелетной мышцы (см. ниже). Однако свойства и функциональное значение этих и других белковых компонентов мембран СР сердца еще не достаточно хорошо определены, за исключением белка, обладающего АТФазной активностью кальсеквестрина и фосфоламбана, белка с молекулярной массой 22 000 дальтон, который служит субстратом протеинкиназы и управляет работой Ca^{2+} -насоса СР (см. ниже) [30]. Фосфоламбан, по-видимому, является кислым протеолипидом и частично выступает наружу из цитоплазматической поверхности везикул СР. Его

содержание в мембранах СР сердца, согласно оценкам, составляет 4—5% от общего содержания белка [30].

В отличие от СР сердца белковый состав мембран СР, изолированных из быстрых скелетных мышц, значительно лучше изучен, и в нем идентифицированы пять основных белковых компонентов: АТФаза (М.м. 100 000), протеолинид с молекулярной массой 12 000 дальтон, гликопротеин с молекулярной массой 53 000 дальтон, калсеквестрин (М.м. 44 000) и Са-связывающий, высокоаффинный белок (М.м. 55 000) [31, 32]. Белок, обладающий АТФазной активностью, составляет 60—90% от общего белка: 1 моль АТФазы содержит приблизительно 2 моля высокоаффинных мест связывания Ca^{2+} ($K_d=0,3$ мкМ) и 1 моль высокоаффинных мест связывания АТФ ($K_d=0,5-3,0$ мкМ) [33—35].

Белок, обладающий АТФазной активностью является амфифильным полипептидом, состоящим из одной цепи. Его молекулярная масса, определенная методом седиментационного равновесия в аналитической ультрацентрифуге в присутствии детергента, равна 115 000—119 000 дальтон [36]. Гидрофобный участок этого полипептида тесно связан с липидной фазой мембраны, в то время как гидрофильный участок, по-видимому, выступает из поверхности мембраны СР с цитоплазматической стороны (рис. 12.2). Были определены аминокислотные последовательности пяти основных водорастворимых пептидов (см. сегменты I—V на рис. 12.2), которые содержат около 60% всех аминокислотных остатков этого белка [37—39]. Сюда входят NH_2 -терминальный пептид (сегмент I) и COOH — терминальный пептид (сегмент V). Легкая обработка трипсином интактных замкнутых везикул СР приводит к разделению АТФазного полипептида на два фрагмента: фрагмент А (М.м. 55 000) и фрагмент В (М.м. 45 000). При дальнейшей обработке трипсином фрагмент А разделяется еще на два фрагмента: фрагмент A_1 (М.м. ≈ 30 000) и фрагмент A_2 (М.м. 25 000) [31, 37, 38]. Такие полученные при обработке трипсином фрагменты содержат как гидрофильные, так и гидрофобные участки и остаются тесно связанными с мембраной (см. рис. 12.2).

На основании результатов определения аминокислотных последовательностей фрагменты, полученные при обработке трипсином, можно расположить в следующем порядке: фрагмент A_2 — фрагмент A_1 — фрагмент В [37—39]. Фрагмент A_2 имеет ацетилированный NH_2 -конец, а фрагмент В — COOH -конец. На рис. 12.2 показаны взаимная последовательность и расположение в мембране фрагментов АТФазного полипептида, полученных при обработке трипсином, и фрагментов, у которых определена аминокислотная последовательность. Считают, что водорастворимые фрагменты, у которых определена аминокислотная последовательность, выступают из цитоплазматической поверхности везикул СР, потому что лишь небольшая часть АТФазы расположена на внутренней стороне везикул (см. ниже). Водонерастворимые пептидные участки, наоборот, преимущественно находятся внутри мембраны. Следовательно, АТФаза сложна изогнута относитель-

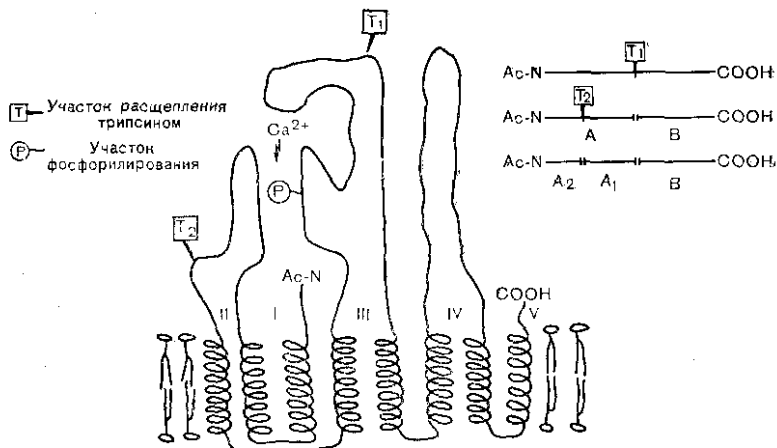


Рис. 12.2. Схема взаимного местонахождения и положения в мембране различных сегментов полипептидной цепи АТФазы.

T_1 , T_2 — места расщепления при обработке трипсином; P — участок фосфорилирования; $Ac-N$ — N -конец пептида; $COOH$ — карбоксильный конец пептида. Модифицировано из [38].

но мембраны (см. рис. 12.2). Расположение сегментов I—III на цитоплазматической поверхности согласуется со следующими результатами [37—40]: а) точки разрезания полипептида трипсином (T_1 и T_2), которые должны быть расположены на цитоплазматической поверхности, расположены в сегментах II и III соответственно; б) активный центр АТФазы, который фосфорилирует крайний фосфатным остатком АТФ во время ферментативного катализа (см. ниже), находится в трипсиновом фрагменте A_1 , причем фосфорилируется аспаратный остаток во фрагменте III, в) специфический для сегмента I остаток цистеинила может быть помечен с помощью SH -реагентов, не проникающих через мембрану.

Следует отметить, что центр фосфорилирования и Ca -транспортный центр, по-видимому, расположены на различных участках полипептида. Ca -транспортный центр связан, по-видимому, с трипсиновым фрагментом A_2 , так как этот фрагмент обладает Ca -ионофоретической активностью при встраивании в липидный бислой [38], а также ковалентно связывается с дициклогексилкарбодимидолом (ДЦКД) в условиях, когда высокоаффинное связывание Ca^{2+} с АТФазой ингибировано этим реагентом [41].

Данный протеолипид является белком, встроенным в мембрану СР. Хотя предполагают, что этот протеолипид необходим для эффективного воспроизведения активности Ca^{2+} -насоса при использовании АТФазы и фосфолипидов [42], тем не менее его физиологическая роль все еще не выяснена [38].

Кальсеквестрин и высокоаффинный Ca -связывающий белок прочно связаны с мембраной и легко экстрагируются при

мягкой обработке детергентами [31, 32]. Калсеквестрин является белком, несущим большой отрицательный заряд, его молекулярная масса варьирует в пределах 44 000—65 000 в зависимости от условий при электрофорезе. Этот белок преимущественно расположен внутри везикул СР, имеет низкое сродство к Ca^{2+} , но высокую способность связывания Ca^{2+} . Он связывает заметное количество Ca^{2+} в случаях, когда внутривезикулярная концентрация Ca^{2+} превосходит миллимолярный уровень. Содержание этого белка в везикулах сильно варьирует, оно очень низко в легкой фракции микросом и значительно в тяжелой фракции (до 25% от общего содержания белка) [23, 25]. Предполагается, что этот белок служит в основном местом хранения Ca^{2+} , аккумулированного в СР. В недавних исследованиях было показано, что очищенный калсеквестрин обладает свойствами, близкими к свойствам калсекестрина скелетной мышцы [141]. Предполагается, что высокоаффинный Са-связывающий белок также расположен внутри везикул СР [43]. Его физиологическое значение в настоящее время неизвестно.

Подобно АТФазе и протеолипиду, гликопротеин, имеющий молекулярную массу 55 000 дальтон, является встроенным в мембрану белком СР [43, 44]. Он выступает из мембраны везикул СР как с внешней, так и с внутренней стороны. Интересно, что этот гликопротеин по молекулярной массе, аминокислотному составу и составу сахарозных остатков очень близок к гликопротеиновой субъединице (Na^+ , K^+)-АТФазы. Поэтому он может играть некоторую роль в транспорте Ca^{2+} мембранами СР.

Липидный состав мембран СР сердца недостаточно хорошо изучен, потому что не установлена чистота препаратов СР сердца. В препаратах СР, выделенных из быстрых скелетных мышц, фосфолипиды составляют около 80% всех липидов, если исходить из молярных отношений, причем большую часть занимает фосфатидилхолин (65—73%) [32]. Для мембран СР быстрой скелетной мышцы кролика характерны низкое содержание холестерина и относительно высокая степень ненасыщенности жирнокислотных компонентов основных фосфолипидов. Очищенный белок, обладающий АТФазной активностью, содержит остатки фосфолипидов, состав которого близок к составу фосфолипидов интактных мембран СР [31]. Молекулы фосфолипида, тесно связанные с АТФазным белком, необходимы для проявления его ферментативной активности. Поэтому обработка очищенной АТФазы или исходных мембран СР с помощью фосфолипазы приводит к ингибированию гидролиза АТФ и (или) транспорта Ca^{2+} через мембраны [45].

Структурная организация мембран саркоплазматического ретикулула

Структура мембран СР скелетной и сердечной мышц либо изолированных, либо *in situ* изучалась с помощью различных электронно-микроскопических препаратов [9, 10, 15, 27, 31, 46, 47]. На тонких срезах мембран СР продемонстрирована их трехслой-

ная структура, типичная для всех биологических мембран. Электронно-микроскопические исследования препаратов замороженных мембран СР со сколом показывают, что гидрофобная внутренняя часть мембран заполнена глобулярными частицами диаметром около 9 нм. Большая часть этих частиц сконцентрирована во внешнем слое мембранного бислоя. Негативное окрашивание везикул мембран СР выявило существование частиц меньших размеров (около 4 нм в диаметре) с небольшим выступанием над поверхностью мембраны. Показано, что такие поверхностные и внутримембранные частицы отражают структурные характеристики белка, обладающего АТФазной активностью. Поэтому считают, что большая часть обладающего АТФазной активностью белка расположена в цитоплазматическом слое бислоевой мембраны СР и что этот белок выступает в цитоплазму в виде частиц диаметром 4 нм. Плотность частиц диаметром 9 нм в СР миокарда составляет примерно половину их плотности в СР скелетной мышцы [9]. Следовательно, плотность АТФазы в мембране СР сердца будет соответственно ниже. Хотя незаряженные участки полипептида, обладающего АТФазной активностью, проникают внутрь мембраны (см. рис. 12.2), нет никаких прямых экспериментальных доказательств, подтверждающих мнение, что этот полипептид проходит насквозь через всю мембрану СР и выступает из ее внутренней поверхности. Однако выход полипептида на внутреннюю поверхность скорее всего необходим для транспорта Ca^{2+} через мембрану.

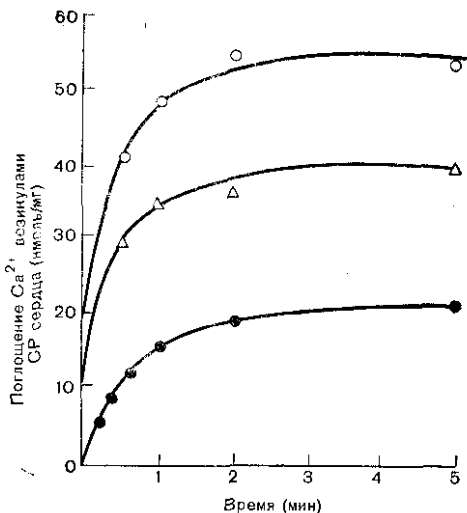
По-видимому, АТФазный пептид самостоятельно собирается в мембране [32, 36, 46, 48]. Количество меньших по размеру по поверхностных частиц на внешней поверхности везикул в 3—4 раза превышает количество внутримембранных частиц, что позволяет предположить образование олигомеров АТФазы внутри мембраны. Этот вывод также подтверждается результатами некоторых современных исследований с применением кинетических и спектроскопических методов, а также различных меток [36, 48]. Хотя было показано, что мономерная форма АТФазы, определенная в присутствии детергентов, все же сохраняет полную ферментативную активность [36], полученные результаты позволяют предположить, что именно олигомер АТФазных пептидов является той функциональной единицей, которая транспортирует Са в интактной мембране СР.

ПОГЛОЩЕНИЕ Ca^{2+} ФРАГМЕНТИРОВАННЫМ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКИМ РЕТИКУЛУМОМ

Поглощение Ca^{2+} и гидролиз АТФ

Изолированные везикулы СР сердца могут поглощать Ca^{2+} в присутствии Mg^{2+} и АТФ, заметно уменьшая при этом концентрацию Ca^{2+} в среде [1, 45]. При сравнительно низкой концентрации ионизированного Ca^{2+} (3—50 мкМ) и в отсутствии Ca^{2+} -пренин

Рис. 12.3. Поглощение Ca^{2+} везикулами СР сердца в отсутствие преципитирующего аниона. Измерения проводили в среде, содержащей 0,2 мг/мл везикул СР сердца пылешка; 0,1 М КСl, 20 мМ трисмалеата (рН 6,8); 5 мМ MgCl_2 ; 2 мМ АТФ; 0,1 мМ $^{45}\text{CaCl}_2$ и ЭГТА в различных концентрациях. Концентрация ионизированного Ca^{2+} : светлыми кружками — 3,0 мкМ; треугольниками — 1,1 мкМ; темные кружки — 0,35 мкМ. Использовали метод фильтрации через мембрану. По [51].



тирующих анионов, таких, как оксалат или фосфат, везикулы СР быстро аккумулируют до 70 нмоль Ca^{2+} /мг белка (рис. 12.3) [14—16, 49—51]. В присутствии ЭГТА, не проникающего через мембрану Са-связывающего соединения, такой Ca^{2+} медленно удаляется из везикул. Однако такой Ca^{2+} быстро и полностью освобождается из везикул при создании утечки мембраны СР с помощью детергентов или Ca^{2+} -ионофоров [52]. Эти наблюдения показывают, что Ca^{2+} транспортируется через мембрану СР и хранится внутри везикул. Если предположить, что внутреннее пространство везикул СР сердца составляет 4—5 мкл/мг белка, что равно величине, полученной для везикул СР скелетной мышцы [45], то внутривезикулярная концентрация Ca^{2+} будет равна 17 мМ. Хотя значительная часть этого Ca^{2+} может быть связана с такими внутривезикулярными структурами, как Ca^{2+} -связывающие белки или фосфолипиды мембраны, внутривезикулярная концентрация ионизированного Ca^{2+} все же будет находиться в миллимолярном диапазоне, свидетельствуя о том, что Ca^{2+} транспортируется в этих условиях против градиента концентрации.

После достижения установившегося уровня приблизительно около 70 нмоль/мг белка дальнейшая аккумуляция Ca^{2+} не происходит, даже если Ca^{2+} и АТФ находятся в среде в концентрациях, достаточных для активации Ca^{2+} -насоса. Существование некоторого постоянного уровня аккумуляции Ca^{2+} указывает на равенство скорости активной закачки Ca^{2+} при работе Ca^{2+} -насоса и пассивной утечки Ca^{2+} . Скорость входа Ca^{2+} зависит от степени активации Ca^{2+} -насоса и внутривезикулярной концентрации Ca^{2+} , в то время как скорость выхода определяется внутривезикулярной концентрацией Ca^{2+} и проницаемостью мембраны СР для Ca^{2+} . Как будет показано ниже, активность Ca^{2+} -насоса угнетается при концентрации Ca^{2+} в миллимолярном диапазоне в результате влияния на промежуточной стадии гидролиза АТФ. Пассивная проницаемость мембраны СР для Ca^{2+} в отсутствие

АТФ относительно низка, почти в 50—100 раз ниже, чем максимальная начальная скорость поглощения Ca^{2+} , в СР скелетной мышцы [45]. Такая низкая проницаемость для Ca^{2+} в основном отражает естественные свойства бислоистой липидной матрикса, на котором построена мембрана СР. Однако было обнаружено, что проницаемость мембраны СР для Ca^{2+} значительно увеличивается во время АТФ-зависимого поглощения Ca^{2+} , когда концентрация Ca^{2+} вне везикул СР увеличивается [53].

Если добавить оксалат к среде, в которой происходят реакции, то везикулы СР сердца способны аккумулировать 6—10 мкмоль Ca^{2+} /мг белка [16, 17]. В этих условиях поглощение Ca^{2+} и оксалата происходит в эквимольных количествах, и внутри везикул СР образуются кристаллы оксалата кальция [1, 13, 22, 54], свидетельствуя о том, что внутривезикулярная концентрация оксалата кальция выше, чем его произведение растворимостей. Поглощение Ca^{2+} , наблюдаемое в этих условиях, происходит линейно в течение длительного времени, пока концентрация Ca^{2+} в среде не становится слишком низкой, чтобы активировать Ca^{+} -насос, или пока поглощение Ca^{2+} не будет лимитировано емкостью везикул для оксалата кальция. Следовательно, оксалат, который свободно проникает через мембрану СР и образует кристаллы при соединении с Ca^{2+} , по-видимому, поддерживает поглощение Ca^{2+} путем удержания внутривезикулярной концентрации Ca^{2+} на низком уровне, исключая таким образом ингибирующее действие высокой внутривезикулярной концентрации Ca^{2+} на транспорт Ca^{2+} [55].

Поглощение Ca^{2+} везикулами СР обычно измеряют с помощью радиоактивного $^{45}\text{Ca}^{2+}$, используя метод фильтрации через мембрану, позволяющий быстро отделить нагруженные $^{45}\text{Ca}^{2+}$ везикулы от среды реакции. Этот метод удобен для отслеживания временного хода поглощения Ca^{2+} при временных интервалах порядка нескольких минут. Максимальная скорость поглощения Ca^{2+} везикулами СР сердца, измеренная с помощью этого метода в присутствии оксалата, согласно данным разных авторов, находится в диапазоне от 0,2 мкмоль/мг белка в 1 мин при 25 °С [56] до 1,5 мкмоль/мг белка при 37 °С [16]. В отсутствие Ca^{2+} -преципитирующего аниона этот метод не позволяет точно определить скорость поглощения Ca^{2+} , так как в этом случае его поглощение происходит линейно только в течение короткого периода времени (см. рис. 12.3). Поглощение Ca^{2+} во временных диапазонах, составляющих несколько миллисекунд или секунд, можно проследить с помощью метода остановки потока или метода гашения реакции в потоке. В первом случае спектрофотометрически регистрируются быстрые изменения спектра таких красителей, являющихся Са-индикаторами, как мурексид или арсеназо III. Эти изменения спектра отражают изменения концентрации Ca^{2+} в среде. Во втором случае быстрое поглощение $^{45}\text{Ca}^{2+}$ везикулами измеряют после остановки реакции поглощения с помощью ЭГТА или La^{3+} , используя аппаратуру для быстрой остановки реакции. Начальная скорость АТФ-зависимого поглощения Ca^{2+} везикулами

СР сердца, измеренная с помощью мурексида с применением метода остановки потока, оказалась равной 16—21 нмоль Ca^{2+} /мг белка за 150 мс при 25 °С [49]. При использовании аппаратуры для быстрой остановки реакции и ЭГТА начальная скорость поглощения при 22 °С и в присутствии 18,9 мкМ Ca^{2+} составила 33,4 нмоль Ca^{2+} /мг белка в 1 с [57]. Следует отметить, что эти величины скорости поглощения Ca^{2+} значительно превышают полученные в установившихся условиях в присутствии оксалата (см. выше).

Для транспортировки Ca^{2+} через мембрану СР сердца требуются затраты энергии [1, 54]. Везикулы СР проявляют как Ca^{2+} -зависимую, так и Ca^{2+} -независимую АТФазную активность. В обычных препаратах мембран СР сердца большая часть Ca^{2+} -независимой АТФазной активности, по-видимому, обусловлена активностью, проявляемой загрязняющими фрагментами митохондрий [13, 18—20]. И, наоборот, Ca^{2+} -зависимая часть АТФазной активности катализируется АТФазой СР. В СР скелетной мышцы Ca^{2+} -зависимый гидролиз АТФ и поглощение Ca^{2+} изменяются параллельно при различных экспериментальных условиях [1, 54], указывая на то, что гидролиз АТФ является источником энергии для поглощения Ca^{2+} . Ca^{2+} -зависимый гидролиз АТФ и поглощение Ca^{2+} неразрывно сцеплены друг с другом, причем транспортировка 2 молей Ca^{2+} сопровождается гидролизом 1 моля АТФ как в присутствии оксалата, так и без него [1, 46, 54]. С таким коэффициентом сопряжения хорошо согласуются данные о том, что 1 моль белка АТФазы содержит 2 моля высокоаффинных участков связывания Ca^{2+} и 1 моль таких участков связывания АТФ (см. выше). В интактных везикулах СР сердца был получен такой же коэффициент сопряжения, когда на 1 гидролизованной моль АТФ поглощается 2 моля Ca^{2+} [19]. Однако коэффициент сопряжения уменьшается при увеличении пассивной проницаемости мембраны СР для Ca^{2+} любыми способами. Например, при обработке везикул детергентом или при воздействии на них ионофором возникает утечка Ca^{2+} через мембрану СР, что препятствует накоплению Ca^{2+} в СР, несмотря на поддержание высокой скорости гидролиза АТФ в течение длительного времени. Часто публикуются сообщения о более низких коэффициентах сопряжения даже в интактных везикулах СР [26], что может свидетельствовать о том, что значительная доля везикул СР в таких препаратах представляет собой незамкнутые фрагменты мембран или что в определенных экспериментальных условиях могут функционировать неизвестные механизмы поддержания высокой проницаемости мембраны СР для Ca^{2+} .

Поглощение Ca^{2+} и Ca^{2+} -зависимый гидролиз АТФ везикулами АТФ сердца активируется при очень низкой концентрации Ca^{2+} в среде вне везикул СР [1, 45]. Скорость обоих процессов возрастает с увеличением концентрации Ca^{2+} , достигая максимума при 3—10 мкМ Ca^{2+} . Половина максимальной активации достигается при 0,3—4,7 мкМ Ca^{2+} (K_{Ca}) при pH 6,8—7,0 [14, 20, 50, 51, 56, 58]. Такие довольно значительные вариации оптималь-

ного диапазона концентрации Ca^{2+} для активации поглощения частично связаны с различиями констант связывания для комплекса СаЭГТА, принятых различными исследователями для расчетов. Следует отметить, что оптимальный диапазон концентраций Ca^{2+} (K_{Ca}) для поглощения Ca^{2+} и гидролиза АТФ, измеренный в присутствии оксалата, приблизительно в 5 раз выше, чем для установившейся аккумуляции Ca^{2+} , полученной в отсутствие преципитирующих анионов [16]. По-видимому, первый из этих диапазонов, согласующийся с оптимальным диапазоном концентраций Ca^{2+} для образования фосфорилированного промежуточного состояния фермента при гидролизе АТФ (см. ниже), скорее всего отражает ту часть зависимости поступления Ca^{2+} от концентрации Ca^{2+} , на которую оказывает влияние Ca^{+} -насос. А второй из этих диапазонов концентраций не отражает истинной зависимости активности насоса от концентрации Ca^{2+} потому, что установившаяся аккумуляция Ca^{2+} определяется динамическим равновесием между поступлением Ca^{2+} в везикулы и выходом из них. Так как проницаемость мембраны СР для Ca^{2+} увеличивается при повышении концентрации Ca^{2+} вне везикул СР [53], то высокая внутривезикулярная концентрация Ca^{2+} , достигнутая вследствие работы насоса, значительно увеличивает выход Ca^{2+} при более высокой концентрации Ca^{2+} в среде. Этот эффект вместе со снижением скорости работы Ca^{+} -насоса, вызванным высокой внутривезикулярной концентрацией Ca^{2+} (см. ниже), может привести к уменьшению содержания Ca^{2+} , при которой достигается насыщение установившейся аккумуляции Ca^{2+} . Ионы Sr^{2+} и Mn^{2+} вызывают такое же активирующее действие, как и ионы Ca^{2+} [1, 59]. La^{3+} в относительно высоких концентрациях угнетает как поглощение Ca^{2+} , так и гидролиз АТФ [32]. Как упоминалось выше, оба вида активности ингибируются при высокой концентрации Ca^{2+} внутри везикул СР.

Субстратом для Ca^{2+} -зависимого гидролиза АТФ и поглощения Ca^{2+} в СР сердца, как и в СР скелетной мышцы [32], по-видимому, является эквимоларный комплекс Mg^{2+} и АТФ. Ca^{2+} -зависимый гидролиз АТФ находится в сложной зависимости от концентрации комплекса MgATP : в присутствии АТФ-регенерирующей системы АТФазная активность достигает насыщения при 10 мкМ MgATP ($K_m = 1-2$ мкМ), но при более высоких концентрациях MgATP наблюдается дальнейшее повышение АТФазной активности ($K_m \approx 0,18$ мМ) [20, 60]. Величина K_m , полученная при низкой концентрации АТФ, близка к K_m для образования фосфорилированного промежуточного состояния АТФазы (см. ниже), указывая на то, что этот центр с низким K_m соответствует высокоаффинному каталитическому центру. Стимулирующее действие высоких концентраций АТФ считается следствием регуляторного влияния этого нуклеотида на число оборотов Ca^{+} -насоса, возникающего вследствие активации промежуточных стадий гидролиза АТФ высокими концентрациями АТФ (см. ниже). Кроме того, аналоги АТФ, которые либо вовсе не гидролизуются, либо очень медленно гидролизуются ферментом, имитируют действие высоких кон

центраций АТФ [35, 61]. Следовательно, АТФаза имеет, по-видимому, высокоаффинный каталитический центр и низкоаффинный регуляторный центр. Кроме АТФ, Ca^{2+} -насос СР может использовать и другие естественные нуклеотидтрифосфаты [1, 32, 62]. Скорости их гидролиза Ca^{2+} -насосом СР сердца при концентрации 5 мМ располагаются в следующем порядке: АТФ > ЦТФ > ИТФ > ГТФ > УТФ [13]. Другие содержащие фосфат соединения, такие, как ацетилфосфат или р-нитрофенилфосфат, также могут служить субстратами, хотя скорости их использования очень низки [63].

Ионы Mg^{2+} ускоряют промежуточные стадии гидролиза АТФ (см. ниже), не считая того, что они являются компонентом истинного субстрата, MgATP . В современных экспериментах на везикулах СР скелетной мышцы было опровергнуто предположение о том, что поглощение Ca^{2+} обязательно сцеплено противотранспортом Mg^{2+} [59, 64].

Для полной активации работы Ca^{2+} -насоса необходимы одновалентные катионы, такие, как K^{+} [65—67]. Удаление одновалентных ионов из среды реакции уменьшают скорости поглощения Ca^{2+} и Ca^{2+} -зависимого гидролиза АТФ приблизительно на одну четверть от наблюдаемых при оптимальных концентрациях этих ионов. Эффективность стимуляции Ca^{2+} -насоса одновалентными ионами в концентрации 100 мМ располагается в следующем порядке: $\text{K}^{+} > \text{Na}^{+} > \text{NH}_3 > \text{Rb}^{+} > \text{Cs}^{+} > \text{Li}^{+}$ [65—67]. Как будет показано ниже, эти одновалентные ионы ускоряют также промежуточные стадии гидролиза АТФ.

Зависимости скорости поглощения Ca^{2+} и Ca^{2+} -зависимого гидролиза АТФ везикулами СР сердца от рН имеют колоколообразную форму с оптимальными значениями рН 6,2—6,5 для поглощения Ca^{2+} и рН 7,5—8,0 для гидролиза АТФ [20, 68].

Влияние потоков ионов и трансмембранного потенциала на поглощение Ca^{2+} исследовалось на нативных везикулах СР скелетной мышцы [69] и на очищенном белке АТФазы СР скелетной мышцы, встроенном в везикулы, образованные искусственной бислойной фосфолипидной мембраной [70]. Скорость АТФ-зависимого поглощения Ca^{2+} увеличивается при создании внутри искусственно восстановленных везикул отрицательного потенциала по отношению к внешней поверхности, что осуществляли с помощью градиента K^{+} и валиномицина. Эти наблюдения позволяют предположить, что Ca^{2+} -насос СР является электрогенным. Показано также, что градиент рН (кислая среда внутри) также увеличивает начальную скорость поглощения Ca^{2+} [69, 70]. Обнаружено, что во время начальной фазы поглощения Ca^{2+} протоны (H^{+}) выводятся из везикул СР [59, 72]. Такое выведение H^{+} и поглощение Ca^{2+} могут быть тесно сцеплены таким образом, что H^{+} обмениваются на Ca^{2+} с помощью системы противотранспорта [59, 71]. Однако нативные мембраны СР скелетной мышцы, как показано, легко проницаемы для таких ионов, как K^{+} , Na^{+} , H^{+} и Cl^{-} , хотя они относительно плохо проницаемы для Ca^{2+} , Mg^{2+} и больших по размеру ионов, таких, как трис $^{+}$, холин $^{+}$ или глюконат $^{-}$ [73, 74]. В мембране СР скелетной мышцы идентифициро-

ваны и подробно описаны специфические калиевые каналы [75, 76]. В этих мембранах также идентифицированы анионные каналы, угнетаемые блокаторами транспорта анионов [77]. Поэтому возможно, что перемещение заряда при работе электрогенного Ca^+ -насоса уравнивается потоками ионов, для которых мембрана хорошо проницаема, и эти потоки непосредственно не сопряжены с работой Ca^+ -насоса.

Механизм гидролиза АТФ

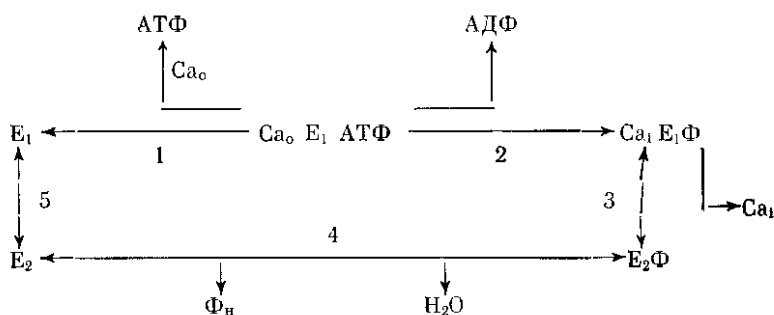
Как упоминалось выше, поглощение Ca^{2+} в СР сердца является энергозависимым процессом, и он стехиометрически сопряжен с гидролизом АТФ. Систему поглощения Ca^{2+} можно воспроизвести с помощью очищенного белка АТФазы скелетной мышцы и искусственной фосфолипидной мембраны [38, 78], причем считается, что АТФаза является не только переносчиком Ca^{2+} , но также преобразует химическую энергию в осмотическую. Для выяснения механизма транспорта Ca^{2+} через мембрану СР необходимо провести анализ элементарных стадий Ca^{2+} -зависимого гидролиза АТФ и сравнить их с элементарными стадиями транспорта Ca^{2+} . Современное обобщенное представление о механизме гидролиза АТФ АТФазой Ca^+ -насоса рассмотрено ниже.

Во время Ca^{2+} -зависимого гидролиза АТФ везикулами СР сердца конечная фосфатная группа АТФ встраивается в белок АТФазы [18, 20, 58, 79—82]. Для образования фосфофермента требуются АТФ и ионы Ca^{2+} в микромолярном диапазоне, свидетельствуя об участии высокоаффинных мест связывания для Ca^{2+} и АТФ, ответственных за активацию гидролиза АТФ (см. выше) [20, 58, 80] в фосфорилировании АТФазы. При варьировании концентраций Ca^{2+} и АТФ в относительно низком диапазоне концентраций можно наблюдать полный параллелизм между установленным уровнем фосфофермента и скоростью гидролиза АТФ [20], подтверждая, что фосфорилированный фермент является промежуточной стадией гидролиза АТФ. По своим химическим характеристикам такой фермент, выделенный путем добавления кислоты, соответствует ацилфосфобелку [20, 80]. Было показано, что в СР скелетной мышцы фосфорильная группа ковалентно связана с β -карбоксовой группой аспарагиновой кислоты [83]. Максимальное количество фосфофермента, образуемое в обычных препаратах СР сердца, которое может отражать количество белка АТФазы в препарате, сильно варьирует у животных разного вида, причем самая большая величина, равная 1,3 нмоль/мг белка, наблюдается в препаратах СР сердца собаки [18, 20, 80]. При дальнейшей очистке препаратов СР сердца голубя в градиенте плотности сахарозы после загрузки оксалатом Ca можно получить более высокий уровень фосфофермента, равный 2,45 нмоль/мг белка [17].

В результате изучения установившихся и транзиторных кинетических характеристик гидролиза АТФ мембранами СР сердца и скелетной мышцы и благодаря использованию различных мето-

конформационных изменений белка было обнаружено, что АТФаза за время катализа претерпевает ряд конформационных изменений [32, 46, 48, 62, 81, 84—86]. Результаты этих исследований могут быть кратко суммированы на схеме 12.1.

Схема 12.1



В этой схеме Ca_0 и Ca_1 относятся соответственно к ионам Ca^{2+} , расположенным вне и внутри везикул. Кальций, захваченный мембраной, также обозначается Ca_1 . Считают, что АТФаза может находиться в двух основных конформационных состояниях: E_1 и E_2 , причем первое (E_1 или $E_1\Phi$) имеет более высокое сродство к Ca^{2+} , а второе (E_2 или $E_2\Phi$) — более низкое. Ионы Ca^{2+} в микромолярном диапазоне концентраций стабилизируют конформационное состояние E_1 свободного фермента, а удаление Ca^{2+} из среды при низком рН и высокой температуре или добавление ванадата стабилизирует состояние E_2 свободного фермента [86, 87]. В физиологических условиях 2 моля Ca^{2+} и 1 моль $MgATP$ реагируют с 1 молем АТФазы (E_1) на внешней поверхности мембраны СР с образованием комплекса Михаэлиса (стадия 1). Образование фосфофермента типа E_1 ($E_1\Phi$) (стадия 2) сопровождается кратковременным захватом Ca^{2+} в связанном состоянии в центре переноса Ca^{2+} [88]. Молекула АДФ, не связанная с Mg^{2+} , освобождается на внешней стороне мембраны [89]. Таким образом, на этой стадии ион Mg^{2+} остается связанным с ферментом [93]. Затем $E_1\Phi$ превращается в фосфофермент типа E_2 ($E_2\Phi$) (стадия 3). $E_1\Phi$ представляет собой разновидность фосфофермента с «высоким уровнем энергии», так как она способна отдать свою фосфатную группу АДФ, добавленной в раствор, с образованием АТФ, а $E_2\Phi$ — разновидность фосфофермента с «низким уровнем энергии», потому что она не реагирует с АДФ, добавленной в среду. Следовательно, уменьшение сродства к Ca^{2+} сцеплено с превращением фосфофермента из «высокоэнергетического» состояния в состояние с «низким уровнем энергии». На стадии 4 $E_2\Phi$ распадается с образованием неорганического фосфата (Φ_n) и свободного фермента E_2 на внешней поверхности везикул СР. По-видимому, на этой стадии происходит освобождение Mg^{2+} , связанного с АТФазой. Затем E_2 превращается в E_1 , и каталитический цикл фермента завершается.

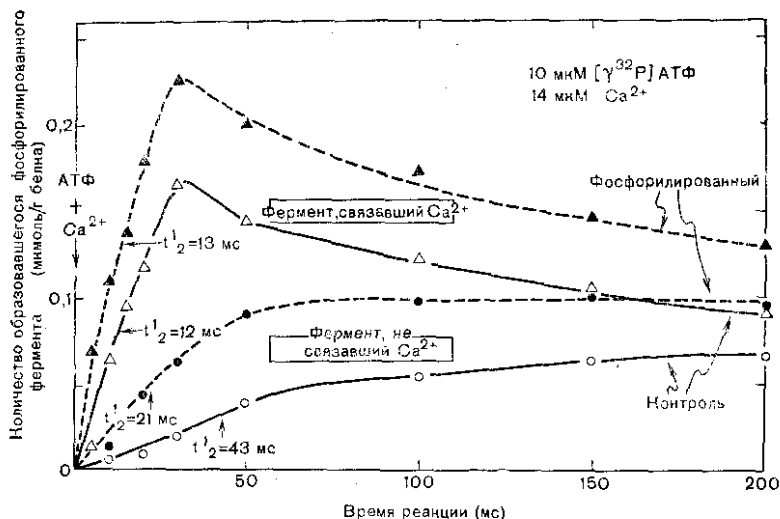


Рис. 12.4. Зависимость образования промежуточной формы фермента от времени реакции до (светлые символы) и после (темные символы) добавления в среду цАМФ-зависимой протеинкиназы. Треугольниками обозначено: начало АТФазной реакции, добавление АТФ к среде, содержащей СР и ионы Ca^{2+} ; кружками обозначен случай, когда в среде перед добавлением АТФ содержатся только везикул СР без Ca^{2+} . Конечная среда реакции содержала 10 мкМ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ АТФ и 14 мкМ ионизированного Ca^{2+} . Температура 22°C, pH 6,8. По [90].

Фосфорилирование фермента в везикулах СР сердца происходит очень быстро (рис. 12.4) [81, 90, 91]. Количество фосфофермента достигает максимума через 30 мс при 20°–22°C после добавления АТФ (10 мкМ) к везикулам СР сердца, находящимся в среде с Ca^{2+} . После достижения максимального уровня количество фосфофермента немного уменьшается, достигая установившегося уровня («овершут»). Освобождение F_n , напротив, развивается с существенной задержкой на период накопления фосфофермента, указывая, что F_n получается при распаде фосфофермента. Когда фосфорилирование фермента запускается путем добавления АТФ и Ca^{2+} в среду реакции, содержащую фермент и ЭГТА, то фосфорилирование происходит существенно медленнее и не наблюдается «овершута» (см. рис. 12.4). Эти эксперименты были проведены для того, чтобы показать, что превращение состояния E_2 в состояние E_1 (стадия 5), которое индуцируется ионами Ca^{2+} , является медленным процессом, определяющим скорость фосфорилирования фермента. Медленный переход из E_2 в E_1 (стадия 5) можно также проследить путем непрерывной регистрации изменений естественной флюоресценции фермента или флюоресценции флюоресцина, связанного с ферментом [86, 87, 92].

Распад фосфофермента ускоряется ионами Mg^{2+} или K^+ и ингибируется при высокой концентрации Ca^{2+} [18, 20, 32, 46, 65, 82]. При высокой концентрации Ca^{2+} (>1 мМ) угнетается превраще

ние E_1F в E_2F вследствие того, что связывание Ca^{2+} с низкоаффинным Са-связывающим центром ускоряет обратную реакцию на стадии 3, уменьшая таким образом концентрацию E_2F . Mg^{2+} ускоряет превращение E_1F в E_2F и гидролиз E_2F [84, 94]. В недавней работе [93] было показано, что Mg^{2+} , являющийся составной частью комплекса $MgATP$, связанного с центром связывания субстрата фермента, ускоряет распад фосфофермента.

Одновалентные катионы, как, например, K^+ , ускоряют гидролиз E_2F [94], сдвигая таким образом равновесие стадии 4 в сторону образования $E_2 + F_n$. В отсутствие K^+ гидролиз E_2F происходит очень медленно, и ограничивается общее время гидролиза ATP . При 100 мМ KCl , которые обычно содержатся в среде реакции при измерении поглощения Ca^{2+} и гидролиза ATP везикулами SR , гидролиз E_2F происходит значительно быстрее, чем превращение E_1F в E_2F [94, 95].

ATP в высоких концентрациях стимулирует промежуточные стадии гидролиза ATP [96]: происходит ускорение гидролиза E_2F и конформационного превращения E_2 в E_1 (стадия 5) [85, 94], свидетельствуя о том, что высокие концентрации ATP , по-видимому, дестабилизируют конформационное состояние E_2 -фермента. Скорее всего в таком действии высоких концентраций ATP принимают участие низкоаффинные места связывания ATP (см. выше) [35, 61, 85, 87, 94]. Следовательно, в физиологических условиях, когда концентрация Mg^{2+} , ATP и KCl высокие, гидролиз E_2F и превращение E_2 в E_1 происходят быстро и не могут лимитировать скорость всей цепи реакций. Вместо этого скорость всей цепи реакций в этих условиях может контролироваться превращением E_1F в E_2F (стадия 3). Было показано, что высокая концентрация ATP ускоряет образование фосфофермента [32].

На везикулах SR скелетной мышцы было показано, что приведенная выше последовательность реакций является полностью обратимой [32, 62, 85, 97]. Понижение концентрации Ca^{2+} в среде содержащей нагруженные ионами Ca^{2+} интактные везикулы SR путем добавления Са-хелатирующих агентов приводит к синтезу ATP из ADP и F_n , сцепленному с выходом Ca^{2+} . Синтез 1 моля ATP сцеплен с выходом 2 молей Ca^{2+} [98]. Для обращения транспорта Ca^{2+} требуется, чтобы в среде вне везикул присутствовали ADP , F_n и Mg^{2+} . Для того чтобы произошло обращение направления работы Са-насоса, необходимо, чтобы свободный фермент находился в конформационном состоянии E_2 . Следовательно, высокие концентрации ATP или концентрация Ca^{2+} в микромолярном диапазоне, стабилизирующие конформационное состояние E_1 , препятствуют обращению работы Са⁺-насоса. При реверсии насоса ATP -аза фосфорилируется F_n . Получающийся в результате фосфофермент реагирует с находящимся в растворе ADP с образованием ATP , что сопряжено с выходом Ca^{2+} . Фосфорилирование ATP -азы при взаимодействии с F_n происходит даже при утечке везикул SR или в случаях, когда они солюбилизованы до такой степени, что невозможно создание градиента концентрации Ca^{2+} относительно мембраны SR [62, 85, 99]. Однако получаемый в этом

случае фосфофермент не реагирует с находящимся в растворе АДФ, и АТФ не образуется. В этих условиях одновременное добавление к фосфоферменту Ca^{2+} и АДФ в высоких концентрациях приводит к синтезу АТФ [85, 100]. Концентрация Ca^{2+} , требуемая для синтеза АТФ, находится в миллимолярном диапазоне, т. е. Ca^{2+} скорее всего реагирует с низкоаффинным местом связывания на ферменте. Следовательно, реверсия гидролиза АТФ может быть достигнута без использования осмотической энергии, которая могла бы быть получена из градиента концентрации Ca^{2+} на мембране СР. Для синтеза АТФ в интактных везикулах СР градиент концентрации Ca^{2+} требуется, по-видимому, для создания высокой концентрации Ca^{2+} внутри везикул для насыщенности Ca^{2+} низкоаффинных мест его связывания, расположенных на внутренней поверхности [85].

Сравнение Са-насосов саркоплазматического ретикулума сердечной и скелетной мышцы

Как было описано в предыдущем разделе, механизмы поглощения Ca^{2+} и гидролиза АТФ в везикулах СР сердца в общем похожи на обнаруженные в везикулах СР скелетной мышцы. Однако в этих двух типах препаратов СР отмечаются и значительные различия: а) поглощение Ca^{2+} и гидролиз АТФ СР сердца происходит значительно медленнее, чем в препаратах СР скелетной мышцы [1, 45]; б) в мембранах СР сердца транспортом Ca^{2+} и гидролизом АТФ управляет специфический регуляторный механизм, имеющий важное значение и в физиологических условиях, и при действии фармакологических препаратов (см. ниже) [30]; в) белок АТФазы СР сердца иммунологически отличается от белка быстрой скелетной мышцы [27], что свидетельствует о возможных структурных различиях белков этих типов.

Для выяснения причины более медленного поглощения Ca^{2+} препаратами СР сердца было проведено сравнение стационарных АТФазных реакций, происходящих в препаратах СР сердца собаки и быстрой скелетной мышцы кролика в совершенно одинаковых экспериментальных условиях [20]. Гидролиз АТФ препаратами СР сердца при насыщающих концентрациях Ca^{2+} происходил в 3—6 раз медленнее, чем в препаратах СР скелетной мышцы, а при низких концентрациях Ca^{2+} (1—2 мкМ) скорости гидролиза отличались уже более чем в 10 раз. Изучение зависимости скорости гидролиза АТФ от концентрации АТФ показало, что величина K_m для АТФ в обоих типах препаратов СР были близки, в то время как максимальная скорость гидролиза АТФ в препаратах СР сердца была приблизительно в 4 раза меньше.

Максимальный уровень фосфорилирования фермента, отражающий плотность АТФазы в каждом из препаратов СР, также оказался приблизительно в 4 раза ниже в препаратах СР сердца собаки. Кроме того, концентрация ионизованного Ca^{2+} , вызывающая половину максимальной активации (K_{Ca}) АТФазы в препарате СР сердца собаки, оказалась в 3—4 раза выше, чем соот

ответствующая величина для K_{Ca} в препарате СР скелетной мышцы кролика. Эти результаты указывают, следовательно, что относительно более низкая скорость поглощения Ca^{2+} в СР сердца собаки в основном является следствием низкой плотности в них Ca^{+} -насосов и более низким сродством этих насосов к Ca^{2+} , а не более низкой скоростью оборота фермента. Можно добавить также, что оптимальная величина рН для гидролиза АТФ в препаратах СР сердца несколько сдвинута в щелочную сторону.

В дополнение к этим результатам, полученным при анализе стационарного гидролиза АТФ, установленные в последнее время кинетические данные для переходных процессов указывают на существование количественных различий констант скорости некоторых промежуточных стадий АТФазных реакций в этих типах СР [81, 101]. Когда АТФазная реакция запускается добавлением АТФ и Ca^{2+} в среду реакции, содержащей ЭГТА и фермент, фосфорилирование фермента происходит медленно, что отражает медленное конформационное превращение E_2 в E_1 (стадия 5 на схеме 1). Согласно оценкам, константа скорости превращения E_2 в E_1 в препаратах СР сердца собаки приблизительно в 5 раз меньше, чем в препаратах СР скелетной мышцы кролика. Однако скорости фосфорилирования в препаратах обоих типов одинаковы, если реакция запускается добавлением АТФ (10—50 мкМ) к везикулам СР, находящимся в среде с ионами Ca^{2+} , указывая на то, что стадии 1 и 2 на схеме 1 происходят с одинаковыми скоростями в препаратах этих двух типов.

Было показано, что диссоциация Ca^{2+} , связанного с белком АТФазы во время начальной фазы активации фермента, происходит в $1\frac{1}{2}$ раза медленнее в препаратах СР сердца собаки. Распад фосфофермента, измеримый в условиях, когда образование новых молекул фосфофермента предотвращено путем хелатирования Ca^{2+} , связывающегося с ЭГТА, в присутствии 3 мМ $MgCl_2$ и 100 мМ KCl , характеризуется сложным развитием во времени, но, по-видимому, немного медленнее происходит в препаратах СР сердца собаки. Эти кинетические данные, полученные в неустойчивых состояниях, будучи собранными вместе, показывают, что более медленное конформационное превращение E_2 в E_1 (стадия 5) в препаратах СР сердца собаки является основным наблюдаемым отличием. Различия скоростей этой стадии реакции может обуславливать более низкие скорости гидролиза АТФ и поглощения Ca^{2+} препаратами СР сердца при низких концентрациях АТФ. Однако при высоких концентрациях АТФ превращение E_2 в E_1 не может управлять скоростью всей реакции гидролиза, так как АТФ в высокой концентрации, по-видимому, ускоряет эту стадию реакции [85]. Следует добавить, что если фосфорилирование фермента (стадии 1 и 2) запускается путем добавления АТФ к ферменту, находящемуся в содержащей Ca^{2+} среде, то оно протекает значительно медленнее в препаратах СР сердца собаки, если в среде отсутствует KCl , чем если эта соль добавлена в количестве 100 мМ [91]. Такое влияние KCl не наблюдалось в препаратах СР скелетной мышцы кролика [89, 102].

РЕГУЛЯЦИЯ ПОГЛОЩЕНИЯ Ca^{2+} ВЕЗИКУЛАМИ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

В мембране СР сердца имеются регуляторные механизмы, в которых принимает участие специфический белковый компонент мембраны СР (фосфоламбан), служащий регулятором работы Ca^{2+} -насоса и, вероятно, играющий основную роль в передаче действия гормонов и лекарств на миокард.

Регуляция поглощения Ca^{2+} с помощью цАМФ

Фосфорилирование фосфоламбана. При инкубации мембран СР сердца с [γ - ^{32}P] АТФ и цАМФ в присутствии или в отсутствие цАМФ-зависимой протеинкиназы ^{32}P включается в состав мембраны СР [103—105]. Образование этого фосфопротеина не зависит от наличия ионов Ca^{2+} вплоть до концентрации, равной 0,1 мМ, но в значительной степени зависит от концентрации цАМФ в диапазоне 0,1—10 мкМ, причем половина максимальной активации происходит при 0,2 мкМ [104]. В отличие от фосфорилированной промежуточной формы АТФазы СР (см. выше) этот фосфопротеин проявляет характеристики устойчивости, свойственные фосфоэпирам, в которых фосфат преимущественно включается в остаток серина [104—106]. При гель-электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия большая часть метки ^{32}P оказывается связанной с белком, молекулярная масса которого составляет около 22 000 дальтон [105, 107]. Фосфорилирование белка с молекулярной массой 22 000 дальтон происходит также в препаратах СР сердца, которые были практически полностью очищены от остатков сарколеммной мембраны путем центрифугирования в градиенте плотности сахарозы после нагрузки оксалатом кальция [21]. Так как этот белок с молекулярной массой 22 000 дальтон специфически связан с функциональными изменениями СР (см. ниже), он получил название «фосфоламбан» благодаря своей способности фосфорилироваться в присутствии АТФ [107, 108]. В тех же условиях, в которых фосфорилируется фосфоламбан, происходит фосфорилирование нескольких других низкомолекулярных белков [30].

Фосфоламбан, являющийся кислым протеолипидом, содержит 40—45% гидрофобных аминокислотных остатков [29, 109, 110] и прочно связан с мембраной СР. Некоторая часть фосфоламбана выступает наружу на внешней поверхности мембраны везикул СР, на что указывают возможность пометить его с помощью [γ - ^{32}P] АТФ в присутствии цАМФ-зависимой протеинкиназы и исчезновение белка с молекулярной массой 22 000 дальтон при обработке протеолитиками, если этот белок не был фосфорилирован [107]. При фосфорилировании фосфорилированный участок фосфоламбана, возможно, перемещается внутрь мембраны, потому что обработка трипсином становится значительно менее эффективной [107].

Фосфоламбан не связывает йод, несмотря на то что содержит остатки тирозина, что указывает на расположение этих остатков внутри мембраны [11].

Хотя исходно фосфоламбан считался состоящим из одной полипептидной цепи, которая при электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия перемещается как один компонент с молекулярной массой 22 000 дальтон, добавление тритона X-100 или кипячение фосфорилированных мембран СР в растворе додецилсульфата натрия приводит к полному исчезновению фосфопротеина с молекулярной массой 22 000 дальтон и появлению фосфопротеинов с молекулярной массой 11 000 дальтон и даже с более низкой — от 5000 до 7000 дальтон [112, 113]. Пока не будет окончательно выяснена возможность олигомермономерной трансформации этого белка, эти результаты можно объяснить на основе данных, указывающих на существование на фосфоламбане двух различных участков фосфорилирования, которые фосфорилируются двумя различными протеинкиназами (см. ниже).

Между фосфоламбаном и белком АТФазы, по-видимому, происходит белок — белковое взаимодействие, зависящее от состояния фосфорилирования фосфоламбана [109, 114]. Если фосфоламбан фосфорилирован, то эти два белка остаются в связанном состоянии даже после солиubilизации мембран СР с помощью детергентов. И, наоборот, если фосфоламбан не фосфорилирован, то он легко отделяется от белка АТФазы при мягкой обработке детергентами. Стехиометрическое соотношение между количеством фосфоламбана и количеством белка АТФазы может равняться 1 : 1, так как максимальное количество фосфоламбана, фосфорилируемого в мембране СР, близко к той же величине для фосфорилированной промежуточной формы АТФазы [58].

Стимуляция поглощения Ca^{2+} . Скорость поглощения Ca^{2+} везикулами СР сердца в присутствии оксалата возрастает более чем вдвое, если перед этими измерениями фосфорилировать везикулы СР путем инкубации в среде с оптимальной концентрацией цАМФ и в присутствии цАМФ-зависимой протеинкиназы [19]. В везикулах СР, изолированных из быстрых скелетных мышц, не наблюдается такой стимуляции поглощения Ca^{2+} , а также отсутствует заметное фосфорилирование соответствующего белка [115]. Степень стимуляции поглощения Ca^{2+} везикулами СР сердца хорошо коррелирует с повышением уровня фосфорилирования фосфоламбана, но не коррелирует с фосфорилированием других белков [116]. Полученная из миокарда протеинкиназа (киназа II типа) вызывает такую стимуляцию, в то время как протеинкиназа из скелетной мышцы (киназа I типа) оказывает воздействие в значительно меньшей степени [104]. Если исследовать скорость поглощения Ca^{2+} везикулами СР сердца при различных концентрациях Ca^{2+} , то оказывается цАМФ-зависимое фосфорилирование фосфоламбана приблизительно в 3 раза снижает концентрацию Ca^{2+} , при которой наблюдается половина максимальной активации поглощения Ca^{2+} [19, 117]. Если фосфорилированные везикулы СР инкубировать с фосфопротеинфосфатазой,

выделенной из сердца быка, то большая часть фосфорилированного фосфоламбана дефосфорилируется [118, 119]. Дефосфорилирование приводит к полному исчезновению эффекта, вызванного протеинкиназой. При сравнении поглощения Ca^{2+} и фосфорилирования фосфоламбана в присутствии фиксированного количества протеинкиназы и различных количеств ингибитора протеинкиназы наблюдалась линейная связь между уменьшением поглощения Ca^{2+} и ингибированием фосфорилирования мембраны CP [120].

Катализируемое протеинкиназой фосфорилирование способно стимулировать транспорт Ca^{2+} и в отсутствие оксалата [57, 90]. В этих условиях эффект проявляется только в начальной фазе (до 300 мс) после начала реакции.

Влияние фосфоламбана на отдельные стадии гидролиза АТФ. Поглощение Ca^{2+} везикулами CP сопряжено с Ca^{2+} -зависимым гидролизом АТФ. Наблюдавшаяся стимуляция поглощения Ca^{2+} при фосфорилировании фосфоламбана может быть следствием либо увеличения числа оборотов АТФазы, либо повышением эффективности Ca^{+} -насоса, т. е. увеличения коэффициента сопряжения между поглощением Ca^{2+} и гидролизом АТФ. В действительности ускорение поглощения Ca^{2+} сопровождается увеличением скорости сопутствующего гидролиза АТФ, а стехиометрический показатель между количеством поглощенного Ca^{2+} и гидролизованного АТФ остается равным приблизительно 2 и после фосфорилирования фосфоламбана [19]. Наблюдаемые изменения кинетических свойств Ca^{2+} -зависимой АТФазы, вызванные фосфорилированием фосфоламбана, можно обсуждать, исходя из последовательности реакций, представленной на схеме 6. При фосфорилировании фосфоламбана активность АТФазы в присутствии насыщающих концентраций Ca^{2+} и АТФ возрастает без изменения уровня промежуточной фосфорилированной формы фермента [58], позволяя предположить, что увеличенная скорость гидролиза АТФ может быть обусловлена повышением числа оборотов промежуточной фосфорилированной формы фермента. В соответствии с этой точкой зрения после фосфорилирования фосфоламбана практически удваивается отношение скоростей гидролиза АТФ к уровням установившегося содержания фосфорилированной формы фермента, полученных при различных концентрациях Ca^{2+} (0,1—10 мМ), а также скорость гидролиза фосфорилированной формы фермента, измеренная непосредственно после прекращения образования новых молекул фосфофермента путем добавления Са-хелатирующего агента, практически удваивается [58]. На основании имеющейся в настоящее время схемы реакции Ca^{2+} -зависимой АТФазы (схема 12.1) увеличение скорости гидролиза фосфофермента может быть следствием ускорения либо стадии 3, либо стадии 4, либо стадии 5. Скорее всего ускорение происходит на стадии 3, так как она ограничивает скорость всей реакции при распаде фосфофермента в условиях наличия насыщающих концентраций Ca^{2+} , Mg^{2+} , и K^{+} (см. ниже). Таким образом, фосфорилирование фосфоламбана может стимулировать превращение E_1P в E_2P (стадия 3 на схеме 12.1).

Скорость образования промежуточной фосфорилированной формы фосфофермента значительно повышается при фосфорилировании фосфоламбана, если реакция инициируется добавлением АТФ и Ca^{2+} к среде реакции, содержащей ЭГТА и фермент (см. рис. 12.4) [90]. Однако такого сильного влияния на скорость образования фосфофермента не наблюдается, если реакцию инициировать добавлением АТФ к везикулам СР сердца в среду, содержащую Ca^{2+} . В первом эксперименте скорость образования фосфофермента ограничена превращением E_2 в E_1 (стадия 5 на схеме 12.1). Следовательно, фосфорилирование фосфоламбана ускоряет эту стадию реакции. Интересно отметить, что фосфорилирование фосфоламбана ускоряет две наиболее медленные стадии (3 и 5) в последовательности реакции гидролиза АТФ. Именно на этих стадиях происходят существенные изменения конформации фермента АТФазы и значительно изменяется сродство фермента к Ca^{2+} (см. выше). Как было сказано ранее, при фосфорилировании АТФазы, имеющей молекулярную массу 30 000 дальтон, Ca^{2+} взаимодействует с другой частью белка АТФазы с молекулярной массой 25 000 дальтон. Фосфорилирование фосфоламбана может непосредственно влиять на конформационное состояние части АТФазы с молекулярной массой 30 000 дальтон, что вызывает увеличение скорости перемещения Ca^{2+} через другую часть АТФазы [30]. Молекулярный механизм регуляции поглощения Ca^{2+} везикулами СР сердца при фосфорилировании фосфоламбана еще не установлен.

Кальмодулин-зависимая регуляция поглощения Ca^{2+}

Недавно было показано, что фосфат может связаться с фосфоламбаном в присутствии Ca^{2+} и кальмодулина [112, 121—123]. Утверждают, что такое фосфорилирование катализируется эндогенной протеинкиназой, связанной с мембраной СР сердца, которая активируется Ca^{2+} и кальмодулином. Фосфорилирование фосфоламбана с помощью кальмодулин-активируемой протеинкиназы происходит в остатке серина, отличающегося от фосфорилируемого цАМФ-зависимой протеинкиназой [110, 112]. Максимальное количество фосфоламбана, фосфорилируемого кальмодулин-зависимой протеинкиназой при оптимальной концентрации Ca^{2+} , составляющей 5—10 мкМ, приблизительно равно тому количеству, которое получается при фосфорилировании с помощью цАМФ-зависимой протеинкиназы [122]. Так как фосфорилирование, катализируемое этими двумя протеинкиназами происходит независимо, наблюдается дополнительное повышение уровня фосфорилирования фосфоламбана при инкубации везикул СР сердца в условиях, благоприятствующих проявлению активности протеинкиназ обоих типов [112, 121, 122].

Согласно сообщениям о фосфорилировании фосфоламбана при участии Ca^{2+} и кальмодулин-зависимой протеинкиназы, преинкубация везикул мембран СР с кальмодулином вызывает повышение скорости поглощения Ca^{2+} [112, 121—124]. Имеются сооб-

щения, что в отсутствие кальмодулинзависимого фосфорилирования фосфоламбана поглощение Ca^{2+} не усиливается цАМФ-зависимой протеинкиназой [112]. Однако в других работах показано, что опосредованное цАМФ усиление поглощения Ca^{2+} можно наблюдать и без кальмодулинзависимого фосфорилирования [121, 122]. Поглощение Ca^{2+} усиливается при работе любой из этих систем, и их влияние является аддитивным в соответствии с данными о том, что фосфорилирование под действием протеинкиназ этих двух типов происходит независимо и их эффекты накладываются друг на друга [121, 122]. Возможно, что концентрация Ca^{2+} , использовавшаяся в [124], была слишком высокой (0,1 мМ), чтобы обнаружить физиологические последствия регуляторного влияния Ca^{2+} на СР сердца. Стимулирующее действие можно наблюдать лишь тогда, когда концентрация Ca^{2+} находится в физиологическом диапазоне (0,1—10 мкМ) [121, 122]. Некоторые исследователи считают, что кальмодулин не влияет на активность АТФазы [112], другие утверждают, что при физиологических концентрациях Ca^{2+} (0,1—50,0 мкМ) кальмодулинзависимое фосфорилирование фосфоламбана вызывает увеличение скорости гидролиза АТФ [122, 123, 125]. Стехиометрия поглощенного Ca^{2+} на 1 моль гидролизованного АТФ не зависит от фосфорилирования фосфоламбана в присутствии Ca^{2+} и кальмодулинзависимой протеинкиназы [122, 123]. В настоящее время неясно, как связано стимулирующее действие кальмодулина с усилением поглощения Ca^{2+} и гидролиза АТФ везикулами СР сердца, опосредованными цАМФ.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Считают, что СР является основной системой, вызывающей расслабление миокарда млекопитающих [5—8]. Предполагают также, что СР является основным источником Ca^{2+} для сокращения (см. главу 11). Молекулярный механизм работы Ca^{2+} -насоса, определяющего расслабление миокарда, как показано в предыдущих разделах, довольно хорошо установлен. Ниже мы кратко обсуждаем физиологическое значение работы Ca^{2+} -насоса, изученного в изолированных фрагментах мембраны СР сердца.

Поглощение Ca^{2+} и расслабление сердца

В изолированной сократительной системе миокардиальной клетки полная активация достигается, когда в среде присутствуют 50—100 нмоль Ca^{2+} /г сырой массы мышцы, необходимые для связывания с сократительными белками [3, 126]. Однако в интактной миокардиальной клетке концентрация свободных ионов Ca^{2+} в миоплазме, достигаемая во время физиологического сокращения, по-видимому, значительно ниже необходимой для полной активации сократительной системы [127, 128]. В клетках сердца взрослой крысы или кролика механическое напряжение, согласно оценкам, составляет 70% от максимального механического напря-

жения [128]. Кроме того, в интактных клетках желудочка сердца кролика механическое напряжение, развивающееся во время ритмической однократной стимуляции с частотой 12/мин, составляет только 20% от максимума [128]. Согласно оценкам, приведенным в работе [126], для развития 70 и 20% максимального механического напряжения необходимо подать к миофибриллам сердца собаки соответственно 25,8 и 17,1 нмоль Ca^{2+} /г сырой массы мышцы.

АТФ-зависимое поглощение Ca^{2+} изолированными везикулами СР сердца изучалось как в присутствии Ca^{2+} -преципитирующих анионов, так и без них. Аккумуляция Ca^{2+} в отсутствие Ca^{2+} -преципитирующих анионов явно ближе к физиологической, потому что в условиях *in vivo* не обнаружены подобные захватывающие Ca^{2+} -механизмы, аналогичные возникающим при добавлении оксалата. Установившиеся уровни аккумуляции изолированными везикулами СР сердца, полученные при физиологических концентрациях Ca^{2+} в отсутствие Ca^{2+} -преципитирующих анионов, и величина максимального выхода везикул СР, выделенных из миокарда, позволяют оценить максимальную емкость СР *in vivo* для Ca^{2+} при соответствующих концентрациях Ca^{2+} . Оценки, полученные авторами работы [16], указывают, что СР сердца собаки способен аккумулировать Ca^{2+} в количествах, более чем достаточных для активации сократительных белков в соответствующих условиях. Следовательно, способности изолированных везикул СР аккумулировать Ca^{2+} могут вполне объяснить существование расслабленного состояния сердечной мышцы в установившихся условиях.

Однако не все еще ясно о соотношениях между количественными характеристиками скорости поглощения Ca^{2+} изолированными везикулами СР и скорости расслабления интактного сердца. Скорость поглощения Ca^{2+} везикулами СР сердца *in vitro*, измеренная в присутствии оксалата во временном диапазоне порядка минут, в 5—20 раз ниже необходимой для физиологического расслабления [45]. Однако в проведенных недавно экспериментах, в которых быстрое поглощение Ca^{2+} везикулами СР наблюдали методом остановки потока или гашения реакции, были получены другие результаты. Одна из групп исследователей сообщила, что количество Ca^{2+} , поглощенное везикулами СР сердца во временном интервале 0—150 мс, согласно измерениям методом остановки потока в присутствии мурексида, составляет 37 нмоль/мг белка при 37°C [49]. Если эту величину скорректировать на содержание СР в миокарде ($\approx 6,3$ мг/г сырой массы мышцы) [16], везикулы СР способны удалить из среды до 250 нмоль Ca^{2+} /г сырой массы мышцы в течение времени, необходимого для расслабления сердца (≈ 200 мс). Это количество Ca^{2+} значительно больше того, которое необходимо удалить из полностью активированной сократительной системы для достижения полного расслабления. Другая группа исследователей при использовании того же экспериментального метода отмечала скорость поглощения Ca^{2+} на 1—2 порядка меньше [129]. Однако следует отметить, что эксперимен-

тальные условия, использованные во втором случае, по-видимому, являются причиной очень маленькой скорости поглощения Ca^{2+} . Как видно из подписей к рисункам в [129], среда реакции не содержала ионов Mg^{2+} , которые имеют важное значение для создания оптимальных условий работы Ca^{2+} -насоса (см. выше).

Высокая скорость поглощения Ca^{2+} везикулами СР сердца была также измерена с помощью аппаратуры для быстрого гашения реакции, в которой предусмотрен хелатор Ca^{2+} для остановки реакции поглощения [57]. Количество Ca^{2+} , аккумулированного везикулами СР сердца при 0,2—18,9 мкМ Ca^{2+} в среде за первые 20 мс реакции поглощения, оказалось сравнимым с необходимым для активации изолированной сократительной системы при соответствующей концентрации Ca^{2+} . Хотя представленные выше данные не дают адекватного количественного описания процесса поглощения Ca^{2+} СР *in vivo* во время расслабления сердца, они согласуются с концепцией о ведущей роли СР в расслаблении миокарда млекопитающих, особенно если учесть, что митохондрии не поглощают значительного количества Ca^{2+} в физиологических условиях [5, 7, 51].

Физиологическое значение фосфорилирования фосфоламбана

Tada и соавт. [19, 107, 108] первыми предположили, что ускорение поглощения Ca^{2+} СР сердца, опосредованное цАМФ, позволяет объяснить два основных эффекта действия катехоламинов на механическую активность миокарда: укорочение систолы и увеличение сократимости. цАМФ-зависимое увеличение скорости поглощения Ca^{2+} СР способно объяснить укорочение систолы потому что Ca^{2+} будет удаляться с тропонина с повышенной скоростью. Увеличение скорости поглощения Ca^{2+} в результате фосфорилирования фосфоламбана может повысить количество Ca^{2+} запасаемого внутри СР, позволяя таким образом клетке удерживать некоторое дополнительное количество Ca^{2+} , который в противном случае был бы потерян в фазе диастолы. Этот дополнительный Ca^{2+} может увеличивать количество Ca^{2+} , которое может быть подано сократительным белкам при последующих сокращениях, способствуя, таким образом, увеличению сократимости миокарда [142].

Оказалось, что предложенная последовательность событий подтверждается результатами экспериментов на скринированных и интактных кардиомиоцитах. Катехоламины вызывают более раннее начало расслабления, после чего начинает возрастать сократимость [130]. Развитие процесса увеличения силы сокращения после добавления в среду катехоламинов происходит постепенно достигая установившегося уровня приблизительно через 20 сокращений [131]. В недавних исследованиях транзиторные изменения Ca^{2+} в интактном кардиомиоците изучали с помощью Ca^{2+} -чувствительного биолюминесцентного белка акворина и обнаружили, что катехоламины увеличивают начальную скорость

освобождения Ca^{2+} в цитоплазму в начале развития сокращения, а также скорость снижения концентрации Ca^{2+} при расслаблении [132]. Используя скинжированные кардиомиоциты, в которых наблюдаются циклы физических сокращений при добавлении в среду соответствующего количества Ca^{2+} , авторы работы [133] показали, что короткая преинкубация кардиомиоцитов с цАМФ приводит к увеличению амплитуды сокращений и повышению как скоростей развития сокращения, так и расслабления.

По-видимому, внутриклеточный уровень цАМФ возрастает до начала увеличения сократимости при действии катехоламинов на кардиомиоциты [134, 135]. Однако другие исследователи не обнаружили никакого заметного повышения цАМФ при увеличении сократимости, вызываемой катехоламинами, ковалентно связанными со стеклянными шариками [136, 137]. В настоящее время не известно, действительно ли незначительное повышение уровня цАМФ, которое может быть слишком маленьким, чтобы его можно было обнаружить, способно вызвать значительные изменения механической активности. С другой стороны, отсутствие связи между ипотропной реакцией и образованием цАМФ может отражать существование других участков действия катехоламинов на сарколеммальные системы, например на кальциевые каналы.

Показано, что формирование фосфоламбана происходит и в интактном сердце. Добавление изопротеренола в перфузионный раствор, содержащий ^{32}P , приводит к увеличению включения ^{32}P в микросомальный белок массой 22 000 дальтон (фосфоламбан), сопровождающемуся одновременным увеличением скоростей развития механического напряжения и расслабления [138, 143]. Интересно отметить, что степень фосфорилирования фосфоламбана и скорость поглощения Ca^{2+} значительно повышены в препаратах СР сердца, полученных из сердца крыс с гипертириозом [139]. Старение не влияет на степень ускорения поглощения Ca^{2+} СР при активации цАМФ-фосфоламбанной системы [140].

Кроме цАМФ-зависимого фосфорилирования фосфоламбана, имеет место еще один механизм фосфорилирования, катализируемый Ca^{2+} и кальмодулинзависимой протеинкиназой (см. выше). Фосфорилирование фосфоламбана при участии этой системы, по-видимому, также осуществляется в интактном сердце, так как ингибитор кальмодулина (флуфеназин) значительно снижает степень фосфорилирования фосфоламбана *in vivo* [138]. Так как поглощение Ca^{2+} изолированными везикулами СР сердца повышается, если задействована либо цАМФ-зависимая, либо кальмодулинзависимая система, и их действие аддитивно, то поглощение Ca^{2+} СР *in vivo* может разделяться этими двумя системами. Кальмодулинзависимое фосфорилирование фосфоламбана будет осуществляться при повышении внутриклеточной концентрации Ca^{2+} во время сокращения, увеличивая таким образом поглощение Ca^{2+} саркоплазматическим ретикуломом.

Следовательно, не исключена вероятность, что кальмодулинзависимая система может регулировать работу СР в каждом цикле сокращения.

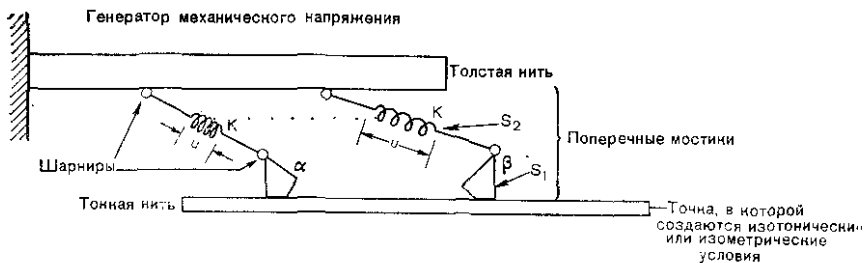


Рис. 13.1. Схема механизма работы поперечных мостиков (ПМ). Показаны два состояния: α — до поворота головки; β — после поворота головки. S_1 — головка ПМ, S_2 — растяжимый соединяющий элемент; K — константа жесткости S_2 , u — удлинение S_2 по сравнению с положением, когда развиваемая ПМ сила равна нулю. [10, 17].

результате поворота головки ПМ и последующего удлинения сегмента S_2 создается сила, перемещающая эти два массива нитей относительно друг друга.

Для простоты анализа в некоторых работах [8] (а также на рис. 13.1) допускается, что поворот каждого ПМ представляет собой двухступенчатый процесс: прикрепление и собственно поворот, однако с энергетической точки зрения [9, 10] поворот ПМ должен быть непрерывным процессом, состоящим из множества элементарных стадий, величина которого ограничена некоторым максимальным углом.

Теория прикрепления и поворота ПМ позволяет предугадать, что величина суммарной силы, развиваемая при их работе, и жесткость мышцы должны быть прямо пропорциональны количеству образовавшихся ПМ. Однако следует учитывать, что образовавшийся ПМ может не развивать никакой силы (т. е. головка ПМ может не повернуться в направлении, приводящем к возникновению силы, но остаться прикрепленной к актину, внося вклад в сопротивление мышцы растяжению или сжатию). В любом случае согласно наиболее распространенной в настоящее время рабочей гипотезе развития мышц механической силы величина активно развиваемой силы прямо зависит от количества связанных с актином поперечных мостиков.

СОТНОШЕНИЕ МЕЖДУ СИЛОЙ И ДЛИНОЙ МЫШЦЫ

Промежуточная и большая длина саркомера

При переходе на следующий уровень структурной организации мышцы — уровень саркомера оказывается, что развиваемая мышцей сила должна прямо зависеть от длины саркомера, если предположить, что она находится в прямой зависимости от числа поперечных мостиков, связанных с актином. Более строго развиваемая мышцей сила сокращения должна зависеть от объема зоны перекрывания нитей или от площади между перекрываю-

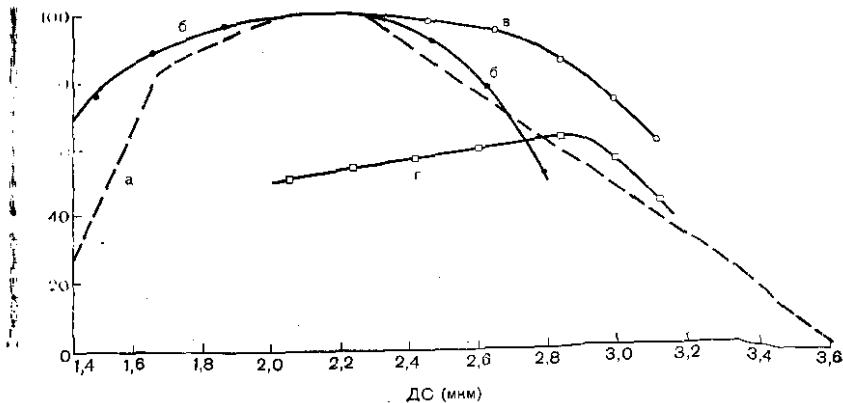


Рис. 13.2. Графики соотношения между напряжением (нормированным до 100% для различных мышечных препаратов) и длиной саркомера (ДС). а — скелетная мышца [11]; б — механически скиннированный кардиомиоцит крысы при тонической активации; малые значения ДС взяты из [105]; боковые — [13]; в — аналогичные данные для механически скиннированного кардиомиоцита собаки; г — механически скиннированный кардиомиоцит желудочка сердца крысы при неполной активации. Величины механического напряжения нормированы на максимальную величину активного напряжения (P_0) в соответствующих мышечных препаратах.

...исся участками толстых и тонких нитей саркомера. Оказыва-
... что в полностью активированном мышечном волокне такое
... положение выполняется (рис. 13.2, пунктирная кривая, а) в
... стной мышце [11, 12] в диапазоне длин саркомеров (ДС)
... 3,6 мкм, а также в миокарде [13] в таком диапазоне ДС, при
... ром еще не происходит сдавливания структурных элементов
... арда (см. рис. 13.2, кривые б и в). Измерение активной силы
... актных миокардиальных волокон существенно затруднено
...рым увеличением тонуса покоя при ДС больше 2,2 мкм (см.
... рис. 13.3, кривая з) и тем, что плато, при котором достигается
... максимум силы сокращения, является очень коротким. Однако
... при тонической активации скиннированных кардиомиоцитов плато
... активно развиваемого механического напряжения может быть
... очень протяженным (см. рис. 13.2, кривая б).

Такая простая связь между длиной участка перекрывания
... нитей и развиваемой мышцей силой вызвала сомнение некоторых
... авторов [14], которые, измеряя ДС с помощью метода дифракции
... лазерного луча, обнаружили положительный наклон зависимости
... силы от длины в скиннированных волокнах мышцы soleus кроли-
... ки при длине саркомера, превышающей 3 мкм (аналогично кри-
... вой г). Другие авторы [15], наоборот, обратив внимание на одно-
... родность саркомера, выявленную прямой микрофотографией скин-
... нированных волокон передней берцовой мышцы лягушки, обна-
... ружили линейное уменьшение силы в диапазоне ДС 2,2—3,6 мкм,
... что согласуется с полученными ранее данными на интактной
... мышце m. semitendinosus лягушки (см. рис. 13.2, кривая а) [11].

Глава 13

АКТИВНЫЕ И ПАССИВНЫЕ МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИОКАРДА

А. Дж. БРЭДИ (A. J. BRADY)

ВВЕДЕНИЕ

Одна из важнейших задач механики сердечной мышцы состоит в выяснении связи между сократительными свойствами миофибрилл и механическими свойствами всего сердца в целом. Представление о чисто геометрической связи является слишком поверхностным. Функционирование целого сердца до некоторой степени можно понять, изучая механические свойства длинных тонких папиллярных мышц или трабекул. Результаты такого одномерного анализа позволяют высказать некоторые предложения относительно функционирования всего сердца, представляющего собой трехмерную структуру. Было предпринято множество попыток сформулировать основные принципы работы желудочков сердца в терминах параметров «составляющих элементов», т. е. не зависящих от внешних воздействий, которые могут быть получены при изучении механических характеристик папиллярных мышц. Однако такой подход в общем оказался неадекватным, особенно при исследовании функциональных изменений сократимости целого сердца. Ошибки, возникающие при применении этого подхода, преимущественно являются следствием сложных геометрических взаимоотношений отдельных элементов, наблюдающихся в толстостенном желудочке, или неправильного описания одномерных механических свойств препаратов папиллярной мышцы или трабекулы. В этой главе в основном обсуждается описание функциональных связей между развиваемой препаратом силой и его длиной, которые могут служить основой формулирования конституциональных соотношений.

Зависимости сила — длина обсуждаются, в частности, в отношении связи между длиной саркомера или длиной мышцы и развиваемой при этом силой сокращения. Особое внимание уделялось факторам, оказывающим значительное влияние на развиваемую силу, как например, различная длина саркомеров в миокардиальном препарате, зависимость активации от длины, существование сил, восстанавливающих длину мышцы при расслаблении и влияние укорочения. Обсуждается также зависимость между силой и скоростью укорочения в миокарде в ее связи с ранними попытками использовать ее в качестве показателя сократимости. Наконец, вкратце обсуждаются методы ступенчатого изменения нагрузки и циклического изменения длины мышцы, так

как эти подходы помогают в какой-то мере изучить связь механических свойств миокарда с отдельными этапами процесса сокращения миокарда, исследованными при помощи биохимических методов.

РАЗВИТИЕ СИЛЫ СОКРАЩЕНИЯ

Широкое признание получила концепция скользящих нитей, предложенная авторами работ [1, 2] для объяснения механизма сокращения скелетной мышцы. Однако все еще спорным остается вопрос о том, образуются ли прочные связи между миозиновыми мостиками и актином или же между миофиламентами существует только электростатическое взаимодействие [3]. По-видимому, для сердечной мышцы приемлема концепция образования связей, являющаяся модификацией исходной модели [4]. Например, очевидно, что кинетика взаимодействия миофиламентов в скелетной и сердечной мышцах совершенно различны, но структура миофиламентов одинакова; основным инициатором сокращения является кальций, и многие механические свойства, относящиеся к развитию силы и укорочению, довольно близки в мышцах этих двух типов. Основываясь на имеющихся место близких характеристиках, целесообразно попытаться установить сходство и в процессе взаимодействия миофиламентов, происходящих в этих мышцах.

Объяснение развития силы на основе теории скользящих нитей с образованием связи между поперечными мостиками, как оно представлено в работе [5], сводится к следующему: кальций, освобождаемый из саркоплазматического ретикулума при возбуждении сарколеммы, взаимодействует с местами связывания на тропонине [6]. После этого в тонкой нити происходит перемещение тропомиозина относительно тропонина, так что головка (или головки) поперечного мостика (ПМ), образованная миозином толстой нити, связывается с актином (рис. 13.1). Такое связывание выражается в увеличении ригидности (сопротивление растяжению) мышцы, но не обязательно в возрастании активно развиваемой силы [7], где суммированы данные относительно отдельных стадий движения ПМ в цикле механического сокращения. После образования связей ПМ с актином механическое напряжение начинает активно возрастать лишь тогда, когда головки ПМ начинают поворачиваться относительно подвижной «точки» между сегментами S_1 и S_2 поперечного мостика (см. рис. 13.1). Во время такого поворота, сопровождающегося развитием силы и продольным перемещением миофиламентов, происходят, по-видимому, следующие два события: а — начинается процесс пространственного перемещения ПМ, приводящий к взаимодействию ПМ с местами связывания на актине [4]; б — поворот приводит к удлинению сегмента S_2 ПМ. В настоящее время существование такого сегмента S_2 с высокой растяжимостью (содержащий участок с α -спиралью, витки которой вложены один в другой) следует считать скорее гипотезой, чем реальностью. Этот вопрос обсуждается в работе [7]. Предполагается, что таким способом в

Отклонения от такой простой связи между длиной участка перекрывания и силой в этом диапазоне ДС четко выявляется при частичной активации миокарда (см. рис. 13.2, кривая г) [13, 16, 17] и скелетной мышцы [14, 18—20]. В этих случаях активно развиваемая сила продолжает возрастать при увеличении ДС до 3 мкм и лишь при большей ДС она начнет снижаться. Тот факт, что максимальная величина силы активно развиваемая мышцей при неполной активации достигается при длине перекрытия меньше оптимальной, ставит под сомнение простоту модели перекрывания и заставляет нас задуматься о других параметрах, определяющих прикрепление ПМ или развитие силы. В работе [13] обсуждается возможность возрастания чувствительности миофибрилл к Ca^{2+} при увеличении длины саркомера. Некоторые данные, подтверждающие это предположение, были получены недавно при исследовании интактной скелетной мышцы [21], в котором было показано, что максимальная активация миофибрилл скелетной мышцы ионами Ca^{2+} происходит на нисходящей части кривой зависимости силы от длины мышцы.

В любой мышце, включая сердечную, при полной активации (см. рис. 13.2, кривые б и в) плато развития активной силы наблюдается в диапазоне длин саркомера 1,8—2,2 мкм (или до 2,4 мкм в механически скиннированных волокнах скелетной мышцы и миокарда) [13, 15]. Реально зависимость силы от длины саркомера в механически скиннированных мышечных волокнах проходит выше аналогичной зависимости от интактных волокон при $\text{ДС} > 2,2$ мкм (см. рис. 13.2).

Максимальное механическое напряжение, развиваемое папиллярной мышцей, составляет 12 Н/м^2 ($1,2 \text{ кг/см}^2$) [22] по сравнению с $30\text{—}40 \text{ Н/м}^2$ в одиночных волокнах скелетной мышцы [11]. Однако если в поперечном сечении миокардиального волокна миофибриллы занимают относительно меньшую площадь [23], то максимальные способности миофибрилл этих двух типов мышц к развитию силы оказываются приблизительно равными.

Соотношения между силой и длиной при малой длине саркомера (закон Франка—Старлинга)

В миокарде при длине саркомера меньше 2,2 мкм происходит существенное изменение соотношения между силой и длиной (рис. 13.3), которое зависит от способа активации и величины укорочения мышцы, происходящего в ходе сокращения. Сравнивая кривую д (зависимость силы от исходной длины интактной папиллярной мышцы) с кривой е (зависимость силы от длины той же мышцы, но при постоянной величине ДС), легко обнаружить уменьшение силы сокращения, которое происходит в условиях так называемого «изометрического» сокращения (кривая д) [22]. Кривая ж отражает ту же зависимость в механически скиннированных волокнах желудочка сердца крысы, активируемых с помощью фазического вызванного ионами Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} а кривая б показывает реакцию того же самого препарата пр

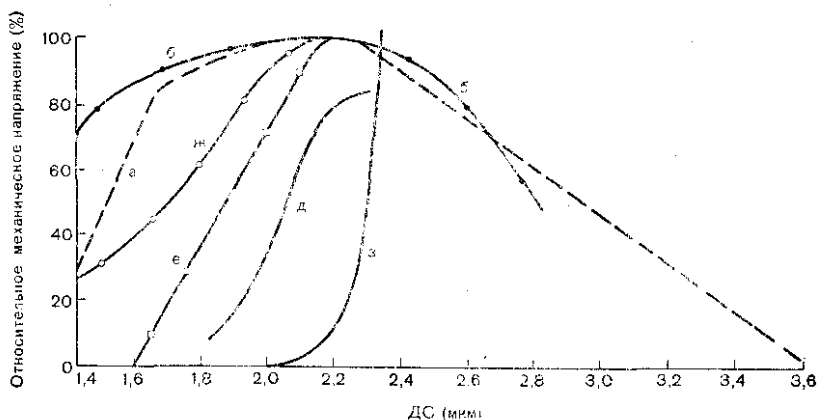


Рис. 13.3. Графики соотношения между напряжением и ДС для различных мышечных препаратов.

а — скелетная мышца [11]; б — механически синхронизированный кардиомиоцит желудочка сердца крысы (см. рис. 13.2); д — данные для тонкой интактной папиллярной мышцы, в которой ДС измеряли на максимуме изометрического сокращения (10); г-е — то же, что и на рис. д, но ДС поддерживали постоянной, контролируя его во время сокращения; ж — физическое сокращение механически синхронизированных кардиомиоцитов желудочка сердца крысы, вызванное с помощью активации Ca^{2+} — Ca^{2+} — освобождения [105]; з — данные для напряжения в состоянии покоя тонкой папиллярной мышцы крысы [54]. Величины механического напряжения нормированы на максимальную величину активного напряжения (P_0) в соответствующих мышечных препаратах.

тонической активации ионами Ca^{2+} . Кривая а, как и на рис. 13.2, показывает соотношение между силой и длиной в одиночном волокне скелетной мышцы в условиях тетануса. При сравнении четырех кривых, полученных на миокарде крысы, становится ясно, что полная сократительная способность миокардиального волокна существенно превосходит тот уровень механического напряжения, который наблюдается при изометрическом сокращении мышцы (кривая д).

Предполагают, что такое различие соотношений между силой и длиной, получаемое в разных условиях при длине саркомера меньше 2 мкм, связано с влиянием по крайней мере трех факторов: 1 — возможное ограничение уровня развиваемой силы в результате противодействия внешних и внутренних эластичных структур, затрудняющих укорочение мышцы; 2 — деактивация при укорочении, когда само активное укорочение способствует снижению способности мышцы к развитию силы [24]; 3 — зависимость активации от длины, примером чему служит уменьшение вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} из СР при фазическом сокращении механически синхронизированных одиночных кардиомиоцитов в случае малой длины саркомера [25].

Можно ожидать, что все три фактора существенно влияют на форму восходящей части соотношения Франка — Старлинга между силой и длиной. Однако все еще не известны величины относительного вклада каждого из этих факторов. Но так как в любом случае каждый из факторов, по-видимому, в какой-то мере влияет

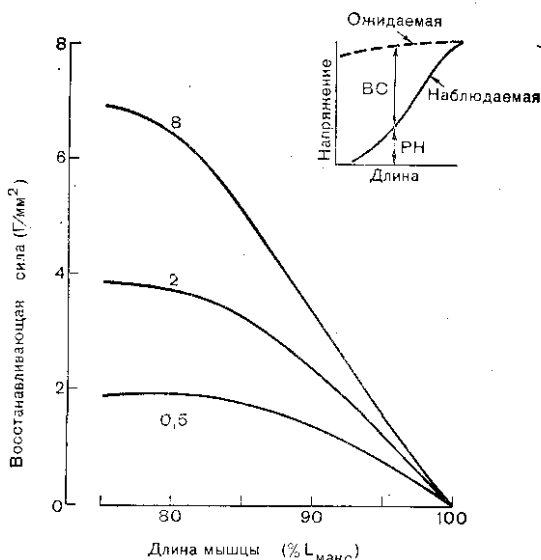
на сократительный ответ миокарда в диапазоне восходящей части соотношения между силой и длиной, рассмотрим их более подробно.

Восстанавливающие силы (внеклеточные). Активно укоротившиеся мышечные волокна (даже одиночные механически склинированные волокна) при расслаблении увеличивают свою длину, если длина саркомера была меньше 1,9 мкм. Следовательно, в структуре мышцы или внутри самих клеток имеются некоторые элементы, создающие восстанавливающие силы. В этом случае следует отметить, что по мере увеличения диаметра мышцы при активном укорочении в условиях постоянного объема внеклеточные структуры создают некоторое эластическое сопротивление, которое будет ограничивать величину силы, развиваемой волокном в продольном направлении. Кроме того, сжатие внеклеточного коллагена в продольном направлении при укорочении волокна также может способствовать снижению активной силы, действующей на окружающие клетки элементы. В работе [26] описана сеть микрофибрилл и микропитей, а также коллагеновых волокон, связывающих клетки миокарда крысы между собой. Авторы этой работы предположили, что эта сеть обладает способностью влиять на движение мышцы.

Однако если уменьшение силы при малой длине саркомера является следствием только противодействия восстанавливающих сил, то разность между максимумом механического напряжения при $L_{\text{макс}}$ и изометрическим сокращением при более коротких ДС будет показателем восстанавливающей силы (если предположить, что в диапазоне ДС 1,6—2,2 мкм между миофибриллами образуется одно и то же количество ПМ). Так как в этом случае восстанавливающая сила будет существенно зависеть от длины, можно провести коррекцию восходящей части кривой Франка—Старлинга с учетом зависимости восстанавливающей силы от длины для всех длин саркомеров. Авторы работ [27] осуществили проверку этой гипотезы (рис. 13.4), измеряя разность между максимумом силы при $L_{\text{макс}}$ и максимумом силы на восходящей части кривой при разных внеклеточных концентрациях Ca^{2+} . Они обнаружили, что эта разность (т. е. вклад восстанавливающей силы) зависит от Ca^{2+} .

Относительное сравнение минимальной длины саркомера, до которой могут укорачиваться многоклеточные препараты и препараты одиночных изолированных кардиомиоцитов без нагрузки, показывает, что вариабельность минимальных длин саркомеров папиллярной мышцы крысы и предсердных клеток лягушки в укорочению очень низка [22, 29, 30]. Например, папиллярная мышца крысы [22, 29, 30] и механически склинированные одиночные кардиомиоциты [25] способны укорачиваться в условиях сокращения без нагрузки до минимальной длины саркомера, равной 1,6 мкм. Имеется сообщение [31], что минимальная длина саркомера в сокращающемся без нагрузки препарате интактных trabeculae предсердия лягушки составляет 1,5—1,6 мкм, в то время как другие исследователи [32] показали, что укорочение может дохо

Рис. 13.4. Графики, показывающие величину восстанавливающей силы (ВС на вставке), необходимую для объяснения разницы между развиваемым напряжением (РН) и ожидаемой величиной при короткой длине мышцы. Кривые характеризуют зависимость восстанавливающей силы от концентрации Ca^{2+} . Числа на кривых обозначают содержание $[Ca^{2+}]_0$ (мМ). По [27].



доть до 1,45 мкм в очень мало нагруженных одиночных волокнах предсердий. В отличие от многоклеточных препаратов и одиночных кардиомиоцитов эти данные позволяют предположить, что пределы укорочения, по-видимому, накладываются внутриклеточными структурами, а не какими-либо препятствиями изменению диаметра или продольным сопротивлением укорочению. К аналогичным выводам пришли и другие авторы [33], наблюдавшие в клетках сердца цыпленка в культуре в покое некоторое количество скрученных волокон, которые выпрямлялись при сокращении, что указывает на существование внутренних восстанавливающих сил, при расслаблении способствующих возврату к длине в покое.

В работе [34] авторы наблюдали в скелетных мышцах, что миофибриллы сократившихся клеток, окруженные гелем, принимают извилистую форму при расслаблении, но снова выпрямляются при активации. Аналогичное явление наблюдали и в миокардиальных клетках [25, 36]. Таким образом, в сократившейся мышце действительно существуют восстанавливающие силы, но в основном они проявляются при малой длине саркомера и зависят от внутриклеточных структур.

Такие выводы не вызывают удивления, если учесть тот факт, что направление расположения коллагеновых волокон, по-видимому, преимущественно параллельно длинной оси клетки. Однако отсутствие эластических элементов, ориентированных по радиусу мышечной клетки, указывает на то, что коллагеновые волокна, вероятно, редко располагаются в поперечном направлении.

Внутриклеточные восстанавливающие силы. Одной из возможных причин возникновения восстанавливающей силы в интактной

сердечной мышце является сжатие сарколеммы, CP или митохондрий во время укорочения мышцы. Однако это кажется маловероятным при учете результатов упомянутого выше исследования, свидетельствующих о том, что расслабление с восстановлением исходной длины покоя наблюдается в скиннированных миоцитах даже после обработки Брий-58, который вызывает разрушение всех мембранных структур [25].

Fabiato, Fabiato [25] отмечали, что расслабление механически скиннированного одипочного кардиомиоцита желудочка сердца крысы при высокой степени активации ($pCa=6$) происходит в два этапа: первый компонент расслабления от $DC=1,1-1,57$ мкм продолжается 0,6 с, а более медленный компонент дальнейшего расслабления до $DC=1,91$ мкм — около 43 с. Так как в таком волокне нет никаких внешних сил, то восстанавливающие силы должны определяться структурами, лежащими внутри самого скиннированного волокна.

Цитируемые авторы попытались также измерить эту восстанавливающую силу, позволяя сократившейся клетке расслабиться при нагрузке, создаваемой датчиком напряжения. Измеренная величина восстанавливающей силы составила всего 4% от P_0 , однако результаты этого эксперимента до некоторой степени неточны, так как не ясно, не происходит ли в процессе расслабления изгибания некоторых миофибрилл, вследствие чего датчик напряжения не может измерить полную величину восстанавливающей силы.

Некоторые авторы высказывали мнение, что причиной быстрого спонтанного расслабления, происходящего в цикле сокращения интактного кардиомиоцита, являются внутренние эластические восстанавливающие силы. Однако так как скорость укорочения волокна при высоком уровне активации постоянна в диапазоне $DC=2-1,7$ мкм, они пришли к выводу, что постоянная скорость укорочения не зависит ни от какой чисто упругой восстанавливающей силы.

В любом случае величина восстанавливающей силы в скиннированных клетках, по-видимому, недостаточна для объяснения малого угла наклона восходящего участка кривой Франка — Старлинга. Однако пространственная структура скиннированных волокон выглядит более рыхлой, чем в интактных [25], поэтому на таких препаратах, вероятно, невозможно проводить точное измерение восстанавливающей силы. Прежде чем оценивать вклад этого компонента в соотношение Франка — Старлинга между силой и длиной, по-видимому, необходимо получить более точное количественное описание радиальных и продольных сил в миокардиальных клетках.

Деактивация при укорочении. Один из предполагаемых факторов, который может влиять на форму соотношения между силой и длиной, можно определить из наблюдения, что укороченно мышца вызывает уменьшение ее способности к развитию активного напряжения (или, другими словами, длительности периода активной генерации силы) в скелетной мышце [38—40] и в мио-

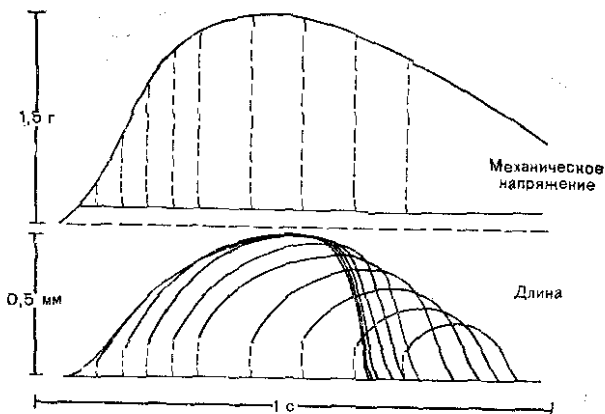


Рис. 13.5. Кривые механического напряжения (вверху) и изменения длины (внизу), полученные в эксперименте на папиллярной мышце кролика. В разные моменты времени после начала сокращения производили резкое расслабление мышцы до низкого уровня постоянной нагрузки. Обратите внимание на снижение способности мышцы к укорочению или поддержанию нагрузки (деактивация) после такого расслабления, т. е. если расслабление производили на ранней стадии развития сокращения, то уменьшался период активного укорочения или период активной генерации силы. По [106].

карде [24, 41—43]. На рис. 13.5 показано одно из возможных проявлений влияния укорочения на способность мышцы развивать силу. Эти результаты получены в экспериментах, в которых в разные моменты времени в течение сократительного цикла резко уменьшали нагрузку. Очевидно, что после такого резкого укорочения мышцы на ранней стадии развития силы в изометрическом режиме снижается способность мышцы к развитию активного напряжения по сравнению с тем, когда мышца остается в изометрическом режиме до поздней стадии цикла сокращения. Такая деактивация становится заметной сразу после начала укорочения, так как ее вызывает даже кратковременное укорочение (< 20 мс), которое оказывает влияние и после окончания данного сокращения. Деактивация при укорочении сильнее выражена при резком уменьшении нагрузки в более поздней стадии сокращения. Укорочение в течение первых $1/4$ — $1/3$ сократительного цикла мало влияет на последующее развитие силы или способность к укорочению, однако в течение фазы расслабления оно может привести к внезапному прекращению цикла сокращения, а также снизить уровень силы или способность к укорочению в ходе следующего цикла сокращения. Деактивация при укорочении, по-видимому, зависит от его величины, потому что скорость укорочения, вероятно, не влияет на сократительную способность мышцы в последующих циклах. По-видимому, основными факторами, определяющими развитие этого отрицательного инотропного эффекта, является величина укорочения и момент его начала в ходе цикла сокращения. Имеется сообщение [40], что Q_{10} для

эффекта деактивации в скелетной мышце приблизительно равен 1, и, следовательно, причины его появления заключены в самой структуре белков миофибрилл.

Деактивация при укорочении может в значительной степени влиять на форму соотношения между силой и длиной, особенно в миокарде. В большинстве многоклеточных миокардиальных препаратов наблюдается последовательная податливость, кроме того, как в многоклеточных, так и в одноклеточных препаратах под нагрузкой отмечается неоднородность длины саркомеров. Поэтому даже в изометрическом режиме саркомеры в какой-то степени укорачиваются (и/или удлиняются), что приводит к уменьшению максимального уровня развиваемой силы при таком «изометрическом» сокращении мышцы. В большинстве многоклеточных препаратов длина саркомеров в покое (т. е. длина без нагрузки) находится в пределах 1,9—2,2 мкм. Следовательно, развитие силы при средней длине саркомеров, равной допустим 1,6 мкм, требует существенного укорочения саркомеров, возможно, вызывая деактивацию, прежде чем сокращение переходит в изометрический режим с длиной саркомеров 1,6 мкм. Трудно оценить степень такой деактивации вследствие влияния упомянутых выше факторов, связанных с внутренней нагрузкой при укорочении и зависимости активации от длины (см. следующий раздел).

Некоторые данные о величине деактивации при укорочении были получены путем измерения развиваемой силы при малой длине саркомера [22] с использованием метода компенсации изменения длины саркомера с помощью экспоненциального контроля удлинения, аналогично методу, предложенному в работе [44]. Было обнаружено, что этот метод позволяет снизить последовательную податливость до 1—2% (с 5%), но максимальный уровень развиваемой силы и в этих условиях снижался при уменьшении длины саркомера даже при таком минимальном укорочении. На основании этого был сделан вывод, что деактивация при укорочении не является основным фактором, определяющим форму восходящей части соотношения между длиной и силой.

Таким образом, мы не располагаем достаточным числом экспериментальных данных для определения надежного показателя вклада деактивации при укорочении в наклон кривой Франка — Старлинга, но, по-видимому, это явление играет существенную роль.

Зависимость активации от длины. Для рабочего диапазона ДС в миокарде (т. е. 1,6—2,2 мкм) представления о связи между степенью перекрытия миофибрилл и активным развитием силы все еще остаются неопределенными как в случае миокарда, так и для скелетной мышцы. Совершенно ясно, что в препаратах всех типов (от интактных многоклеточных препаратов до глицеринизированных миофибрилл при постоянной длине) активное развитие силы снижается при длине саркомера меньше 2 мкм. И в первых вариантах гипотезы скользящих нитей [11] и в ее модификациях [15] предполагалось, что уменьшение развиваемого механического напряжения при малой длине саркомера (1,6—2 мкм

связано с упругим взаимодействием между тонкими нитями в участке перекрывания, создающим сопротивление укорочению, и с нарушением прикрепления толстых нитей к z-дису при ДС меньше 1,6 мкм. Согласно этой схеме, общая величина силы, развиваемой ПМ, уменьшается незначительно, но суммарная сила, развиваемая саркомером, снижается в результате увеличения влияния упругих взаимодействий между тонкими нитями саркомера. Такая интерпретация была поставлена под сомнение при обнаружении, что саркомеры, расположенные ближе к центру миофибрилл в мышечном волокне, при сократительных ответах принимают извилистую форму, и что она исчезает при тетанической стимуляции или в присутствии кофеина [45, 46]. Эти данные позволили предположить, что при малой ДС активация изменяется градуально, и что уменьшение активного развития силы при малой ДС может быть обусловлено уменьшением силы, создаваемой ПМ (т. е. уменьшением количества ПМ, связанных с актином). Такое объяснение получило дальнейшее подтверждение как в скелетной мышце [21], так и в миокарде в результате экспериментов, в которых наблюдали уменьшение количества Ca^{2+} , освобождаемого из СР при более коротких длинах саркомера [25].

При дальнейших попытках подтвердить концепцию зависимости активации от длины [47] обнаружилось, что кривая зависимости напряжения от рСа в химически скиннированных трабекулах сердца крысы сдвинута вправо на 0,2 единицы рСа при длине саркомеров 1,9—2,04 по сравнению с тем, когда их длина находится в пределах 2,3—2,5 мкм. В скиннированных кардиомиоцитах Fabiato [48] также обнаружил прямую связь между ДС в диапазоне 1,8—2,3 мкм и количеством Ca^{2+} , освобождаемого из СР при Ca^{2+} — Ca^{2+} освобождении (определяемом с помощью арсеназо-III). Результаты этих двух работ позволяют предположить, что в мышце при короткой длине саркомеров происходит как уменьшение освобождения Ca^{2+} , так и снижение чувствительности миофибрилл к Ca^{2+} .

Однако общая картина все еще остается неясной. Обнаружилось [49], что при постоянной концентрации Ca^{2+} как в интактных волокнах скелетной мышцы в условиях тетануса, так и в случае скиннированных волокон восходящая часть зависимости между силой и длиной имеют сходную форму. На основании этого был сделан вывод, что зависимое от длины изменение количества Ca^{2+} -активатора не играет ведущей роли в определении формы восходящей части кривой. Такая интерпретация подтверждалась наблюдением [17] о том, что максимум излучения акворина уменьшается градуально при уменьшении длины саркомера от 2,4 до 1,4 мкм. Однако другие авторы [21] указывают, что вызываемая Ca^{2+} активация (измеряемая по флюоресценции акворина) миофибрилл скелетной мышцы действительно уменьшается при более короткой длине саркомера и достигает максимума в нисходящей части кривой соотношения между длиной и силой (ДС=3—3,2 мкм).

По-видимому, самая современная гипотеза, объясняющая явную зависимость развиваемой силы от длины, может быть сформулирована на основе недавней работы [50], авторы которой показали, что при увеличении длины миокардиального препарата млекопитающих (80—100% $L_{\text{макс}}$) уменьшается длительность сигнала флюоресценции акворина. Полученные результаты позволили предположить, что при увеличении развиваемой силы увеличивается связывание Ca^{2+} с тропонином. Авторы этой гипотезы указали, что увеличение константы связывания Ca^{2+} с тропонином при повышении развиваемой мышцей нагрузки должно приводить к повышению крутизны зависимости механического напряжения от $p\text{Ca}$ [51], а также способно объяснить сдвиг зависимости напряжения от $p\text{Ca}$ вправо, отмеченное авторами работы [47]. Такой механизм позволяет объяснить все полученные данные в отличие от гипотезы зависимости вызванного Ca^{2+} освобождения Ca^{2+} от длины [25], на основании которой нельзя достаточно хорошо объяснить ни относительного постоянства амплитуды сигнала флюоресценции акворина при изменении длины мышцы, отмеченное в [50], ни малую крутизну соотношения между напряжением и длиной, наблюдаемую в тонически активированных скиннированных кардиомиоцитах (см. кривую б на рис. 13.3). Авторы работы [52] также отвергли представление о том, что медленное увеличение механического напряжения, вызываемое в папиллярной мышце сердца кошки при изменении длины и устраниваемого кофеином, основано на увеличении освобождения Ca^{2+} из CP .

Очевидно, что имеющиеся данные противоречивы, и нет достаточных оснований для разработки детального механизма зависимости активации от длины, поэтому мы пока еще не можем описать это явление подробно. К настоящему времени можно считать, что зависимость активации сокращения от длины необходимо учитывать при любой попытке оценить эффективность механической работы сердца.

Сравнение соотношений сила — длина для длины саркомера и длины мышцы

В качестве примера проблемы, возникающей при сравнении данных, основанных на измерении длины саркомера, с данными, полученными при измерении длины всей мышцы, рассмотрим следующие наблюдения. В работе [53] авторы измеряли длину саркомеров в тонких папиллярных мышцах сердца крысы с помощью прямой микрофотографии. Средняя длина саркомера при $L_{\text{макс}}$ была равна 2,23 мкм. Хотя общая длина мышцы поддерживалась равной $L_{\text{макс}}$, но при таком «изометрическом» сокращении средняя длина саркомеров во всей массе мышцы уменьшилась до 1,98 мкм (укорочение на 11%). При 0,75 $L_{\text{макс}}$ в ходе изометрического сокращения длина саркомеров уменьшалась на 3—6%. В некоторых точках между этими крайними значениями фиксированной длины укорочение саркомеров достигало 15% при по-

стоянной длине мышцы в целом. Аналогичные результаты были получены и другими авторами [54], которые обнаружили, что около 40% такого изменения длины можно объяснить податливостью на концах мышцы, а остальная часть изменений является следствием неоднородности внутри массы ткани.

Таким образом становится ясно, что предположение о постоянстве длины саркомера или постоянной степени перекрывания миофибрилл в условиях «изометрического» сокращения всей мышцы является неверным. Более того, если попытаться сделать какой-либо вывод относительно взаимодействия миофибрилл на основе измерений, проведенных на многоклеточном препарате или же попытаться определить сократительную активность папиллярной мышцы или целого сердца, исходя из свойств миофибрилл, то следует каким-либо образом учесть сложную структуру этих тканей и ее неоднородность.

Неоднородность длины саркомеров и сегментарная неоднородность. Так как практически все эксперименты по измерению силы, развиваемой миокардом, осуществлялись на многоклеточных препаратах, было общепринято, что длина мышцы является синонимом длины саркомера. Лишь в последние годы исследователи заинтересовались явлением, теперь хорошо установленным, что длина саркомеров, особенно в препарате миокарда, может существенно варьировать от сегмента к сегменту и даже от клетки к клетке. Таким образом, изучаемое в таких препаратах соотношение между силой и длиной реально отражает лишь соотношение между силой и средней длиной саркомеров, которое нельзя прямо интерпретировать в терминах степени перекрывания миофибрилл. В нескольких последних работах приведены данные о степени неоднородности длины саркомеров в миокарде [53—58]. В этих исследованиях показано, что постоянство длины саркомеров наблюдается только в пределах сегментов, имеющих разную длину. В концевых участках этих препаратов податливость составляла около 7%, но и внутри массы мышцы наблюдалась существенная неоднородность.

Для преодоления неоднородности препарата при изучении связи между силой сокращения и степенью перекрывания миофибрилл сейчас предложено несколько методов. В качестве меры длины саркомера использовали линию первого порядка дифракции изучения лазера на саркомерах в некотором специально выбранном сегменте тонкой папиллярной мышцы крысы, однородно укорачивающемся в ходе развития сокращения [22]. Положение этой дифракционной линии использовали в качестве чувствительного элемента в системе обратной связи для контроля длины сегмента. Авторы работы [59] вставляли внутрь сегмента папиллярной мышцы в поперечном направлении тонкие иглоочки и использовали их проекцию на светочувствительный элемент для контроля длины сегмента. Bradi [44] попытался определить вклад последовательных упругих компонентов папиллярной мышцы (включая податливость на концах) с помощью метода быстрого растяжения мышцы и затем использовал полученные соотношения

между нагрузкой и растяжением для этих упругих элементов для управления устройством с линейным перемещением, прикрепленным к мышце. Все эти методы позволили существенно уменьшить вклад упругих элементов (до 1,5—2%) и получить более широкое плато на соотношении между активно развиваемой силой и длиной. В этих исследованиях длина саркомера при оценке соотношения между длиной и силой контролировалась на более высоком уровне, но это не решило проблемы относительно того, что для измерения силы сокращения при малой длине саркомера последний должен активно укоротиться (а значит, должна развиваться некоторая степень деактивации). Таким образом, описанные выше методы не были эффективными для объяснения основных механизмов возникновения восходящей части соотношения Франка — Старлинга между силой и длиной.

Вместе с тем длина саркомеров в свободно сокращающемся изолированном одиночном кардиомиоците незначительно варьирует даже во время сокращения [25, 37, 60—62]. Это наблюдение указывает на то, что либо в многоклеточном препарате существует специальный коллагеновый матрикс, внутри которого закреплены отдельные клетки, либо наложение механических ограничений (например, завязок, зажимов), либо оба эти фактора вместе вызывают неоднородное распределение напряжения в ткани во время сокращения. Однако имеется сообщение о высокой степени неоднородности распределения длин саркомеров и в покоейся папиллярной мышце [55]. Следовательно, внеклеточные структуры в миокардиальной ткани, по-видимому, могут создавать неоднородность как в сокращающейся мышце, так и в мышце в состоянии покоя.

ВЯЗКОУПРУГИЕ СВОЙСТВА СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

Интерпретация сократительной активности миокарда, включая многочисленные инотропные состояния, требует оценки вязкоупругих свойств мышцы в покое и при активации. Длина мышцы в покое предопределяет амплитуду последующего сократительного ответа, однако длина в покое в многоклеточном препарате и в целом сердце определяется вязкоупругими свойствами как самих клеток, так и внеклеточного матрикса.

Значительное влияние на длину саркомера и внешнее проявление развиваемой мышцей силы оказывают пассивные составляющие сократительных ответов миокарда, зависящие от времени и от скорости развития реакции. Наиболее сложным для описания вязкоупругим компонентом активного состояния мышцы является расслабление, при котором уменьшение силы во времени характеризуется несколькими экспонентами. Однако этот процесс хорошо поддается изучению при помощи метода быстрых изменений нагрузки, который будет обсуждаться в соответствующем разделе. В состоянии покоя мышцы расслабление относительно более просто, так как возникающие при этом силы невелики,

нако в реальных условиях такое расслабление необходимо учитывать при анализе результатов, и постоянные времени его развития обычно отличаются от постоянных времени расслабления мышц в активном состоянии. Ползучесть мышцы («крип») является одним из свойств, которые необходимо учитывать при попытках определить длину саркомера в течение длительного времени (см. раздел «Вязкость и ползучесть»). Все эти признаки были количественно описаны в различных препаратах [63], но пока еще получены очень немногочисленные сведения относительно структурных и молекулярных основ этих явлений. Следовательно, можно лишь описать их и рассмотреть взаимосвязь с сократительными ответами. Вязкоупругие свойства и ползучесть миокарда в пассивном состоянии будут обсуждаться в разделе «Напряжение покоя».

Механические эквивалентные цепи

При рассмотрении связи между пассивным напряжением покоя и активно развиваемой силой вопрос о возможности определения амплитуды активного напряжения путем простого вычитания напряжения покоя из суммарного механического остается нерешенным. Анализ этого явления предполагает, что эти две силы включены параллельно. Но в общем неизвестно соответствует ли это действительности. При наличии возможности оценить растяжимость на концах мышечного препарата, как это было сделано в цитированных выше работах [53, 54], выяснилось бы, что простая аддитивная связь между напряжением покоя и активным напряжением неверна вследствие того, что пассивные параллельные упругие элементы в массе мышцы при активном сокращении не будут нагруженными, в то время как упругие элементы на концах мышцы окажутся под большой нагрузкой. Чтобы измерения активной силы были достоверны, необходимо знать механическую связь между этими двумя пассивными компонентами. Известно, кроме того, что активное развитие силы значительно зависит от длины саркомера в рабочем диапазоне длин, поэтому для установления связи между величиной активной силы и длиной саркомера необходимо знать его точную длину. Однако учитывая наличие упругих элементов на концах мышцы и неоднородность распределения нагрузки в массе ткани при сокращении, длина саркомеров в препарате, по-видимому, варьирует в разных участках. Кроме того, как было сказано выше, имеются сообщения, что укорочение или увеличение длины саркомера во время активного развития силы сокращения влияет на последующую сократимость. Все эти факторы будут влиять на функцию образования (или функциональную связь), которую мы должны разработать для описания связи между механической активно миофибрилл и, например, поведением папиллярной мышцы или работой целого сердца.

За последние два десятилетия получено много данных относительно решения этих проблем. И хотя мы не можем утверждать

дать, что для миокарда удалось вывести идеальную единственную функцию преобразования, в настоящее время опровергнута справедливость многих выдвинутых ранее упрощений, используемых при моделировании, и более ясно определены виды экспериментов, которые необходимо осуществить.

В последние годы проведена оценка большого числа механических эквивалентных цепей с целью определения единственного аналитического выражения, позволившего бы интерпретировать соотношение между развиваемой миофибриллами силой и длиной саркомера в терминах механических параметров, измеряемых на концах мышцы. Обычно в таких моделях игнорируются вязкостные свойства, и они чаще всего описывают незатухающие упругие реакции препарата. В этом смысле имеющиеся модели отражают только мгновенные упругие свойства мышцы. Некоторые более сложные модели учитывают демпфирующие элементы, но включение этих дополнительных элементов в модель настолько увеличивает число параметров, что невозможно экспериментально проверить все получаемые в модельных расчетах характеристики препарата. Так как вязкость мышцы нельзя исключить из рассмотрения, феноменологические попытки ее моделирования не дадут никаких преимуществ до тех пор, пока не будут идентифицированы структуры, обуславливающие вязкость. В любом случае описанные ниже модели основаны на данных, полученных методом быстрого изменения нагрузки (быстрое растягивание и освобождение мышцы), и не учитывают вязкие компоненты.

В первую очередь необходимо рассмотреть классическую трехэлементную модель А. Т. Hill [64] (т. е. так называемую модель Maxwell), которая предполагает, что напряжение покоя обусловлено пассивными упругими элементами (Пар Э), которые растянуты напряжением покоя и поэтому определяют исходную длину саркомеров. Предполагается также, что существуют дополнительные пассивные упругие элементы (Пос Э), выявляющиеся при активном состоянии мышцы, включенные последовательно с элементами мышцы, генерирующими силу. Наиболее ярко такие последовательные упругие компоненты могут быть продемонстрированы при резком уменьшении нагрузки мышцы до нуля во время сокращения [65]. Таким образом было показано, что в многоклеточных миокардиальных препаратах растяжимость Пос Э составляет около 5% от L_0 [22, 66]. Жесткость Пар Э варьирует в довольно широких пределах в зависимости от вида животного. Относительно невысокой жесткостью обладает миокард лягушки при длине саркомеров 3—3,6 мкм [13], а миокард желудочков крысы характеризуется исключительно большой жесткостью Пар Э, так что напряжение покоя при $DC=2,8$ мкм может быть равным величине активной силы [13].

Модель, предложенная Hill, была очень популярной вследствие того, что позволяла рассчитать величину активного напряжения путем простого вычитания зависимости напряжения покоя от длины из зависимости полной силы от длины. Однако очевидно

что такая простая эквивалентная схема имеет существенные недостатки, в частности, в случае использования препарата, имеющего высокую растяжимость на концах или в местах прикрепления мышцы.

Учитывая роль такой концевой растяжимости, можно предложить другую трехэлементную модель, так называемую схему Войгта, при которой как нагрузка покоя, так и активная сила сокращения оказываются приложенными к последовательному упругому элементу (Пос Э). Интерпретация соотношения между силой и длиной для миофибрилл в терминах этой эквивалентной схемы приводит к получению характеристик взаимодействия миофибрилл, которые отличаются от получаемых с помощью схемы Максвелла, если предположить высокую жесткость строго взаимодействия миофибрилл, т. е. допустить высокую жесткость сократительных элементов при кратковременных быстрых воздействиях [44, 67, 68]. Fung [69] выразил несогласие с этим мнением, считая что эти модели ничем не отличаются друг от друга. Однако ни в одной из этих моделей не учитываются дополнительные упругие компоненты, создаваемые поперечными мостиками.

Bradi и соавт. [70] рассмотрели большое число механических эквивалентных схем и попытались описать уникальную схему подключения упругих компонентов, включая параллельную и последовательную упругость ПМ, величину которых можно оценить для данного препарата миокарда. Они использовали соотношение между жесткостью и силой при различной исходной длине мышцы для описания упругих реакций папиллярной мышцы кролика [71]. Для определения упругости ПМ, а также характеристики пассивной упругости мышцы применяют метод быстрого изменения нагрузки на время 1—2 мс. Модель трех упругих элементов с сосредоточенными параметрами дала возможность адекватно описать упругие свойства папиллярной мышцы в функциональном диапазоне ее длины (0,75—1,05 $L_{\text{макс}}$). Однако в таких препаратах была обнаружена значительная вариабельность свойств отдельных сегментов, на что указывало движение непрозрачных микросфер, помещенных в сосудистое русло папиллярной мышцы до начала эксперимента.

Интересно, что в результате анализа результатов изучения соотношения между жесткостью и силой в рамках модели, представленной системой из двух популяций саркомеров с различными свойствами, сосредоточенных в двух сегментах (рис. 13.6 правая схема), получается то же аналитическое описание, которое может быть получено при использовании трехэлементной системы со средоточенными параметрами (рис. 13.6, слева). Другими словами, коэффициенты упругости для Пар Э, Пос Э и поперечных мостиков можно вывести на основании результатов экспериментального исследования соотношения между жесткостью и силой при использовании любой из описанных выше моделей (сосредоточенными или распределенными параметрами). Таким образом, без независимого измерения движения сегментов во время сокращения невозможно определить, какая из эквивалентных схем

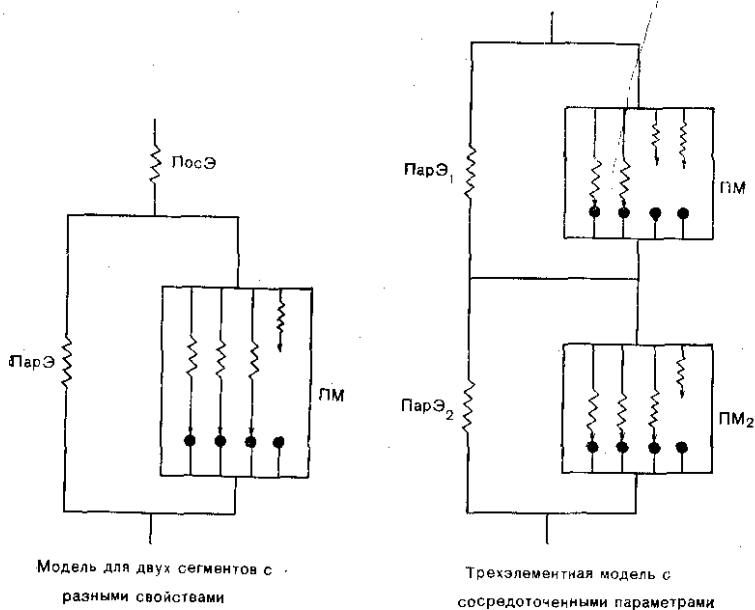


Рис. 13.6. Механическая трехэлементная эквивалентная схема с сосредоточенными параметрами (слева) и двухсегментная четырехэлементная эквивалентная схема с распределенными параметрами (справа) для пиллярной мышцы.

ПарЭ — параллельный упругий элемент; ПосЭ — последовательный упругий элемент; СЭ — сократительный упругий элемент, соответствующий поперечным мостикам. Индексы 1 и 2 на эквивалентной схеме с распределенными параметрами обозначают два различных набора элементов, которые могут обладать разными свойствами. По [70].

соответствует данному препарату. Очевидно, что такая неопределенность не позволяет интерпретировать взаимодействие миофибрилл на основании измерений на целой мышце с неоднородностью распределения свойств саркомеров.

Напряжение покоя

Внеклеточные источники. Так как коллагеновый матрикс, в который погружены миокардиальные клетки, образует вокруг них трехмерную структуру, последняя, обладая некоторой упругостью, способна вносить вклад в напряжение покоя, препятствуя растяжению мышечных волокон в продольном направлении. При укорочении мышцы такая структура может создавать восстанавливающую силу. Определенный вклад в напряжение покоя при растяжении мышцы могут также вносить мембранные структуры (сарколемма, СР, митохондрии) и промежуточные волокна. Существование методов выделения одиночных интактных миоцитов из миокарда животных нескольких видов и способов частичной экстракции клеточных компонентов позволяет сравнить соотно-

шения между длиной и напряжением в одиночных клетках, многоклеточных препаратах и препаратах с частично экстрагированными клеточными компонентами для животных одного и того же вида. Роль этих компонентов будет обсуждаться ниже.

Вклад внеклеточных структур, обладающих упругостью, в развиваемое мышцей напряжение привлекает в последние двадцать лет пристальное внимание исследователей. При малой длине саркомеров напряжение покоя сердечной мышцы имеет большую величину, чем в скелетной мышце, поэтому сеть коллагеновых волокон вокруг клеток является основным объектом для объяснения такого высокого уровня напряжения покоя. Например, Winegrad [31] пришел к выводу, что соединительная ткань должна ограничивать растяжение предсердной трабекулы лягушки, так как локальное сокращение клеток некоторого участка будет более эффективно растягивать саркомеры невозбужденных клеток, соединенных последовательно с активными клетками, чем это наблюдается при простом растяжении всей трабекулы. Такие локальные сокращения не будут оказывать влияние на окружающие клетки.

Для такого препарата вклад внеклеточных структур в напряжение покоя при большой длине саркомера был ясно показан авторами работы [72], обнаружившими, что напряжение покоя в диапазоне ДС 2,35—3,45 мкм в интактной предсердной трабекуле лягушки было в 8—30 раз больше, чем в одиночной изолированной клетке, выделенной из того же препарата.

Однако в нескольких исследованиях было показано, что в рабочем диапазоне длины сердечной мышцы основная часть напряжения покоя не может создаваться внеклеточными структурами. Особенно тщательное исследование было проведено Grimm, Whitehorn [73], показавших, что экстракция миофибрилл из панцилярной мышцы сердца крысы в растворе с высокой ионной силой (0,6 М KCl) существенно уменьшает напряжение покоя такой мышцы, в то время как коллаген и другие клеточные структуры остаются интактными. Вместе с тем ферментативное разделение клеток (преимущественно в области вставочного диска) снижает как напряжение покоя, так и силу сокращения, что тоже свидетельствует о важной роли некоторых внутриклеточных структур, а также контактов между клетками в развитии напряжения покоя.

Вклад клеточных компонентов в напряжение покоя. Как было отмечено выше, клеточными структурами, которые могут быть источниками напряжения покоя, являются внутриклеточные мембранные системы, сарколема и промежуточные волокна [74]. Однако исследования механически скиннированных клеток скелетной мышцы показали, что сарколема не играет никакой роли в напряжении покоя пока СД меньше 3 мкм [75, 76].

Вместе с тем было показано, что определенную роль в развитии напряжения покоя миокарда млекопитающих могут играть некоторые структуры, растворимые в детергенте. Например, Fabiato, Fabiato [13] обнаружили у механически скиннированных

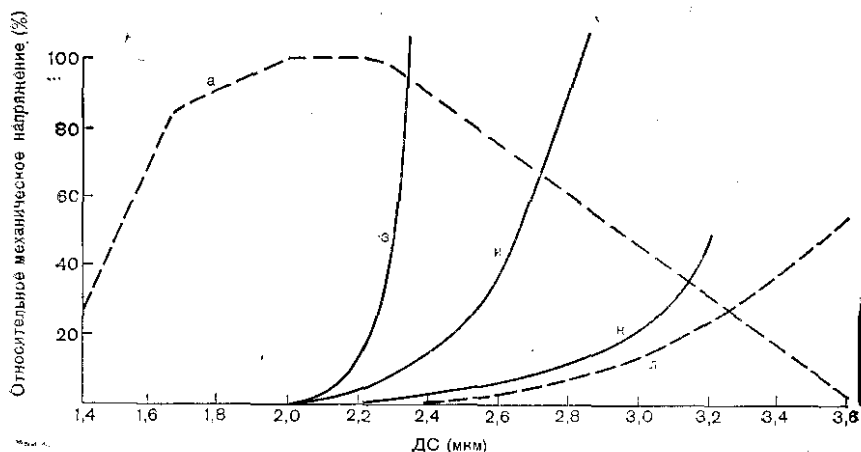


Рис. 13.7. Графики соотношений между механическим напряжением и ДС, аналогичные приведенным на рис. 13.2 и 13.3.

а — данные для скелетной мышцы [11]; з — напряжение покоя тонкой папиллярной мышцы крысы [13]; и — механически скиннированного кардиомиоцита желудка сердца собаки [13]; л — напряжение покоя механически скиннированного волокна передней бедренной мышцы лягушки [15]. Величины механического напряжения нормированы на максимальную величину активного напряжения (P_0) в соответствующем мышечном препарате.

кардиомиоцитов сердца собаки высокое напряжение покоя до обработки детергентом, которое после обработки снижается до $1/3$ от P_0 при ДС=3 мкм (рис. 13.7, кривая к). В скиннированных кардиомиоцитах желудка сердца лягушки напряжение покоя было небольшим (10% P_0 при ДС=3 мкм), и на него обработка детергентом Брий [58], наоборот, не влияла: такие волокна можно удлинить до ДС=8 мкм. Однако цитируемые авторы также отметили, что такие клетки желудочков имеют более высокое напряжение покоя, чем аналогичные клетки, выделенные из скелетной мышцы.

В механически скиннированных кардиомиоцитах желудка сердца крысы [13] обработка детергентом снижала напряжение покоя только при длине sarcomeres в диапазоне 2,1—2,4 мкм, но не при других длинах sarcomeres (см. рис. 13.7, кривая и). Только при обработке препарата эластазой напряжение покоя уменьшалось и при большей длине sarcomeres. Одним из следствий такой обработки является разрыв боковых связей между миофибриллами.

Полученные результаты указывают, что внеклеточный коллаген, по-видимому, не является структурой, определяющей напряжение покоя в миокарде при ДС меньше 3 мкм, и оно вероятнее всего связано со свойствами самих кардиомиоцитов. В диапазоне ДС 2—2,4 мкм основной вклад в напряжение покоя вероятно, вносят сарколемма или другие растворимые детергентом структуры (в зависимости от вида животного), а в таких пре

царатах, как желудочек сердца крысы, основную роль в развитии напряжения покоя должны играть другие внутриклеточные структуры, обладающие упругостью.

Еще одной возможной структурой, ответственной за напряжение покоя в миокардиальных клетках, являются промежуточные волокна (Gazarides, личное сообщение). Однако механические свойства этих элементов еще не выяснены, но предварительные исследования показывают, что наблюдаемый после обработки детергентом (0,5% Тритон X-100) и раствором с высокой ионной силой (0,6 М KCl) остаток одиночного изолированного кардиомиоцита сердца крысы обладает низкой жесткостью (Brady, неопубликованные данные). Эти результаты, а также данные, полученные другими исследователями [73], указывают на необходимость интактности тонких волокон для того, чтобы кардиомиоциты выдерживали напряжение покоя.

Вязкость и ползучесть

Давно было известно, что при постоянной нагрузке длина мышцы, особенно сердечной, постепенно увеличивается. Это явление получило название «ползучесть». Оно характерно для многих веществ с длинной цепью и большим количеством поперечных связей. В папиллярной мышце явление ползучести было качественно описано Pinto, Patitucci [77], которые показали, что при нагрузке, соответствующей максимуму отношения напряжения к растяжению ($0,02-1 \text{ Г/мм}^2$, в зависимости от вида животного), за время около 100 с мышца удлиняется на 2—3% (развитие, происходящее логарифмически во времени). При большей величине начального растяжения ($>15\%$) ползучесть уменьшается. Она мало зависит от температуры.

Наиболее значительным наблюдением в этих исследованиях было то, что в адаптированном препарате (т. е. после некоторого периода нанесения циклов растяжения — укорочения) связанная с ползучестью препарата деформация становится обратимой. Начальная скорость удлинения препарата, обусловленного ползучестью, составляла около 1% при приложении силы, соответствующей максимуму отношения напряжения к растяжению. Основываясь на этих результатах, можно предположить, что удлинение препарата вследствие ползучести в ходе нормального сердечного цикла (60 уд/мин) не превышает 1%. Кроме того, так как удлинение вследствие ползучести в таких условиях полностью обратимо, то удлинение, происходящее за время систолы, будет нивелировано укорочением в фазе диастолы. Только при продолжительных изменениях диастолического напряжения (или давления) явление ползучести будет по-разному влиять на последующие сокращения.

В этом исследовании [77] некоторое внимание было уделено условиям, создающимся на концах препарата, привязанным к датчикам. Не было обнаружено никакой значительной корреляции между ползучестью и условиями на концах мышцы. Авторы сде-

лали вывод, что эффект ползучести не может определяться исключительно явлениями на концах препарата, хотя им и не удалось объяснить распределения пластической деформации между концами и телом мышцы. Однако относительная скорость пластической деформации полоски желудочка сердца кошки длиной 14 мм была практически равна скорости деформации папиллярной мышцы кошки длиной 4 мм. По-видимому, такие величины скорости пластической деформации указывают на изменение средней длины каждого саркомера при такой нагрузке, как на основную причину ползучести. В худшем случае можно ожидать, что при кратковременных изменениях напряжения покоя будут возникать изменения силы сокращения, вызванные изменением ДС примерно на 1%. Более длительные изменения напряжения покоя (>100 с) могут вызывать изменения ДС на 2—3%.

СООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ СИЛОЙ, СКОРОСТЬЮ И ДЛИНОЙ

Соотношение силы и скорости изменения длины в миокарде представляет интерес по двум причинам. Во-первых, как и в скелетной мышце такое соотношение позволяет оценить связь между механической активностью и энергией, расходуемой сокращающейся мышцей. Во-вторых, так как миокард работает на восходящей части соотношения между силой и длиной, то затрудняется разделение инотропных изменений развиваемой силы и изменений, обусловленных изменением длины препарата. Проведенное ранее исследование на папиллярной мышце млекопитающего показало, что скорость укорочения достигает максимума в начале сокращения [78]. Кроме того, было выдвинуто предположение, что $\dot{V}_{\text{макс}}$ (максимальная скорость укорочения) может не зависеть от начальной длины мышцы, поэтому ее можно использовать в качестве показателя сократимости без учета ее геометрических характеристик [78, 80]. Однако более детальное исследование показало, что использование этого параметра в качестве индекса сократимости многоклеточного препарата сомнительно в связи с проблемами, возникающими при экстраполяции кривых соотношения между силой и скоростью, при попытках учесть сложные взаимоотношения таких сократительных параметров, как изменения силы в зависимости от длины, нелинейность упругих элементов, инактивация при укорочении, неоднородность саркомеров и зависимость генерации силы от времени [22, 23, 81—86].

Был рассмотрен ряд возможных показателей сократимости и показано [86], что индексы, чувствительные к состоянию сократительной системы, также чувствительны к преднагрузке (исходной длины), в то время как менее чувствительные индексы хуже отражают изменения состояния сократительной системы. Был сделан вывод, что наиболее чувствительным показателем состояния сократительной системы является максимальная скорость развития силы в изометрическом режиме (dp/dt).

Было предложено [87, 88] измерять скорость укорочения без нагрузки (V_0) вместо расслабления при освобождении от нагрузки. Скорость рассчитывали путем деления изменения длины при быстром сбросе силы до нуля на время. Расчеты показали, что в одиночных клетках скелетной мышцы V_0 хорошо коррелирует с $V_{\text{макс}}$. Оба параметра характеризуются одной и той же величиной Q_{10} (2,67) в интервале 2—12°C; V_0 не зависела от длины саркомера в диапазоне 1,65—2,7 мкм и была одинаковой и при одиночном сокращении и при тетанусе. Авторы работы [32] также обнаружили, что скорость укорочения в одиночных интактных клетках предсердия лягушки постоянна при $DC > 1,6$ мкм. Однако в других исследованиях [22], в которых использовали этот метод одновременно с измерением длины саркомеров, применяя дифракцию лазерного излучения в цепи обратной связи, было показано, что в тонких папиллярных мышцах сердца крысы величины P_0 и V_0 изменяются параллельно при изменении длины саркомеров в диапазоне 1,6—2,1 мкм, и постоянны только в диапазоне DC 2,1—2,3 мкм. На основании результатов последних исследований, по-видимому, невозможно получить независимую от длины меру сократимости миокарда, исходя из скорости укорочения, и на уровне отдельных саркомеров.

При сравнении скорости укорочения интактных и изолированных клеток [22] было установлено $V_0 = 10$ мкм/с при 26°C и $DC = 2$ мкм. Авторы работы [13] рассчитали максимальную скорость укорочения для следующего уровня упрощения структуры препарата (механически скиннированный кардиомиоцит крысы) в условиях максимальной активации, оказавшуюся равной 20 мкм/с.

Эти величины были сопоставлены с рассчитанной величиной $V_{\text{макс}}$ в папиллярной мышце кошки в диапазоне $1/2$ —2 длин мышцы в 1 с при соответствующей температуре [82, 85, 89]. Очевидно скорость укорочения изолированных клеток может значительно превышать скорость укорочения большого многоклеточного препарата. Такое сопоставление позволяет предположить, что межклеточные взаимодействия значительно ухудшают способность клеток развивать высокую скорость укорочения, хотя в условиях постоянной активации можно достичь той же длины саркомера.

Анализировали также соотношения между скоростью и длиной в миокарде [78]. Было показано, что в процессе развития сокращения быстро достигается максимум скорости укорочения, после чего зависимость между скоростью и длиной достигает постоянного уровня, величина которого не зависит от времени и исходной длины мышцы. Эти результаты были интерпретированы следующим образом: во время сокращения повышение уровня Ca^{2+} -активатора в клетке точно компенсируется влиянием укорочения на сократимость, т. е. повышением внутренних упругих сил, изменением активации, зависимым от длины, и инактивацией при укорочении. Хотя такая точная компенсация эффектов различных процессов является, по-видимому, случайной, это еще раз указывает сложность механизма сокращения и подчеркивает

допущения, которые необходимо принимать во внимание при интерпретации измеряемых параметров сокращения миокарда.

Результаты изучения соотношения между силой и скоростью в препаратах миокарда показывают, что: 1 — скорость укорочения не может служить строгим показателем сократимости, независимо от длины, так как на ее измерение оказывают влияние множество сократительных параметров; 2 — однако высокая постоянная скорость укорочения изолированных одиночных кардиомиоцитов более независимо характеризует кинетику укорочения при работе ПМ, так как в этом случае внутренние силы играют минимальную роль. Такая скорость укорочения может в чистом виде отражать эффекты зависимой от длины активации и деактивации при укорочении, однако эти процессы в настоящее время, по-видимому, стали более доступны для экспериментального изучения, особенно при наличии возможности одновременно регистрировать силу и ДС в интактных изолированных клетках.

АНАЛИЗ МЕХАНИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ ПОМОЩИ МЕТОДА БЫСТРЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ТОНУСА

Как было сказано во «Введении», основная цель изучения механической активности мышцы сводится к выяснению механизма превращения метаболической энергии в механическую работу. Изучение физиологии мышцы достигло больших успехов на биохимическом уровне, что позволило найти связь между расщеплением АТФ и взаимодействием актина с миозином. Очевидно, что наиболее подробную информацию о процессе преобразования энергии можно получить при изучении изолированных мышечных систем. При изучении таких систем, упрощенно относительно их структуры и химических свойств, к настоящему времени удалось определить большое число констант, характеризующих кинетику цикла образования и распада поперечных мостиков. Однако на основе кинетики этих реакций довольно трудно выяснить эффекты, связанные со структурной организацией и механическим напряжением.

Для получения такой информации при изучении мышечных препаратов, находящихся под нагрузкой, в ряде лабораторий был разработан метод быстрых изменений тонуса (как синусоидальных, так и ступенчатых) для анализа изменений силы или длины интактных препаратов в ответ на изменения прикладываемого извне растяжения или нагрузки. Цель такого подхода в случае ступенчатого изменения тонуса заключается в том, что, если активно сокращающуюся мышцу, находящуюся на установившемся уровне активации, подвергнуть резкому изменению нагрузки или растяжению, то развитие последующей реакции во времени позволит установить кинетические свойства взаимодействия миофибрилл.

В случае синусоидальных изменений тонуса такой подход был подсказан результатами наблюдений на асинхронных мыш-

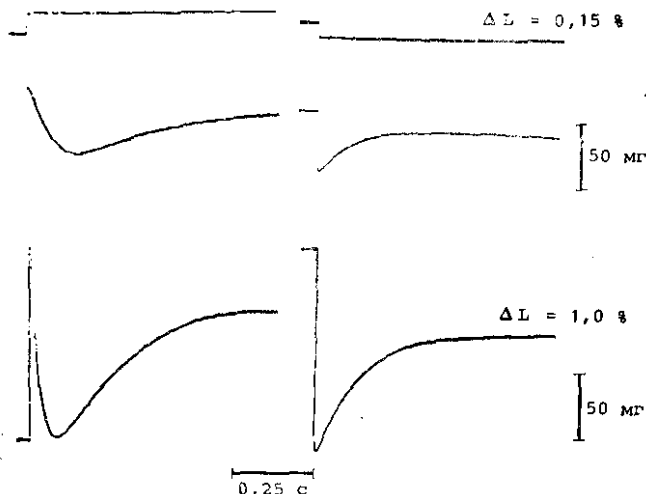


Рис. 13.8. Задержанная реакция напряжения глицеринизированной папиллярной мышцы кролика на быстрое растяжение препарата (слева) и быстрое освобождение (справа). Вверху — примененные извне изменения длины (растяжение или освобождение); в центре — реакция напряжения при изменении длины на 0,15%; внизу — реакция напряжения при изменении длины на 1%. Амплитуда силы сокращения (T_0) в контроле составляла около 250 мГ. По [91].

х (например, фибриллярная летательная мышца насекомых), которых следует, что существует оптимальный диапазон частот, при котором осцилляторные изменения тонуса приводят к синхронизации сдвига фаз между длиной мышцы и развиваемой силой, так что мышца совершает работу против внешней системы, а не просто рассеивает подводимую энергию, как это наблюдается в случае вязкоупругого тела. Частотные и амплитудные характеристики таких критических осцилляций должны также отражать соотношения между химическими и механическими процессами в системе, создающей активное сокращение.

Авторы работ [90, 91, 92] обнаружили, что механическое напряжение препарата глицеринизированного миокарда желудочка кролика, активируемого ионами Ca^{2+} , изменяется при быстрой растяжке или уменьшении длины с некоторой задержкой (при постоянной длине), так же как это наблюдается в фибриллярной летательной мышце насекомых [93, 94] или глицеринизированной psoas мышце кролика [95, 96]. На рис. 13.8 показаны типичные задержанные реакции тонуса глицеринизированного миокардиального препарата при резком ступенчатом изменении длины до двух разных уровней (см. рис. 13.8 средняя и нижняя записи; вверху — регистрация длины). Первая фаза ингибции после начала ступеньки (растяжения или расслабления) представляет собой быстрый, независимый от температуры возросший напряжения препарата к T_0 . Фаза 2 развивается на порядок медленнее и напоминает (см. рис. 13.8) хвост фазы 1 перед началом фазы 3, при которой напряжение меняет свое направле-

ние, и вновь начинает возрастать с некоторой задержкой (сократительный ответ). При резком расслаблении препарата задержанный ответ не столь резко выражен. Фаза 2 чувствительна к ионам Ca^{2+} и отражает инотропное состояние мышцы. Кинетические константы фазы 3 соответствуют частоте сердечного ритма многих видов животных (лягушка, свинья — 30—50 уд/мин, колибри — 2000 уд/мин).

Хотя скорости реакций в миокарде на порядок меньше, чем в препаратах скелетных мышц или мышц насекомых, тем не менее характерные для них механические свойства аналогичны обуславливающим осцилляторное поведение асинхронных фибриллярных летательных мышц насекомых.

Наложением высокочастотных изменений длины (100 Гц) на такие задержанные реакции было показано, что жесткость мышцы изменяется параллельно изменению механического напряжения препарата, свидетельствуя о том, что такие искусственно вызванные изменения напряжения связаны с образованием поперечных мостиков.

Дальнейшие исследования на интактном миокарде [98], в котором постоянный уровень активации достигался на короткое время при контрактуре, вызванной кофеином или Ba^{2+} , показали, что в ответ на ступенчатое изменение длины препарата также возникает задержанная реакция напряжения. Кроме того, был идентифицирован диапазон частот осцилляций (0,05—1,20 Гц), в котором развитие напряжения в мышце отстает от вызываемых извне изменений длины, в результате чего мышца совершает работу против внешней системы.

Дальнейшее развитие исследований этого вопроса [99, 100] позволило предположить, что кинетические константы, описывающие транзиторные механические реакции, должны соответствовать следующим кинетическим константам химических реакций: K_1 для быстрой не зависящей от температуры фазы может соответствовать диссоциации актомиозинового комплекса; K_2 которая в значительной степени зависит от температуры и амплитуды изменений длины, соответствует рекомбинации и диссоциации миозиновой головки ПМ с актином; K_3 , характеризующая задержанную реакцию напряжения препарата, соответствует $\dot{V}_{\text{макс}}$, т. е. максимуму АТФазной активности и образованию новых поперечных мостиков. С помощью модели цикла работы ПМ с четырьмя состояниями удалось соотнести кинетические константы, полученные на нескольких типах мышц, с известными биохимическими кинетическими константами [100]. Кинетические константы некоторых из этих процессов были также рассчитаны на основе графиков Найквиста для комплексной жесткости, полученной методом кратковременных изменений тонууса скелетной мышцы животных нескольких видов [96]. Хотя соответствие между механическими и биохимическими кинетическими константами в некоторой степени устанавливается произвольно и они отражают только некоторую степень суммарных скоростей реакций, тем не менее такой подход кажется перспективным в смысле опреде-

ния разумных связей между механическими и биохимическими процессами сокращения мышцы.

В настоящее время такое соответствие следует считать спекулятивным потому, что, во-первых, не получено никаких данных для мышечных систем с контролируемой длиной саркомеров, когда контролируется последовательная упругость и неоднородное распределение длин саркомеров; и, во-вторых, соответствие специфических для механических процессов кинетических констант и кинетических констант для определенных биохимических реакций основано лишь на догадках. Но в любом случае определенные корреляции между механическими и химическими процессами представляются достаточно правдоподобными.

АКТИВНОЕ СОСТОЯНИЕ

Понятие активного состояния первоначально было определено как способность мышцы развивать силу при постоянной длине [101]. В этом смысле развитие активного состояния происходит медленно, особенно в миокарде, так как требуется значительное время для достижения максимума в процессе развития силы. И наоборот, если рассматривать это понятие в терминах способности к укорочению, то максимальная скорость укорочения достигается очень быстро (в скелетной мышце [102], в миокарде [78]). Возникает вопрос, какой из этих параметров выбрать в качестве меры активации мышцы?

Концепция активного состояния критически оценивалась в ряде работ [65, 67, 103, 104]. В последнем из этих обзоров было выдвинуто предположение, что от этого понятия следует вообще отказаться. Например, авторы работы [67] не смогли однозначно определить модуль упругости для последовательного упругого компонента миокардиального препарата. Другие авторы [104] рассмотрели развитие силы и укорочение в терминах модели перемычек с учетом последовательной упругости и пришли к выводу, что такая модель позволяет предсказать как медленное развитие силы, так и быстрое достижение максимальной скорости укорочения, что подтверждается экспериментально. Но как в настоящее время выяснилось, что активация мышцы регулируется уровнем Ca^{2+} в миоплазме, а как скорость укорочения, так и развиваемая сила существенно зависят от уровня Ca^{2+} в миоплазме, то исчезает уникальность классической концепции активного состояния, выраженной лишь в терминах развития силы. Действительно, данная концепция не имеет никакой определенной ценности и от нее следует отказаться.

ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ ОБЪЯСНЕНИЯ РАБОТЫ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ В ЦЕЛОМ

На основании приведенного выше обсуждения очевидно, что пока преждевременно формулировать основные фундаментальные соотношения, которые могли бы эффективно описывать сокра-

мость сердечной мышцы. Сложная зависимость силы сокращения от таких факторов, как деактивация при укорочении, восстанавливающие силы, зависящая от длины активация и неоднородность распределения длин саркомеров, и кроме того, невозможность представить влияние этих факторов количественно, позволяет лишь эмпирически сформулировать, какие параметры определяют сократительную функцию. Кроме того, для каждого конкретного специфического условия работы мышцы можно представить лишь эмпирические связи между параметрами, которые, по-видимому, применимы только в узком диапазоне режимов работы сердца.

Такое мнение разделяют также авторы работы [107], рассмотревшие вопрос об информативности переменных, предложенных для описания механической активности изолированных миокардиальных препаратов при их использовании для количественной оценки насосной функции сердца. Цитируемые авторы пришли к выводу, что соотношение между силой и длиной, полученное для изолированной миокардиальной ткани, не обязательно соответствует форме диаграммы работы левого желудочка. Например, конечный систолический объем может увеличиться при повышении ударного объема, вызванного возрастанием конечного диастолического объема, что можно предвидеть на основе приведенного выше анализа деактивации при укорочении. Они предположили, что основные механизмы, определяющие форму диаграммы работы сердца как насоса, можно установить лишь в том случае, если учесть, что мышечные волокна реально находятся в стенке желудочков, а не при изучении их работы в условиях строгого контроля за длиной и развиваемой силой.

Сложность и многоплановость процесса сокращения миокарда при малой длине саркомеров придают особое значение этим рекомендациям в попытках определения однозначного показателя сократимости сердца. Поэтому возможность установить простые определяющие соотношения [108], которые можно было бы связать с насосной функцией сердца, используя лишь трехмерную геометрическую функцию преобразования кажется маловероятным.

Может быть удастся установить некоторые полезные эмпирические определяющие соотношения, но, вероятно, их придется вводить для каждого состояния сократительной системы в отдельности.

Следовательно, особенно важным в настоящее время становится выяснение функциональных механизмов, лежащих в основе восходящей части соотношения Франка — Старлинга. Это позволит учесть при выведении определяющего соотношения отчасти значительный вклад большего числа основных параметров, таких как внешняя и внутренняя нагрузка, деактивация при укорочении, неоднородность мышцы и активация, зависящая от длины. Кроме того, необходимо учесть влияние трехмерной геометрической структуры сердца на все эти факторы. Очевидно, что на взаимоотношение между параметрами сократительной системы влияют форма, структура и распределение нагрузки и деформа-

ции в стенке миокарда, а также сложное влияние изменяющейся нагрузки давлением.

Изложенное выше приводит к выводу, что в настоящее время дальнейшие исследования механических свойств миокарда на уровне отдельных кардиомиоцитов и изучение интеграции миоцитов в структуру целого сердца имеют такое же важное значение, как и в то время, когда было предложено соотношение Франка — Старлинга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Huxley H. E., Hanson J.* Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. — *Nature*, 1954, vol. 173, p. 973—976.
2. *Huxley A. F., Niedergerke R.* Interference microscopy of living muscle fibers. — *Nature*, 1954, vol. 173, p. 971—973.
3. *Noble M. I. M., Pollack G. H.* Molecular mechanisms of contraction. — *Circulat. Res.*, 1977, vol. 40, p. 333—342.
4. *Huxley A. F., Simmons R. M.* Proposed mechanism of force generation in striated muscle. — *Nature*, 1971, vol. 233, p. 533—538.
5. *Ingels N. B. Jr.* The molecular basis of force development. — Palo Alto C. A.: Palo Alto Medical Research Foundation, 1979.
6. *Murray J. M., Weber A. A.* A cooperative action of muscle proteins. — *Science*, 1974, vol. 230, p. 58—71.
7. *Julian F. J.* Some theories for muscle contraction based on cyclic, short-range interactions between actin and myosin. — In: *The molecular basis of force development*/Ed. N. B. Ingels Jr. Palo Alto C. A.: Palo Alto Medical Research Foundation, 1979.
8. *Julian F. J., Sollins K. R., Sollins M. R.* A model for the transient and steady-state Mechanical behavior of contracting muscle. — *Biophys. J.*, 1974, vol. 14, p. 546—562.
9. *Hill T. L.* Theoretical formalism for the sliding filament model of contraction of striated muscle. Part I. — *Progr. biophys. mol. Biol.*, 1974, vol. 28, p. 267—340.
10. *Hill T. L.* Theoretical formalism for the sliding filament model of contraction of striated muscle. Part II. — *Progr. biophys. mol. Biol.*, 1975, vol. 29, p. 105—159.
11. *Gordon A. M., Huxley A. F., Julian F. J.* The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibers. — *J. Physiol.*, 1966, vol. 184, p. 170—192.
12. *Julian F. J., Sollins M. R., Moss R. L.* Sarcomere length nonuniformity in relation to tetanic responses of stretched skeletal muscle fibers. — *Proc. roy. Soc. B.*, 1978, vol. 200, p. 109—116.
13. *Fabiato A., Fabiato F.* Myofilament-generated tension oscillations during partial calcium activation and activation dependence of the sarcomere length-tension relation of skinned cardiac muscle. — *J. gen. Physiol.*, 1978, vol. 72, p. 667—699.
14. *Iwazumi T., Pollack G. H.* The effect of sarcomere nonuniformity on the sarcomere length-tension relationship of skinned fibers. — *J. cell. Physiol.*, 1981, vol. 106, p. 321—337.
15. *Julian F. J., Moss R. L.* Sarcomere length-tension relations of frog skinned muscle fibers at lengths above the optimum. — *J. Physiol.*, 1980, vol. 304, p. 529—539.
16. *Winegrad S., McClellan G., Robinson T., Lai N.-P.* Variable diastolic compliance and variable Ca^{++} sensitivity of the contractile system in cardiac muscle. — *Europ. J. Cardiol. (Suppl.)*, 1976, vol. 4, p. 41—46.
17. *Blinks J. R., Rudel R., Taylor S. R.* Calcium transients in isolated amphibian skeletal muscle fibres: detection with aequorin. — *J. Physiol.*, 1978, vol. 277, p. 291—323.
18. *Rack P. M. H., Westbury D. R.* The effects of length and stimulus rate on tension in isometric cat soleus muscle. — *J. Physiol.*, 1969, vol. 204, p. 443—460.

Глава 14

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ СЕРДЕЧНЫХ ГЛИКОЗИДОВ

Т. М. БРОДИ, Т. АКЕРА (Т. М. BRODY, Т. AKERA)

ВВЕДЕНИЕ

Название «дигиталис» относится ко множеству различных стероидов, обладающих способностью усиливать сокращения сердца и вызывать характерные электрофизиологические эффекты. Эти вещества получают из ряда растительных и животных источников. Способ применения ургинеи приморской (или морского лука) в медицинских целях был известен еще в 1600 до н. э. Вещество с подобной активностью можно выделить из семян *Strophantogtatus*, являющихся источником оубаина, использовавшегося в качестве яда, которым в Африке смазывали наконечники отравляющих стрел, а также из кожи жабы (в древней народной медицине Китая). Гликозиды, наиболее часто применяемые в настоящее время, получают из листьев наперстянки, *Digitalis purpurea* и *D. lanata*. В 1785 г. были опубликованы многолетние исследования, проведенные В. Витерингом (W. Whitering). Вышла книга «Объяснение действия морского лука и некоторые способы его применения в медицине: с практическими замечаниями по поводу водянки и других болезней» [1]. Витерингу не удалось обнаружить, что эффективность морского лука в уменьшении отека является вторичной по отношению его действия на сердце. Вторая обширная монография была опубликована в 1799 г. Джоном Феррье (J. Ferrigier), который предположил, что дигиталис может оказывать действие на сердце, которое отличается от его способности усиливать диурез. В 1850 г. Траубе также выявил действие дигиталиса, заключающееся в усилении эффективности работы мышцы сердца, и предположил, что брадикардия является результатом стимуляции блуждающего нерва. Успешное использование препаратов дигиталиса при фибрилляции предсердий было впервые установлено в начале XX века. В 1938 г. Cattell, Gold удалось экспериментально показать, что сердечные гликозиды оказывают благоприятное действие, увеличивая силу сокращения сердца [2]. После очистки гликозида из ряда дигиталиса и разработки методов стандартизации различных препаратов дигиталис стал основным лекарственным веществом для лечения застойной сердечной недостаточности.

ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДИГИТАЛИСА

Химические свойства кардиотонических стероидов и связь их структуры с эффективностью действия были предметом настоящих исследований в течение последних 40 лет [3]. До настоящего времени считалось, что структурные особенности, необходимые для проявления их действия, хорошо установлены, но полученные недавно данные позволяют предположить, что предложенная ранее гипотеза неверна. В опубликованном недавно обзоре [4] описаны как классические исследования связи структуры и активности, так и некоторые современные данные. Авторы этого обзора описали модель взаимодействия большого числа активных химических веществ с предполагаемым рецептором дигиталиса, которая согласуется со способностью этих соединений увеличивать силу сокращения и ингибировать активность (Na^+, K^+) -АТФазы. Сердечные гликозиды состоят из агликона (или генина), с которым связана одна или две молекулы одного или сахаров. Например, дигоксин — сердечный гликозид, широко применяемый в клинической практике, состоит из агликона, в данном случае дигоксигенина, и трех молекул дигитоксозы, расположенных в положении 3 (рис. 14.1). Фармакологической ак-

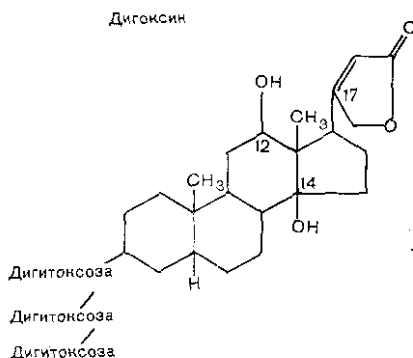


Рис. 14.1. Химическая структура сердечного гликозида — дигоксина. Агликон, дигоксигенин не содержит сахара в положении 3. Дигитоксин отличается от дигоксина отсутствием OH -группы в положении $C-12$.

тивностью обладают как агликон, так и гликозид. Действие агликона обычно короче и слабее, но их терапевтические и токсические характеристики такие же, как и у гликозидов.

Классические исследования связи структуры с активностью соединений, подобных дигиталису, указывают, что инотропной активностью могут обладать только 14β -гидроксистероиды с ненасыщенным лактонным кольцом и, кроме того, имеющие химические свойства, характерные для стероидов из группы дигиталиса, в частности, цис/транс/цис конфигурации в месте сращения колец [5]. Эти выводы трудно согласовать с тем, что соединений, не имеющих таких структурных признаков, тем

не менее обладают значительным дигиталисподобным свойством. Модель, предложенная в работе [4], не объясняет существования широкого спектра химических веществ, способных оказывать инотропное действие, но не согласующихся с классической структурной моделью. Однако в действительности оказалось, что основной функциональной группой является электрофильный центр в С-17 боковой цепи, который связывается с рецептором и, следовательно, необходим для проявления дигиталисподобной активности, хотя само лактонное кольцо не играет значительной роли.

Различные гликозиды и агликоны отличаются по числу и положению ОН-групп. Очевидно, что ОН-группы имеют важное значение, так как определяют растворимость в липидах, связывание с белками, метаболические превращения и продолжительность действия каждого конкретного соединения. В то время как агликоновая часть молекулы ответственна за действие на сердце, наличие остатков сахаров влияет на величину эффекта и фармакокинетику. Остаток сахара, ближайший к генину, имеет наибольшее влияние на связывание гликозида с рецептором. Воздействие второго и третьего остатков сахара менее значительно. Не все дигиталисподобные соединения содержат пятиуглеродное ненасыщенное лактонное кольцо в положении 17 (см. выше), но вещества, в состав которых он входит, называются карденолидами. К ним относятся дигоксин, дигитоксин и оубаин.

ФАРМАКОКИНЕТИКА

Наиболее широкое применение находят дигоксин и дигитоксин, и именно их фармакокинетические свойства наиболее подробно исследованы у человека.

Обычно поглощение дигоксина при оральном введении больным колеблется в пределах 65—85% в зависимости от типа используемого препарата. Дигоксин лучше усваивается из водно-спиртовых растворов и хуже — в виде таблеток. Разброс выше при использовании таблеток, поэтому врачи, использующие определенные марки гликозидов, должны проводить весь курс лечения одного больного, назначая препарат той же марки (выпуска), хотя в настоящее время таблетки дигоксина должны удовлетворять тесту на растворимость.

После приема внутрь максимальный уровень дигоксина в крови достигается к 45—60 мин, затем спадает до некоторого плато через 5—6 ч после приема лекарства. Вторая из этих фаз соответствует основному периоду полужизни ($t_{1/2}$), равному 35 ч и определяемому метаболизмом и удалением лекарства из организма.

Поглощение дигитоксина при пероральном введении почти полное, так как он более липидорастворимый, чем дигоксин. Время, необходимое на выведение из организма половины лекарственной дозы в результате метаболизма и выделения, составляет у человека 5—6 ч.

Сердечные гликозиды широко распространяются в ткани и жидкости организма. Белки плазмы крови являются основным местом связывания гликозидов; около 25% дигоксина и 90% дигитоксина связывается с белками плазмы. Оба гликозида распределяются по всем тканям организма, а наивысшая их концентрация обнаруживается в почках, скелетных мышцах, сердце, печени и коре надпочечников. В большинстве тканей концентрация вещества почти в 100 раз выше, чем равновесная концентрация свободного вещества в плазме, что свидетельствует о значительном связывании гликозидов с тканевыми белками.

Дигоксин удаляется из организма преимущественно через почки в основном в неизменном виде. Судьба дигоксина в основном определяется работой почек и клиренс этого гликозида прямо пропорционален клиренсу креатинина. Небольшое количество дигоксина секретируется почками, и часть его реабсорбируется в просвете канальцев.

Дигитоксин в свою очередь в основном метаболизируется, и работа почек несущественно влияет на время полужизни этого гликозида. При уремии $t_{1/2}$ дигоксина и дигитоксина практически одинаковы, так что использование дигитоксина в этом случае не дает никаких преимуществ. Однако если у больных с уремией необходима корректировка дозы в ходе лекарственной терапии, то более предпочтительно использование дигитоксина. Дигитоксин метаболизируется микросомальными окислительными ферментами печени, и те лекарства или воздействия, которые активируют эти ферменты, ускоряют биопревращение дигитоксина. Одним из продуктов биопревращения дигитоксина является дигоксин (табл. 14.1).

Сердечные гликозиды распределяются по тканям тела относительно медленно, и для них характерен большой кажущийся объем распределения. Их действие начинается медленно, и определяется скоростью, с которой происходит связывание этого вещества с (Na^+, K^+) -АТФазой — предполагаемым фармакологическим рецептором. Связывание лекарства с тканевыми рецепторами происходит медленно и у интактных животных, и в изолированных тканях сердца. Оно в значительной степени зависит от концентрации ионов натрия и калия во внеклеточной среде [6]. Например, у животных с гипокалиемией или больных с низкой концентрацией K в плазме крови вследствие энергичной диуретической терапии скорость связывания дигиталиса с рецептором увеличивается, и фармакологическое действие наступает быстрее. Гиперкалиемия задерживает наступление фармакологического действия [7]. Движение ионов натрия через мембрану сердечной клетки также способствует связыванию сердечного гликозида с рецептором, поэтому внеклеточная концентрация натрия и число сокращений или возбуждений за единицу времени также влияют на скорость наступления фармакологического эффекта [8]. Поэтому у больных с повышенной частотой сердечного ритма действие дигиталиса может проявляться быстрее.

Различие концентраций сердечных гликозидов, вызывающих

Таблица 14.1. Характеристики некоторых сердечных гликозидов

Препарат, способ применения	Источник	Доза	Максимум эффекта	Время полувыведения	Поглощение, выведение и метаболизм
Дигоксин (таблетки, инъекции)	Гликозид из листьев <i>D. lanata</i>	1—2,5 мг перорально, затем 0,25—0,5 мг ежедневно	4—6 ч (перорально)	35 ч	Поглощение 75%, выводится почками
Дигитоксин (таблетки, инъекции)	Гликозид из <i>D. purpurea</i> , <i>D. lanata</i> и др. видов	1—1,5 мг перорально, затем 0,1 мг ежедневно	6—12 ч (перорально)	5 дней	Поглощение 90—100%, биотрансформации в печени, метаболиты удаляются почками
Ланатозид С (таблетки)	Гликозид из <i>D. lanata</i>	1—1,5 мг перорально, затем 0,25—0,75 мг ежедневно	4—6 ч (перорально)	33 ч	Поглощение варьирует, 20% метаболизируется печенью
Дезланозид (инъекции)	Дезацильная производная ланатозидов С	0,8—1,5 мг перорально, затем 0,2—0,5 мг ежедневно	1—2 ч	—	20% метаболизируется печенью, выводится почками
Измельченный дигиталис (пилюли, таблетки или капсулы)	Листья <i>D. purpurea</i> или <i>D. lanata</i> ; смесь различных гликозидов, преимущественно дигоксин	1 г, затем по 400 мг ежедневно	8—12 ч	5—7 дней	Поглощение варьирует; метаболизм в печени и выведение почками
Оубаин (инъекции)	Семена <i>Strophanthus gratus</i>	0,25—0,5 мг внутривенно, затем 0,1 мг каждый час	0,5—2 ч	—	Выведение почками

положительное инотропное действие у животных различных видов, очень велико. Частично такая видовая специфичность различной чувствительности к гликозидам, по-видимому, обусловлена разными скоростями их метаболизма и выведения. Однако основная причина специфичности заключена в самом сердце, на что указывают различия в чувствительности к гликозидам, наблюдавшимся на препаратах изолированной сердечной мышцы. Изолированный миокард собаки, кошки, коровы или овцы необычайно высокочувствителен к инотропному и токсическому действию гликозидов, в то время как миокард морской свинки или кролика на порядок менее чувствителен. Миокард крысы более чем на два порядка менее чувствителен, чем миокард морской свинки и кролика, так что требуются соответственно более высокие концентрации гликозида для проявления положительного инотропного действия. Чувствительность сердца человека к действию сердечных гликозидов, по-видимому, самая высокая из всех видов животных. Эти различия в чувствительности к гликозидам вероятно всего обусловлены разным сродством рецепторов к гликозидам [9], и при введении соответствующей данному виду животного дозы гликозидов величины развивающегося положительного инотропного действия оказываются равными, т. е. кривые доза — эффект направлены параллельно.

Дозы сердечных гликозидов (выраженные в мг/кг на массу тела), необходимые для новорожденных и маленьких детей, значительно больше, чем для взрослых, хотя между ними, по-видимому, нет существенной разницы в метаболическом превращении или выделении из организма. Поэтому у лиц молодого возраста или животных более высокие концентрации лекарств в плазме крови достигаются без каких-либо признаков токсичности. Причины такой толерантности молодых больных к дигиталису в настоящее время неизвестны; по-видимому, в основе этого могут лежать различия во взаимодействии гликозидов с предполагаемым фармакологическим рецептором — (Na^+, K^+) -АТФазой.

ФАРМАКОДИНАМИКА

Дигиталис обладает двумя благотворными клиническими свойствами: он способен увеличивать силу сокращения миокарда у больных с застойной сердечной недостаточностью и уменьшать частоту сокращения желудочков при фибрилляции или трепетании предсердий. И хотя в течение многих лет считалось, что благотворное действие гликозидов при застойной сердечной недостаточности является результатом уменьшения частоты сокращения желудочков, в настоящее время установлено, что положительное инотропное действие является результатом прямого действия на сократимость миокарда, развивающегося вследствие взаимодействия гликозидов с соответствующим рецептором (см. ниже). На электрофизиологическую активность сердца дигиталис также оказывает прямое воздействие, но оно может быть до некоторой

степени изменено влиянием центральной нервной системы. Кроме воздействия на мозг, которое также может быть ответственно за некоторые токсические проявления, дигиталис также сильно влияет на другие ткани, как, например, гладкомышечные клетки сосудов. Сердечные гликозиды, кроме того, оказывают значительное воздействие на работу симпатической и парасимпатической системы как в терапевтических, так и в токсических дозах. Таким образом, общая фармакодинамика соединений этого класса является сложной, характеризующейся как прямым, так и косвенным воздействием на ткань мишени.

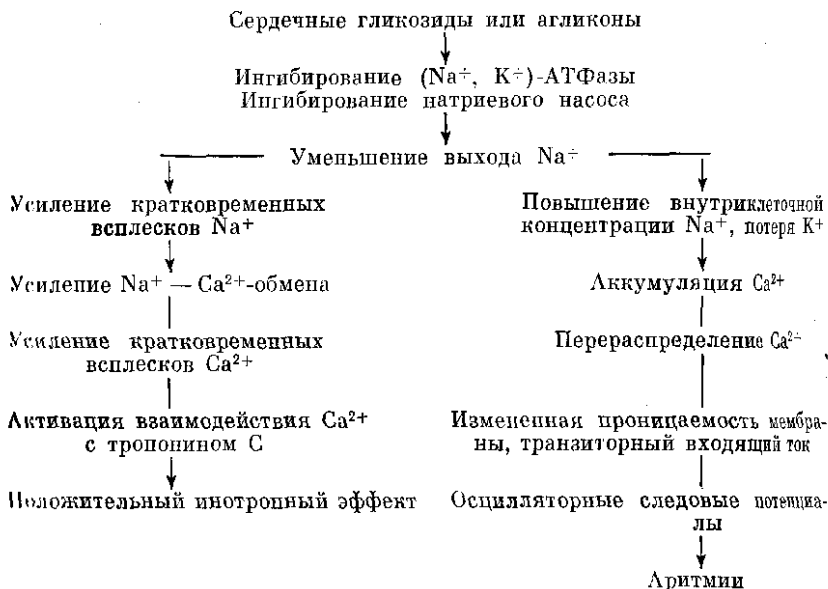
Увеличение силы сокращения

Сердечные гликозиды увеличивают силу сокращения миокарда как предсердий, так и желудочков. Положительное инотропное действие может быть продемонстрировано на различных препаратах изолированных фрагментов миокарда, полученных из тканей сердца животных самых различных видов, включая ткани сердца человека. Увеличение сократимости возникает как в здоровом сердце, так и при недостаточности, но обычно оно не наблюдается у здоровых людей или животных вследствие рефлекторной перестройки гемодинамики.

На препаратах изолированных фрагментов миокарда легко можно показать, что сердечные гликозиды увеличивают максимум развивающегося механического напряжения, и что этот эффект зависит от дозы или концентрации, как показано на схеме 14.1. При очень высоких концентрациях может наблюдаться отрицательное инотропное действие, связанное с увеличением напряжения покоя.

При застойной сердечной недостаточности происходит ряд изменений электрофизиологических свойств миокарда, на которые в конечном счете и действует дигиталис. Основной дефект состоит в нарушении способности сердца адекватно функционировать в качестве насоса, поставляющего кровь всем тканям. Патологические последствия нарушения сократимости миокарда одинаковы во всех случаях, хотя изначальные причины, приводящие к этому, могут быть различны. При нарушении работы сердца включается ряд механизмов, направленных на компенсацию этого порока. Происходит увеличение конечно-диастолического объема, так что сердце начинает работать в новой точке кривой Франка — Старлинга для желудочков; увеличивается тонус симпатической нервной системы, и наконец, существенно возрастает размер желудочков. Увеличение симпатического тонуса является следствием снижения минутного объема сердца и артериального давления, влияющего на барорецепторы. В результате этого развивается компенсационное повышение артериального давления, частоты сердечного ритма и периферического сопротивления сосудов. Однако в конечном счете такое повышение симпатического тонуса заставляет сердце совершать большую работу для того,

Схема 14.1. Предполагаемый механизм положительного инотропного и аритмогенного действия сердечных гликозидов



чтобы перекачивать достаточное для снабжения тканей количество крови, и эффективность работы сердца снижается.

При компенсации недостаточности увеличенная преднагрузка необходима для поддержания высокого минутного объема сердца. Вследствие увеличения преднагрузки повышается потребление миокардом кислорода и может развиться гиперемия системных и легочных сосудов. Любое повышение метаболических потребностей сердца в этих условиях может привести к развитию одышки (затруднение дыхания). Гипертрофия желудочков также является следствием снижения сократимости миокарда. Подъем внутрисердечного давления вызывает увеличение количества мифбрилл в кардиомиоцитах желудочков и размера сердца. Все эти механизмы, действуя согласованно, направлены на поддержание минутного объема сердца на нормальном уровне, достигая достаточного успеха, за исключением случаев, когда сердце подвергается чрезмерным нагрузкам [10].

Лечение дигиталисом до настоящего времени остается наиболее эффективным в поддержании больных с застойной сердечной недостаточностью. При действии сердечных гликозидов сердце начинает работать на новой кривой Франка — Старлинга для желудочков, что свидетельствует о переходе на новый уровень сократимости сердца. Таким образом, при любом заданном давлении наполнения желудочков ударный объем сердца увеличивается. При действии дигиталиса возрастает не только максимальное механическое напряжение, развиваемое миокардом, но также уменьшается время достижения данного уровня механического

напряжения, если исследовать скорость развития сокращения при разных нагрузках. Уменьшается также длительность систолы.

Действие сердечных гликозидов, выражающееся в увеличении силы сокращения, приводит к повышению ударного объема сердца, вследствие чего для поддержания перфузии тканей на необходимом уровне больше не требуется повышенного симпатического тонуса и влияния катехоламинов. Так как при этом повышается эффективность почечной перфузии, соли и вода из организма удаляются в большем количестве, снижается отек. Понижается также тонус периферических сосудов, уменьшается объем плазмы крови, преднагрузка желудочков и размеры сердца возвращаются к норме [10]. При действии сердечных гликозидов потребление сердцем кислорода может слегка увеличиться, но так как его работа существенно улучшается, то результирующая потребность его в кислороде может в действительности снизиться. Отрицательное хронотропное действие сердечных гликозидов также может способствовать снижению потребления сердцем кислорода.

Электрофизиологические эффекты

Сердечные гликозиды оказывают как благоприятное, так и токсическое действие на электрофизиологические свойства сердца. Кроме использования гликозидов для увеличения силы сокращения сердца, их также применяют в терапии для коррекции нарушений ритма суправентрикулярного происхождения. Терапевтическое применение высоких концентраций гликозидов ограничено развитием угрожающих нарушений ритма и проводимости. Поэтому важным вопросом является изучение основных электрофизиологических проявлений действия дигиталиса. Большинство экспериментальных исследований в этой области было осуществлено либо на изолированных препаратах миокарда, либо *in situ* на животных, хотя многие важные исследования были также проведены на сердце человека. Было обнаружено, что гликозиды оказывают различное действие на разные участки специализированной проводящей системы сердца. Следует отметить, что в общем наблюдается хорошее совпадение результатов, полученных на экспериментальных животных и в наблюдениях на больных.

Прямое действие. Прямое электрофизиологическое действие дигиталиса наиболее широко изучено на волокнах Пуркинье миокардиальных [11]. Причины аритмогенного действия гликозидов были установлены при изучении именно этой ткани. Исследования, в которых волокна Пуркинье собаки подвергались действию сердечных гликозидов, показали, что гликозиды увеличивают частоту спонтанных возбуждений в этой специализированной проводящей ткани, которая может стать источником аномальной электрической активности. В недавних исследованиях было продемонстрировано, что причиной этого может быть возникнове-

следовых деполяризаций, называемых также транзиторными деполяризациями (ТД) или задержанными постдеполяризациями (ЗПД). ТД способны также вызывать волны постсокращений. Обычно транзиторные деполяризации развиваются в волокнах Пуркинье после серии из нескольких вызванных потенциалов действия в присутствии сердечных гликозидов. Появление таких аномальных следовых деполяризаций зависит от частоты, и легче возникает при более высокой частоте стимуляции. Когда транзиторные деполяризации достигают порогового потенциала, то это вызывает серию повторяющихся возбуждений. Такие ТД, согласно сообщениям, наблюдались в препаратах рабочего миокарда предсердий и желудочков при использовании более высоких концентраций сердечных гликозидов. Предполагается, что за развитие этих транзиторных деполяризаций ответствен транзиторный входящий ток.

Косвенные эффекты. В экспериментах и при клинических исследованиях было показано, что гликозиды повышают эфферентную активность блуждающего нерва, и что снижение частоты сердечного ритма, наблюдаемое при действии гликозидов, может быть заблокировано атропином. По-видимому, такое замедление частоты сердечного ритма обусловлено действием гликозидов на несколько разных систем. Во многих исследованиях было показано, что такое замедление ритма зависит от работы всей вегетативной нервной системы, и что определенную роль может играть как активация парасимпатической нервной системы, так и угнетение симпатической.

Активность симпатической нервной системы может быть также усилена при действии дигиталиса, и такое действие наблюдается при токсических дозах гликозидов. На каком участке происходит стимуляция симпатической нервной системы: в ЦНС или в периферических ганглиях, все еще не выяснено, как и значение симпатической стимуляции в развитии аритмий, наблюдающихся при использовании больших доз дигиталиса. Роль нервной системы в проявлении действия дигиталиса рассмотрена в обзоре [12].

Действие на различные ткани сердца. Ткань предсердий очень чувствительна к косвенному действию сердечных гликозидов вследствие своей хорошо известной чувствительности к ацетилхолину. Ацетилхолин значительно снижает эффективный рефрактерный период (ЭРП) в предсердной ткани, угнетает автоматизм и уменьшает длительность потенциала действия (ДПД). Повышается потенциал покоя (ПП) поверхностной мембраны, и ткань гиперполяризуется, вследствие чего снижается скорость проведения. При терапевтических концентрациях дигиталиса ЭРП и ДПД в ткани предсердий уменьшаются в результате того, что доминирует косвенное действие гликозида, хотя при этом его прямое влияние направлено на снижение потенциала покоя мембраны и увеличение длительности потенциала действия. Аналогично этому ацетилхолин влияет на ткань АВ-узла, так что действие дигиталиса на эту ткань оказывается очень значительным.

Снижаются как скорость нарастания, так и амплитуда потенциала действия в ткани АВ-узла, так что происходит ухудшение проводимости, и ЭРП сильно увеличивается. Поэтому токсические концентрации гликозидов могут привести к полной блокаде АВ-узла вследствие нарушения проводимости. Эти эффекты имеют также важное значение при лечении фибрилляции и трепетания предсердий. Волокна Пуркинье и рабочий миокард желудочков значительно менее чувствительны к ацетилхолину, и поэтому на них слабее влияет активация блуждающего нерва при действии дигиталиса. В результате наложения прямых и косвенных электрофизиологических эффектов сердечных гликозидов на ЭКГ у больных, получивших дозу дигиталиса, достаточную для развития положительного инотропного действия, можно наблюдать следующую картину. Частота сердечного ритма уменьшается в результате угнетения автоматизма СА-узла. Интервал $P-R$, соответствующий прохождению возбуждения через АВ-узел, удлиняется вследствие уменьшения скорости проведения по АВ-узлу.

Интервал $Q-T$, характеризующий ЭРП, укорачивается, что является следствием повышения возбудимости в ткани желудочков. Может наблюдаться депрессия или даже инверсия сегмента ST , а также инверсия зубца T .

Терапия нарушений ритма. Сердечные гликозиды являются эффективным средством при фибрилляции и трепетании предсердий и суправентрикулярной пароксизмальной тахикардии.

При терапии трепетаний предсердий основная цель заключается в снижении частоты возбуждений желудочков. Это достигается в результате прямого действия дигиталиса на АВ-узел, а также вследствие вторичного эффекта, вызывающего повышение артериального давления из-за увеличения минутного объема. Это повышает тонус блуждающего нерва и снижает влияние симпатической нервной системы. Прямое действие на АВ-узел проявляется удлинением эффективного рефрактерного периода (ЭРП), вследствие чего меньшее количество импульсов возбуждения достигает желудочков, поэтому наблюдается снижение частоты возбуждений желудочков. Повышение тонуса блуждающего нерва укорачивает рефрактерный период в ткани предсердий, что приводит к дальнейшему увеличению частоты их возбуждений. В результате этого импульсы возбуждения приходят в АВ-узел с высокой частотой, но большая их часть затухает в результате пониженной возбудимости клеток АВ-узла, а рефрактерный период значительно удлинен, поэтому частота сокращений желудочков уменьшается. Сердечные гликозиды оказывают также эффективное действие и против трепетания предсердий. Повышение активности блуждающего нерва укорачивает ЭРП в ткани предсердий, как было сказано выше, и трепетание переходит в фибрилляцию предсердий, которое проще урегулировать. Суправентрикулярные пароксизмальные тахикардии обычно купируются воздействиями, повышающими активность блуждающего нерва, поэтому в таких случаях показано назначение диги-

талиса. Важно отметить, что его передозировка может приводить к развитию суправентрикулярной пароксизмальной тахикардии с АВ-блоком.

ИНТОКСИКАЦИЯ ПРИ ДЕЙСТВИИ ДИГИТАЛИСА

При действии любых гликозидов наблюдаются похожие токсические признаки. Кроме нарушений сердечного ритма, часто отмечаются и другие нежелательные явления. К ним относятся такие нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта, как потеря аппетита, тошнота, рвота и боли в животе. Развитие побочных действий на желудочно-кишечный тракт (особенно тошнота и рвота), по-видимому, происходит вследствие стимуляции мезорепторной триггерной зоны в продолговатом мозге. К наиболее выраженным побочным действиям на ЦНС относятся: головная боль, слабость и сонливость, развивающиеся на ранней стадии интоксикации дигиталисом. У больных, кроме того, возникает расстройство зрения, причем чаще всего наблюдается возникновение пятен в поле зрения и нарушение цветового зрения.

Основным проявлением интоксикации, которое чаще всего встречается у больных, является нарушение ритма сердца. К ним относятся нарушения ритма как предсердий, так и желудочков, а также атриовентрикулярного проведения. Диагноз ставится на основе истории болезни и оценки концентрации гликозида в плазме. Так как терапевтические и токсические дозы гликозидов в плазме перекрываются, основное значение, несомненно, имеет клиническая картина.

Лечение

В случаях, когда поставлен диагноз интоксикации дигиталисом, лечение проводится с назначением одного из нескольких антиаритмических препаратов. Часто эффективно применение лидокаина, прокаинамида или пропранолола. Применение фентонила также дает хорошие результаты при лечении предсердных нарушений ритма, однако отмечалось несколько случаев внезапной смерти при использовании этого препарата. Когда уровень K^+ в плазме в норме понижен, наилучший результат дает диета, богатая калием. Если же уровень K^+ в плазме повышен, дальнейшее введение калия в организм может усилить степень АВ-блока и вызвать остановку сердца. Было предложено несколько объяснений купирования дигиталисных аритмий при повышении уровня K^+ в плазме крови, однако механизм такого действия не выяснен окончательно. Известно, что калий уменьшает установленное количество комплексов гликозид — (Na^+, K^+) -АТФаза, способен повышать активность натриевого насоса и изменяет проницаемость мембраны клеток ткани сердца. В настоящее время нет данных, подтверждающих какую-либо одну из этих гипотез, поэтому все альтернативные механизмы одинаково вероятны.

Взаимодействие препаратов

Одной из интереснейших современных находок является обнаружение взаимодействия между сердечными гликозидами и хинидином. Этот факт имеет большое клиническое значение вследствие использования хинидина для восстановления синусового ритма у больных с трепетанием предсердий, проходящих курс лечения дигиталисом. Было показано, что некоторые сердечные гликозиды, особенно дигоксин, и хинидин занимают одни и те же места связывания во многих тканях. Поэтому одновременное использование этих двух препаратов приводит к возникновению угрожающе высокого уровня гликозида в плазме, что может у многих больных вызвать нарушения сердечного ритма [13]. В случаях, если все же назначается такая комбинированная терапия, необходимо снизить поддерживающую дозу дигоксина или увеличить интервал между приемами. Хинидин снижает клиренс этого сердечного гликозида, а также объем его распределения в организме. Прием хинидина в меньшей степени влияет на концентрации дигоксина в плазме крови, а на концентрацию оубаина он, по-видимому, не воздействует совсем. Хорошо известно взаимодействие между сердечными гликозидами и диуретиками. Усиливающими выведение калия из организма, последствия чего обсуждались ранее. Гипокалиемия приводит к увеличению связывания гликозидов с предполагаемым рецептором в сердце, и может способствовать развитию аритмий. Гиперкалиемия, наоборот, задерживает связывание гликозидов с соответствующим рецептором, и замедляет наступление терапевтического действия. Ионы кальция потенцируют токсическое действие сердечных гликозидов. К другим лекарствам, которые следует использовать очень осторожно вместе с сердечными гликозидами, относятся β -адренергические антагонисты и блокаторы кальциевых каналов, способные препятствовать усилению сокращения миокарда вызываемого гликозидами.

МЕХАНИЗМ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

Клиническое использование сердечных гликозидов связано риском, так как безопасность их применения [9] ограничена очень низким пределом, хотя доказана их высокая эффективность для увеличения силы сокращения миокарда, особенно при сердечной недостаточности. Например, концентрация дигоксина в плазме больных, получающих адекватное лечение гликозидами, обычно находится в диапазоне 1—2 нг/мл. Эта концентрация составляет приблизительно лишь половину обнаруживаемой в плазме больных с признаками интоксикации гликозидами, что свидетельствует об исключительно узком диапазоне их безопасности применения (?) для этой группы соединений. Клинические исследования показывают, что терапевтические и токсические концентрации дигоксина или дигитоксина в плазме перекрываются [14].

Такой узкий диапазон безопасного применения сердечных гликозидов приводит к частому развитию гликозидной интоксикации у больных при лечении дигиталисом. В результате этого многие кардиологи рекомендуют использование альтернативных методов лекарственной терапии, как например, применение диуретиков или кальциевых антагонистов для снижения преднагрузки и постнагрузки с целью улучшения работы сердца, хотя только сердечные гликозиды устраняют причину хронической сердечной недостаточности, проявляющейся неадекватной сократимостью миокарда. Другим подходом к решению этой проблемы является создание препарата, имеющего более широкий диапазон относительно безопасности его воздействия. Следовательно, необходимо понять механизмы, лежащие в основе как терапевтического, так и токсического действия сердечных гликозидов, так как разработка менее вредных соединений, а также налаживание рационального лечения больных в значительной степени зависят от того, совпадают ли рецепторы этих двух типов действия гликозидов или же они различны.

Авторы работы [15], которые первыми провели современные фармакологические исследования механизма действия сердечных гликозидов, еще в 1934 г. поставили вопрос о том, можно ли разделить терапевтическое и токсическое действие гликозидов путем нахождения соответствующих соединений, основываясь на их химической структуре. Такое разделение стало бы возможным только в том случае, когда рецепторы, через которые осуществляют эти два типа действия гликозидов, были бы различными. За прошедшее время было синтезировано много соединений и определено их терапевтическое и токсическое действие. Иногда появлялись сообщения о частичном расширении диапазона безопасности, однако не удалось достигнуть полного разделения этих двух типов действия синтетических производных гликозидов. Так как было уже проведено огромное количество исследований с различной структурой, то полученные результаты позволяют предположить, что эти два типа действия гликозидов, возможно, нельзя полностью разделить.

(Na^+ , K^+)-АТФаза и натриевый насос

Из многочисленных биохимических систем, изученных в течение последних четырех десятилетий, наиболее чувствительным к сердечным гликозидам оказался натриевый насос плазматической мембраны, или сарколеммы, миокардиальных клеток, или его ферментная часть — (Na^+ , K^+)-АТФаза. Различные сердечные гликозиды и их производные специфическим образом связываются с (Na^+ , K^+)-АТФазой и ингибируют ее ферментативную активность [6, 8, 16]. Значительное связывание и развивающееся вследствие этого существенное ингибирование ферментативной активности, наблюдаемое *in vitro*, происходит в тех же пределах концентраций, при которых развивается положительное инотроп-

ное действие гликозидов в изолированных препаратах миокарда или у интактных животных. Более того, если подвергнуть миокард воздействию сердечных гликозидов в терапевтической концентрации, а затем определить активность $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФазы или натриевого насоса, выделенных и изученных в условиях, когда освобождение связанных с ферментом гликозидов пренебрежимо мало, то обычно можно наблюдать, что активность фермента или натриевого насоса ингибирована на 20—40%. Эти результаты позволили предположить, что связывание сердечных гликозидов с $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФазой и развивающееся в результате ингибирование натриевого насоса являются одним из составных элементов механизма положительного инотропного действия этих соединений.

Характеристики положительного инотропного действия

Положительное инотропное действие сердечных гликозидов проявляется многими характерными признаками. Например, очень медленно развивается инотропное действие, что не связано, по видимому, с медленным поглощением гликозидов в желудке, потому что такой же процесс действия гликозидов можно наблюдать даже при внутривенном введении гликозидов, или в изолированных препаратах миокарда, которые подвергаются действию постоянной концентрации гликозидов. Скорость развития инотропного действия может быть увеличена в условиях, в которых выше скорость поступления натрия в миокардиальные клетки. К таким условиям относятся повышенная частота сердечного ритма, возбуждение сердца с помощью парной стимуляции или наличие натриевого ионофора — монензина. Скорость развития замедляется при повышении внеклеточной концентрации калия [16].

Небольшие изменения химической структуры активного сердечного гликозида, например, насыщение лактонного кольца, удаление гидроксильной группы в положении С-14 или остатков сахаров, значительно снижает потенциальную эффективность этого соединения [3, 4]. Спичение положительного инотропного действия сердечных гликозидов и интактного животного обычно определяется выходом соединения из организма, а значит, зависит от скорости метаболизма и выведения. В исследованиях на изолированном сердце, в которых можно быстро снизить концентрацию гликозидов во внеклеточной жидкости до нуля, скорость прекращения инотропного действия зависит от скорости диссоциации гликозида и инотропного рецептора. В таких условиях скорость зависит от химической структуры соединения и вида животного. Чем выше эффективность соединения или чувствительности к нему миокарда, тем медленнее происходит исчезновение эффекта при отмывании [16]. Скорость может быть еще более замедленной при повышении внеклеточной концентрации калия.

Такие довольно уникальные характеристики положительного инотропного действия сердечных гликозидов должны быть объяснены предлагаемым механизмом их инотропного действия.

Связывание сердечных гликозидов с $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФазой

$(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФаза является мембраносвязанным ферментом, ответственным за сопряженный активный транспорт ионов натрия и калия через клеточную мембрану [6]. Очевидно, что ферментативная система проходит через всю толщину клеточной мембраны, связывая ионы натрия на внутренней стороне мембраны, и транспортируя и освобождая их на внешней поверхности. Затем ферментативная система связывает ионы калия на внешней поверхности и освобождает их на внутренней поверхности. Каждый цикл описанной выше реакции связан с циклом фосфорилирования и дефосфорилирования белка фермента, а также с конформационными изменениями последнего. Фермент фосфорилируется с помощью АТФ, который гидролизуется до АДФ и неорганического фосфата в цикле реакции, а свободная энергия, освобождаемая при распаде АТФ, используется для активного транспорта катионов.

Сердечные гликозиды связываются с $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФазой в центре, доступном с внеклеточной стороны [16]. Связывание обычно происходит сразу же после окончания транспорта ферментом ионов натрия, т. е. когда фермент находится в «натриевой» конформационном состоянии. Если отмечается дальнейшее изменение конформационного состояния белка фермента, вызванное ионами калия, то места связывания гликозидов становятся менее доступными. Это означает, что связывание гликозидов с $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФазой доступнее в условиях повышенной внутриклеточной концентрации ионов натрия, способных связываться с натриевым насосом, либо снижена внеклеточная концентрация калия. Следовательно, связывание гликозидов с $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФазой ускоряется в условиях повышенной частоты сердечного ритма, при парной электрической стимуляции, в присутствии натриевого ионофора, например, монензина, или при гипокалиемии. Так как гликозиды связываются с «натриевой» формой фермента, а фермент находится в этой форме в течение довольно короткого времени из всего цикла конформационных изменений связывание сердечных гликозидов с $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФазой происходит относительно медленно, приводя к медленному развитию действия гликозида даже при внутривенном введении.

Изучение связи между структурой различных производных гликозидов и их активностью показало, что способность соединения связываться и ингибировать изолированную $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФазу или натриевый насос хорошо коррелирует с его способностью увеличивать силу сокращения препаратов изолированных фрагментов миокарда [4]. Препараты $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФазы, выделенные из миокарда животных, обладающих высокой чувствительностью к гликозидам, характеризуются высоким сродством к этим соеди-

нениям, а препараты, полученные из миокарда животных с низкой чувствительностью, также имеют низкое сродство к гликозидам, что согласуется с видовой специфичностью чувствительности к сердечным гликозидам. Такие различия сродства изолированной $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФазы для различных производных гликозидов в основном обусловлены различиями в кинетических константах диссоциации или скоростях, с которыми различные соединения освобождают место связывания на ферменте [9]. И в этом случае также наблюдается хорошая корреляция между скоростью диссоциации соединения и изолированной АТФазы и скоростью исчезновения положительного инотропного действия препаратов изолированных фрагментов миокарда [17].

И, наконец, если выделить $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФазу из миокарда, подвергнутого действию гликозидов, в концентрации, вызывающей положительное инотропное действие, обычно можно обнаружить, что фермент ингибирован на 20—40% [16]. Это свидетельствует о том, что к моменту явного развития инотропного действия гликозидов должно произойти существенное связывание их с $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФазой.

Относительно такой тесной зависимости между связыванием сердечных гликозидов с $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФазой и их инотропным действием в настоящее время общепринято, что связывание гликозида с ферментом является одним из элементов механизма их инотропного действия, т. е. $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФаза является молекулярным рецептором фармакологического действия гликозидов.

Последовательность событий, связывающих ингибирование $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФазы с инотропным эффектом

Хотя связывание сердечных гликозидов с $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФазой, по-видимому, имеет большое значение в развитии положительного инотропного действия, имеются различные мнения относительно механизма, обеспечивающего усиление сокращения миокарда при связывании гликозидов с ферментом. В миокарде возбуждение мембраны сопровождается быстрым входом ионов Na^+ , вызывающим деполяризацию мембраны, за которым с некоторой задержкой следует выход ионов K^+ , вызывающий реполяризацию мембраны. В отличие от потенциала действия в нервных клетках интервал времени между деполяризацией мембраны и ее реполяризацией в миокарде, т. е. длительность фазы плато, составляет 200—500 мс. В течение этого времени в клетку входят ионы Ca^{2+} . Эти ионы Ca^{2+} соединяются с освобождающимися из внутриклеточных запасников, что приводит к кратковременному увеличению внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция вскоре после каждого цикла возбуждения мембраны, вызывая сокращение мышцы. Было показано, что сердечные гликозиды усиливают это кратковременное повышение концентрации ионов Ca^{2+} , увеличивая, таким образом, силу сокращения [18]. Поэтому можно сделать вывод, что гликозиды некоторым образом пони-

шают эффективность процессов, связывающих возбуждение мембраны с кратковременным увеличением концентрации Ca^{2+} .

Однако в настоящее время остаются невыясненными точные биохимические или электрофизиологические основы механизма сопряжения возбуждения мембраны с повышением концентрации Ca^{2+} в клетке. Поэтому в какой-то степени трудно понять, каким образом гликозиды изменяют нормальный процесс электромеханического сопряжения и повышают его эффективность. Одним из очевидных последствий связывания гликозидов с $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФазой является угнетение работы натриевого насоса. Поэтому ряд исследователей предположили, что ингибирование натриевого насоса вызывает повышение внутриклеточной концентрации ионов натрия, что в свою очередь приводит к повышению внутриклеточной концентрации ионов кальция либо вследствие стимуляции реакции обмена внеклеточных ионов Ca^{2+} на внутриклеточные ионы Na^+ (вход Ca^{2+} — выход Na^+), либо из-за ингибирования реакции обмена внутриклеточных ионов Ca^{2+} внеклеточными ионами Na^+ (выход Ca^{2+} — вход Na^+) [19]. По-видимому, Na^+ — Ca^{2+} -обмен способен работать в двух направлениях [20], т. е. во время фазы систолы вход Ca^{2+} сопряжен с выведением Na^+ преимущественно вследствие возникновения относительно высокой концентрации Na^+ около внутренней поверхности клеточной мембраны, в то время как в фазе диастолы происходит сопряжение входа Na^+ с выведением Ca^{2+} . Поэтому наиболее вероятно, что ингибирование натриевого насоса, приводящее к уменьшению нормы концентрации ионов Na^+ вблизи внутренней поверхности клеточной мембраны во время систолы, вызывает увеличение входа Ca^{2+} . При таком объяснении возникает проблема связывания с тем, что при действии гликозидов в концентрации, вызывающей инотропный эффект, увеличение внутриклеточной концентрации ионов Na^+ очень мало, несмотря на 40% ингибирование натриевого насоса [21].

Очевидно, что имеется некоторый резерв возможностей натриевого насоса, так как значительное ингибирование его активности не вызывает такого же большого повышения внутриклеточной концентрации ионов натрия. Это означает, что не блокированные гликозидами функциональные единицы натриевого насоса начинают работать быстрее в ответ на небольшое повышение внутриклеточной концентрации ионов Na^+ , что оказывается достаточным для полного выкачивания из клетки всех ионов Na^+ , входящих в нее в течение сердечного цикла. Наличие такого резерва работы насоса очевидно также потому, что скорость выхода Na^+ увеличивается при повышении частоты сердечного ритма или в присутствии веществ, увеличивающих поступление Na^+ в клетки. И в этих условиях наблюдаемое повышение внутриклеточной концентрации ионов Na^+ очень мало [22], свидетельствуя о том, что натриевый насос в этом случае начинает работать быстрее вследствие небольшого повышения внутриклеточной концентрации ионов Na^+ . Этого оказывается достаточно, чтобы компенсировать повышенную скорость входа Na^+ . Следовательно, воз-

пикает вопрос, может ли частичное ингибирование системы, имеющей значительный резерв возможностей, играть какую-либо физиологическую роль.

В действительности небольшого повышения внутриклеточной концентрации Na^+ может оказаться достаточно, чтобы вызвать значительное увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , с учетом того, что внутриклеточная концентрация ионов Na^+ составляет приблизительно 5—10 мМ, а концентрация ионов Ca^{2+} в цитоплазме — менее 0,01 мМ. Вместе с тем диастолические изменения внутриклеточной концентрации ионов Na^+ таковы, что с помощью имеющихся в настоящее время методов невозможно определить экспериментально величину изменений внутриклеточной концентрации ионов Na^+ , вызванных умеренным ингибированием натриевого насоса. Скорость входа Na^+ в клетку резко возрастает в течение начальной фазы трансмембранного потенциала действия. Такое увеличение входа может эффективно повышать концентрацию ионов Na^+ вблизи внутренней поверхности клеточной мембраны, стимулируя, таким образом, работу натриевого насоса, а также реакцию обмена внеклеточных ионов Ca^{2+} на внутриклеточные ионы Na^+ [23]. В течение этого времени может увеличиваться скорость работы отдельных функциональных единиц натриевого насоса в ответ на повышение внутриклеточной концентрации ионов Na^+ даже в отсутствие гликозидов, достигая величины, близкой к их максимальной способности удалять Na^+ из клетки. Поэтому ингибирование натриевого насоса сердечными гликозидами может приводить к более высокому, чем прежде, выведению ионов Na^+ по механизму $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена, что обусловит увеличение входа Ca^{2+} и повышение амплитуды всплесков концентрации Ca^{2+} в сердечном цикле. В поздних фазах потенциала действия скорость входа Na^+ уменьшается, давая возможность натриевому насосу даже при частичном его ингибировании выполнить свои функции до начала следующего цикла возбуждения мембраны.

Такое объяснение согласуется с большинством наблюдений, например с тем, что при действии гликозидов в концентрации, вызывающей инотропный эффект, наблюдается лишь небольшое увеличение внутриклеточной концентрации Na^+ в покоящемся миокарде; что накопление Na^+ в клетках происходит быстрее, если сердце стимулируется с большой частотой; что воздействия или условия, повышающие трансмембранный вход ионов Na^+ , способны увеличивать силу сокращения миокарда; или что увеличение амплитуды всплесков концентрации Ca^{2+} в сердечном цикле, вызванное сердечными гликозидами, относительно слабо влияет на концентрацию Ca^{2+} в миокарде, находящемся в состоянии покоя. Следует отметить, что повышение поступления Na^+ , которое может вызвать те же последствия, что и ингибирование натриевого насоса, также обуславливает инотропные и токсические эффекты, сходные с характерными для действия сердечных гликозидов. Тем не менее такое участие внутриклеточного натрия в этом процессе должно быть подтверждено эксперименталь-

по путем регистрации быстрых изменений во внутриклеточной концентрации ионов Na^+ . Кроме того, необходимо изучить вопрос о том, насколько амплитуды всплесков внутриклеточных концентраций Na^+ и Ca^{2+} в сердечном цикле и скорость работы $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена согласуются с необходимыми для объяснения с помощью этой гипотезы наблюдаемым увеличением амплитуды всплеска внутриклеточной концентрации Ca^{2+} при действии гликозидов.

Возможны и другие объяснения усиления сокращения миокарда в результате связывания гликозидов с $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATФазой}$ при явном наличии резерва активности натриевого насоса. Например, связывание гликозидов с $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATФазой}$ может изменять свойства липидов мембраны, ассоциированных с ферментом, таким образом, что изменяются емкость и сродство мест связывания Ca^{2+} внутри клетки к ионам Ca^{2+} , способствуя связыванию и освобождению ионов Ca^{2+} , происходящих при возбуждении мембраны [24, 25]. Места связывания Ca^{2+} , на которые влияют сердечные гликозиды, могут располагаться либо на внутренней, либо на внешней стороне бислойной липидной мембраны.

Сердечные гликозиды способны оказывать положительное инотропное действие путем прямого действия на сердце, возможно, путем связывания с сарколемной $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATФазой}$ и ингибированием работы натриевого насоса. Однако нет никаких оснований считать априори, что существует только единственный механизм, благодаря которому сердечные гликозиды изменяют силу сокращения миокарда. Например, различные сердечные гликозиды изменяют форму потенциала действия в миокардиальных клетках. Этот эффект зависит как от концентрации, так и от продолжительности действия гликозидов. При низких концентрациях и на ранней стадии воздействие гликозидов удлиняет потенциал действия, а при высоких концентрациях и после длительного влияния они укорачивают потенциал действия. Такие изменения не могут являться основным механизмом положительного инотропного действия гликозидов, так как инотропный эффект может наблюдаться и при укороченном потенциале действия и при удлиненном. Тем не менее такие изменения потенциала действия несомненно влияют на силу сокращения, которая начинает заранее возрастать если потенциал действия удлиняется. Допускают, что положительный инотропный эффект сердечных гликозидов опосредован двумя и более параллельными механизмами.

МЕХАНИЗМЫ ТОКСИЧНОСТИ

Причинами наиболее типичного проявления токсического действия сердечных гликозидов — нарушения ритма сердца — по-видимому, являются как их прямое действие на сердце, так и обусловленное повреждением нервной системы, хотя некоторые признаки токсичности, такие как тошнота, рвота, утомляемость, и преобладание желтого цвета в зрительном восприятии несом-

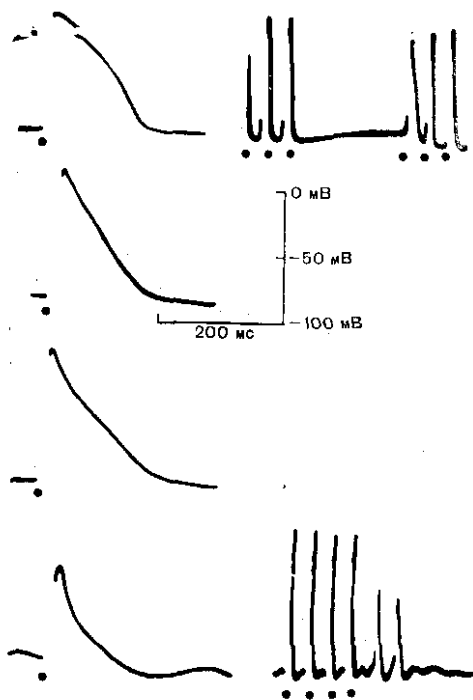


Рис. 14.2. Трансмембранный потенциал действия проводящего кардиомиоцита кошки при действии токсической концентрации дигоксина. На фоне 2 мкМ дигоксина вслед за четырьмя потенциалами действия, вызванными электрической стимуляцией, развиваются два осцилляторных следовых потенциала (нижняя регистрация). Вверху приведена контрольная запись до действия дигоксина. Таблица 18.1.

ненно обусловлены их прямым действием на ЦНС. Так как аритмогенное действие гликозидов можно продемонстрировать на изолированных препаратах миокарда, то, по-видимому, гликозиды способны вызывать аритмии при прямом действии на сердце. Обычно принято считать, что

такое прямое аритмогенное действие гликозидов является следствием ингибирования натриевого насоса в степени, когда оказываются исчерпанными все резервы его работы [21]. В экспериментах на собаках, находящихся под наркозом, кардиотоксичность гликозидов проявляется в случаях, когда работа натриевого насоса ингибирована на 60—80%. При таком уровне ингибирования натриевого насоса оставшейся активности недостаточно для выкачивания наружу ионов Na^+ , входящих в клетку в процессе возбуждения мембраны. Это приводит к накоплению в клетках миокарда ионов Na^+ и потере ими ионов K^+ .

Такое накопление Na^+ и потеря K^+ вызывает частичную деполяризацию клеток, т. е. трансмембранный потенциал становится менее отрицательным, приближаясь к потенциалу порога активации натриевых каналов. Однако предположение о том, что при снижении разности между потенциалом покоя мембраны и пороговым потенциалом возрастает возбудимость миокардиальных клеток, в них легче возникают потенциалы действия даже без возбуждения нормальным водителем ритма, и поэтому развиваются аритмии, не было подтверждено в экспериментальных исследованиях, которые продемонстрировали, что повышение внеклеточной концентрации K^+ вызывает еще более высокую деполяризацию, но купирует аритмии, вызванные сердечными гликозидами (рис. 14.2).

Электрофизиологические исследования указывают, что желудочковая тахикардия, вызванная токсичными дозами сердечных гликозидов, возникает по крайней мере исходно в волокнах Пуркинье [26]. Если волокна Пуркинье подвергнуть действию токсических концентраций гликозидов, то можно наблюдать появление осцилляторных следовых потенциалов, возникающих сразу после окончания реполяризации. Осцилляторные следовые потенциалы, по-видимому, вызываются флюктуациями проницаемости мембраны для различных катионов в течение короткого промежутка времени после реполяризации мембраны. Такое увеличение проницаемости мембраны приводит к тому, что в клетку входят ионы Na^+ и, возможно, ионы Ca^{2+} , приводя к появлению транзитного входящего тока, который и деполяризует мембрану. Подпороговые осцилляторные следовые потенциалы не распространяются по миокарду, однако когда амплитуда следового потенциала увеличивается и достигает порога, возникают спонтанные потенциалы действия. Они будут распространяться и вызывать экстрасокращения сердца. При интоксикации гликозидами в волокнах Пуркинье такие спонтанные возбуждения могут стать повторяющимися, приводя к желудочковой тахикардии.

Такое транзитное увеличение проницаемости мембраны, ответственное за возникновение спонтанных следовых потенциалов, по-видимому, является результатом чрезмерного повышения концентрации Ca^{2+} вблизи внутренней поверхности клеточной мембраны. Токсические дозы сердечных гликозидов ингибируют работу натриевого насоса свыше резерва его возможностей, приводя к накоплению Na^+ внутри клетки, что затем вызывает перегрузку клетки Ca^{2+} , снижая выведение Ca^{2+} , вследствие ингибирования сопряженной реакции обмена внутриклеточного кальция с внеклеточным натрием. Считают, что перегрузка кардиомиоцитов кальцием вызывает осцилляторные перемещения Ca^{2+} между внутриклеточными запасниками и миоплазмой, сопровождающимися фазическими изменениями проводимости мембраны.

Такие фазические изменения проводимости мембраны и развивающиеся вследствие этого желудочковые аритмии, вызванные осцилляторными следовыми потенциалами (триггерная активность), следует отличить от повышенной пейсмекерной активности аномального автоматизма. В отличие от последней триггерная активность значительно в меньшей степени угнетается после периода повышенной стимуляции («овердрайв»), потому что триггерная активность усиливается при повышении частоты стимуляции, а пейсмекерная активность обладает свойством подавляться после окончания периода искусственной стимуляции с высокой частотой. Повышение внеклеточной концентрации Ca^{2+} угнетает аномальный автоматизм, уменьшая наклон деполяризации фазы 4, но усиливает осцилляторные следовые потенциалы, вызванные интоксикацией гликозидами.

Сердечные гликозиды способны вызывать аритмии многих различных типов. По-видимому, наиболее серьезной из них является желудочковая тахикардия, так как она представляет наиболь-

шую опасность для больных. Однако наиболее частый тип аритмии, наблюдаемый в клинике при использовании дигиталиса, связан с угнетением АВ-проведения. У большинства больных, принимающих «терапевтические» дозы дигиталиса, наблюдается небольшое уширение P—R-интервала, т. е. АВ-блок первой степени. При увеличении дозы сердечных гликозидов возникают АВ-блоки более высоких степеней. Причиной блокирования проведения по АВ-узлу считается активация парасимпатических нервов, по-видимому, вследствие влияния гликозидов на ЦНС, так как АВ-блок в этом случае легко снимается атропином или при ваготомии у экспериментальных животных, хотя несомненно присутствуют и другие механизмы, кроме активации блуждающего нерва. Блокирование симпатической нервной системы различными способами также приводит к увеличению дозы сердечных гликозидов, необходимой для развития аритмий. Однако остается неясным, играет ли в аритмогенном действии гликозидов какую-либо роль увеличение активности симпатической нервной системы, или ее тоническая активность необходима лишь для сохранения уязвимости сердца к интоксикации гликозидами. Последняя точка зрения подтверждается тем, что тоническая активность симпатических нервов не всегда возрастает у экспериментальных животных при токсических концентрациях гликозидов. Так как гликозиды повышают чувствительность барорецепторов, пачки активности симпатической нервной системы становятся более сильно выраженными; их амплитуда в фазе диастолы возрастает, а в фазе систолы активность симпатической нервной системы практически исчезает [27].

Однако суммарная активность может оставаться несколько сниженной до тех пор, пока развитие вызванных гликозидами аритмий не приведет к значительному понижению среднего артериального давления.

Особый интерес представляет гипотеза о том, что гликозиды вызывают нарушение однородности активности в сердечном симпатическом нерве, что приводит к развитию неоднородности электрофизиологических свойств кардиомиоцитов, обуславливая предрасположенность к аритмиям [28]. Если это справедливо, то активность симпатических нервов вносит определенный вклад в развитие аритмий при интоксикации гликозидами независимо от того, увеличивается она или уменьшается.

Таким образом, возникновение токсических эффектов сердечных гликозидов может быть обусловлено как прямым действием гликозидов на миокард, так и косвенным влиянием через нервную систему. Последнее может быть вызвано изменением чувствительности барорецепторов, центральным действием гликозидов, а также влиянием на нервные окончания. Влияние гликозидов на различные системы не является удивительным, так как (Na⁺, K⁺)-АТФаза имеется в тканях всех органов и, по-видимому, играет в них важную роль. Проявление действия сердечных гликозидов легко объяснить, исходя из представления об ингибировании работы натриевого насоса, так как такие проявления

связаны либо со снижением трансмембранной разности потенциалов, либо с усилением обмена внутриклеточного натрия на внеклеточный кальций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Withering W.* An account of the foxglove and some of its medical uses: with practical remarks on dropsy and other diseases. CGJ and J. Robinson, 1784. — Reprinted in med. class. 1937, vol. 2, p. 305—443.
2. *Cattell M., Gold H.* The influence of digitalis glycosides on the force of contraction of mammalian cardiac muscle. — *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1938, vol. 62, p. 116—125.
3. *Chen K. K., Henderson F. G.* Pharmacology of sixtyfour cardiac glycosides and aglycones. — *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1954, vol. 11, p. 365—383.
4. *Thomas R., Brown L., Gelbart A.* The digitalis receptor: interferences from structure activity relationships. — *Circulat. Res. (Suppl. 1)*, 1980, vol. 46, p. 167—172.
5. *Tamm C.* The stereochemistry of the glycosides in relation to biological activity. — In: *Proceedings of the First International Pharmacological Meeting*, vol. 3: Newer aspects of cardiac glycosides/Ed. W. Wellbrandt, P. Lindgren. Oxford: Pergamon, 1963, p. 11—26.
6. *Schwartz A., Lindenmayer G. E., Allen J. C.* The sodium-potassium adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects. — *Pharmacol. Rev.*, 1975, vol. 27, p. 3—134.
7. *Goldman R. H., Coltart D. J., Schweizer E.* et al. Dose response in vivo to digoxin in normo- and hyperkalaemia-associated biochemical changes. — *Cardiovasc. Res.*, vol. 9, p. 515—523.
8. *Akera T., Brody T. M.* The role of Na^+ , K^+ -ATPase in the inotropic action of digitalis. — *Pharmacol. Rev.*, 1977, vol. 29, p. 187—220.
9. *Tobin T., Brody T. M.* Rates of dissociation of enzyme-ouabain complexes and K_0 values in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ adenosine-triphosphatase from different species. — *Biochem. Pharmacol.*, 1972, vol. 21, p. 1553—1560.
10. *Mason D. T.* Regulation of cardiac performance in clinical heart disease: interactions between contractile state mechanical abnormalities and ventricular compensatory mechanisms. — *Amer. J. Cardiol.*, 1973, vol. 32, p. 437—448.
11. *Tsien R. W., Weigart R., Kass R. S.* Digitalis: inotropic and arrhythmogenic effects on membrane currents in cardiac Purkinje fibers. — In: *Biophysical aspects of cardiac muscle*/Ed. M. Morad. New York: Academic, 1978, p. 345—368.
12. *Gillis R. A., Quest J. A.* The role of the nervous system in the cardiovascular effects of digitalis. — *Pharmacol. Rev.*, 1979, vol. 31, p. 19—97.
13. *Doering W.* Quinidine-digoxin interaction pharmacokinetics underlying mechanism and clinical implications. — *New Engl. J. Med.*, 1979, vol. 301, p. 400—404.
14. *Beller G. A., Smith T. W., Abelmann W. H.* et al. Digitalis intoxication: a prospective clinical study with serum level correlation. — *New Engl. J. Med.*, 1971, vol. 284, p. 989—997.
15. *Cattell M., Gold H.* Studies on purified digitalis glycosides. III. The relationship between therapeutic and toxic potency. — *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1941, vol. 71, p. 114—125.
16. *Akera T.* Effects of cardiac glycosides on Na^+ , K^+ -ATPase. — In: *Handbook of experimental pharmacology*, Vol. 56/1/Ed. K. Greeff. Cardiac glycosides. Heidelberg: Springer-Verlag, 1981, pp. 288—336.
17. *Akera T., Baskin S. I., Tobin T., Brody T. M.* Ouabain: temporal relationship between the inotropic effect and the in vitro binding to, and dissociation from $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase. — *Naynyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak.*, 1973, vol. 277, p. 151—162.
18. *Allen D. G., Blinks J. R.* Calcium transients in aequorin-injected frog cardiac muscle. — *Nature*, 1978, vol. 273, p. 509—513.

19. *Langer G. A.* The intrinsic control of myocardial contraction-ionic factors. — *New Engl. J. Med.*, 1971, vol. 285, p. 1065—1071.
20. *Reuter H.* Exchange of calcium ions in the mammalian myocardium. — *Circulat. Res.*, 1974, vol. 34, p. 599—605.
21. *Lee K. S., Klauss W.* The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides. — *Pharmacol. Rev.*, 1971, vol. 23, p. 193—261.
22. *Langer G. A.* Ion fluxes in cardiac excitation and contraction and their relation to myocardial contractility. — *Physiol. Rev.*, 1968, vol. 48, p. 708—757.
23. *Akera T.* Membrane adenosinetriphosphatase: a digitalis receptor?—*Science*, 1977, vol. 198, p. 569—574.
24. *Gervais A., Lane L. K., Anner B. M.* et al. A possible molecular mechanisms of the action of digitalis: ouabain action on calcium binding to sites associated with a perfused sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase from kidney. — *Circulat. Res.*, 1977, vol. 40, p. 3—14.
25. *Lullmann H., Peters T.* Action of cardiac glycosides on the excitation-contraction coupling in heart muscle. — *Prog. Pharmacol.*, 1979, vol. 2, p. 1—57.
26. *Ferrier G. R., Saunders J. H., Mendez C.* A cellular mechanism for the generation of ventricular arrhythmias by acetyl-strophanthidin. — *Circulat. Res.*, 1973, vol. 32, p. 600—609.
27. *Weaver L. C., Akera T., Brody T. M.* Digoxin toxicity: primary sites of drug action on the sympathetic nervous system. — *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1976, vol. 197, p. 1—9.
28. *Lathers C. M., Kelliher G. J., Roberts J., Beasley A. B.* Nonuniform cardiac sympathetic nerve discharge: mechanism for coronary occlusion and digitalis-induced arrhythmias. — *Circulation*, 1978, vol. 57, p. 1058—1065.

Глава 15

ХАРАКТЕРИСТИКА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ КАЛЬЦИЕВЫХ АНТАГОНИСТОВ И ДРУГИХ АНТИАНГИНАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

А. ФЛЕКЕНШТЕЙН, Г. ФЛЕКЕНШТЕЙН-ГРЮН
(А. FLECKENSTEIN, G. FLECKENSTEIN-GRÜN)

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее важных достижений современной общей кардиологии является то, что многие вещества, оказывающие положительное или отрицательное инотропное действие на миокард, выступают в роли активаторов или ингибиторов функции ионов Ca^{2+} в электромеханическом сопряжении. Например, стимуляция β -адренорецепторов при действии адреналина, норадrenalина или изопротеренола усиливает трансмембранное поступление Ca^{2+} во время возбуждения. Это приводит к увеличению расщепления АТФ с помощью Ca^{2+} -активируемой АТФазой миофибрилл и повышению развиваемой миокардом силы сокращения. Аналогично этому при действии сердечных гликозидов к сократительным миофибриллам поступает больше Ca^{2+} . И наоборот, ряд веществ, оказывающих отрицательное инотропное действие, может угнетать процесс электромеханического сопряжения в миокарде, препятствуя поступлению в клетку ионов Ca^{2+} .

Прошло почти 20 лет с тех пор, как появилось первое сообщение о результатах исследования в нашей лаборатории нового соединения (известного в дальнейшем под разными наименованиями: изоптин, ипровератрил или верапамил), действие которого на сердце воспроизводит эффекты простого удаления Ca^{2+} из раствора [1]. Это соединение, как и недостаток Ca^{2+} во внеклеточной среде, уменьшало зависимую от Ca^{2+} силу сокращения без существенного изменения потенциала действия, снижало зависящее от Ca^{2+} использование макроэргических фосфатов в сокращающемся сердце и понижало потребление кислорода из внеклеточной среды одновременно с уменьшением силы сокращения. Однако такое ингибирующее действие верапамила может быть быстро нейтрализовано с помощью дополнительного введения Ca^{2+} в среду, добления β -адренергических катехоламинов или сердечных гликозидов, т. е. в результате действия способных восстановить поступление Ca^{2+} к сократительной системе. Таким образом, верапамил является наиболее интересным предшественником из Ca^{2+} -антагонистов, которые были в дальнейшем обнаружены в нашей лаборатории (табл. 15.1). В действительности Ca^{2+} -антагонизм оказался совершенно новым фармакодинамическим при-

Таблица 15.1. Са²⁺-антагонисты

Группа А: Высокоспецифичные кальциевые антагонисты

Критерий: ингибирование медленного входящего кальциевого тока на 90—10% без сопутствующего влияния на натриевую проводимость мембраны

Верапамил	Нифедипин
Д-600 (галлопамил)	Нилудипин
Дилтиазем	Нимодипин

Группа Б: Кальциевые антагонисты умеренной специфичности

Прениламин	Теродипин
Фендилин	Перхексиллин

Кароверин

Доказательства специфичности Са²⁺-антагонистического действия перечисленных выше соединений впервые были представлены в следующих публикациях: Верапамил — [12], [3, 4], Д-600 — [12], [4], Нифедипин — [12], [8, 54, 55], [11], Нилудипин — [56], Дилтиазем — [57], Прениламин — [12], [3, 4], Фендилин — [58], Теродипин — (Fleckenstein, Fleckenstein-Grün, неопубликованные данные), Перхексиллин — [59].

ципом угнетения сократимости миокарда, явно отличным от блокирования β-рецепторов [2, 3]. Поэтому в 1969 г., основываясь на проведенных нами исследованиях верапамила, метоксиверапамила (Д-600) и прениламина, мы считали, что имели право ввести термин «кальциевый антагонист» для большей ясности [4].

Однако в результате сравнительных исследований оказалось возможным разделить вещества, перечисленные в табл. 15.1, на две группы: в группу А включены Са²⁺-антагонисты, обладающие исключительно высокой эффективностью и специфичностью, такие как верапамил, Д-600, нифедипин, риозидин, нилудипин и дилтиазем. Вещества из группы А способны ингибировать зависящий от ионов Са²⁺ процесс электромеханического сопряжения в миокарде желудочков млекопитающих на 90% и более, еще не влияя на быстрый вход Na⁺ в фазе нарастания потенциала действия, на который эти вещества тоже воздействуют. Более того, они не влияют на электрогенные мембранные эффекты ионов Mg²⁺. В группу Б входят прениламин, фендилин, теродипин, кароверин и перхексиллин, которые в некоторой степени оказывают менее эффективное и специфичное действие. Это означает, что при их влиянии наблюдается угнетение процесса возбуждения, зависящего от Na⁺, когда развитие силы сокращения изолированной папиллярной мышцы морской свинки, зависящее от Са²⁺, снижено на 50—70%. Более того, вещества из группы Б неспособны также по отдельности влиять на биоэлектрические мембранные эффекты, вызываемые ионами Mg²⁺ и Са²⁺. Имеются

сообщения о том, что цинкарizin и флунаризин также принадлежат к группе В, однако плохая растворимость этих препаратов в воде не позволила нам провести необходимый электрофизиологический анализ их действия на изолированных фрагментах миокарда [5].

Полный спектр реакций организма на действие Ca^{2+} -антагонистов не ограничивается лишь снижением расхода энергии и потребления кислорода для обеспечения сокращения сердца, так как существует ряд других терапевтически важных аспектов их действия:

1. Например, при действии на миокард Ca^{2+} -антагонисты обеспечивают также кардиопротекцию, т. е. защищают от вредных последствий перегрузки кардиомиоцитов ионами Ca^{2+} , которые являются основным фактором в патогенезе некроза миокарда;

2. Основное действие Ca^{2+} -антагонистов на водитель ритма сердца состоит в торможении зависящего от Ca^{2+} автоматизма. Это еще в большей степени относится к эктопическому фокусу. Более того, могут блокироваться пути рециркуляции возбуждения;

3. При действии на гладкую мышцу сосудов снижается тонус мускулатуры, зависящий от ионов Ca^{2+} , и исчезают спазмические сокращения. Поэтому все Ca^{2+} -антагонисты способны в очень низких концентрациях расслаблять гладкую мускулатуру коронарных, мозговых, брыжеечных и почечных артерий [5, 6—11].

Однако действие Ca^{2+} -антагонистов на миокард, водитель ритма сердца и гладкомышечные клетки сосудов выражено по-разному в зависимости от конкретного Ca^{2+} -антагониста, используемого в данном случае. Например, если внутривенно ввести верапамил или Д-600, то их действие в качестве Ca^{2+} -антагонистов на миокард, водители ритма и гладкомышечные клетки сосудов окажется почти одинаковым. С другой стороны, нифедипин и его производные (нилудипин и нимодипин) преимущественно угнетают сократимость сосудистой стенки, а их влияние на работу водителя сердечного ритма выражено умеренно по крайней мере у собак и у людей. Благодаря этим особенностям нифедипин и его производные являются сильными вазодилататорами. И, наоборот, действие верапамила особенно эффективно благодаря прямому кардиопротекторному влиянию. Он применяется при кардиомиопатиях и в качестве антиаритмического препарата. Дилтиазем также преимущественно влияет на сократительную активность мышечной стенки сосудов, хотя по фармакологическому действию он ближе к верапамилу, чем к нифедипину.

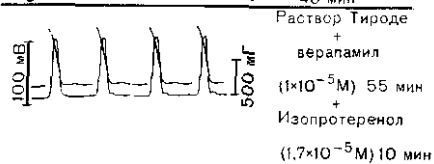
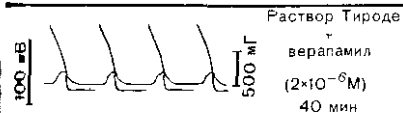
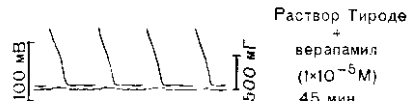
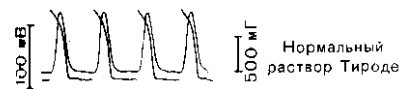
Таким образом, наличие разных свойств у Ca^{2+} -антагонистов свидетельствует о том, что они не представляют собой однородную группу соединений. Тем не менее существует достаточно доказательств, что все Ca^{2+} -антагонисты, приведенные в табл. 15.1, относятся к одной группе фармакологических препаратов, оказывающих одинаковое и общее для них действие на сердечно-сосудистую систему. В настоящее время Ca^{2+} -антагонисты пользуются большой популярностью и поэтому количество таких соедине-

ний, применяемых в практике, быстро растет. Но среди истинных Ca^{2+} -антагонистов встречаются также препараты, которые были выпущены под этим названием без надлежащей проверки. Например, лидофлазин, как было заявлено его производителями, представляет собой Ca^{2+} -антагонист, но в результате проведенного нами исследования оказалось, что это соединение в большей степени угнетает процессы возбуждения, зависящие от Na^+ , чем сократительные параметры, зависящие от Ca^{2+} . Излишне напоминать, что препарат под названием « Ca^{2+} -антагонист» должен быть официально признан в том случае, если он угнетает все процессы, связанные с поступлением Ca^{2+} в клетки, настолько специфически, что всеми остальными его фармакологическими свойствами по крайней мере в разумном диапазоне доз можно более или менее пренебречь [5, 6, 12, 13].

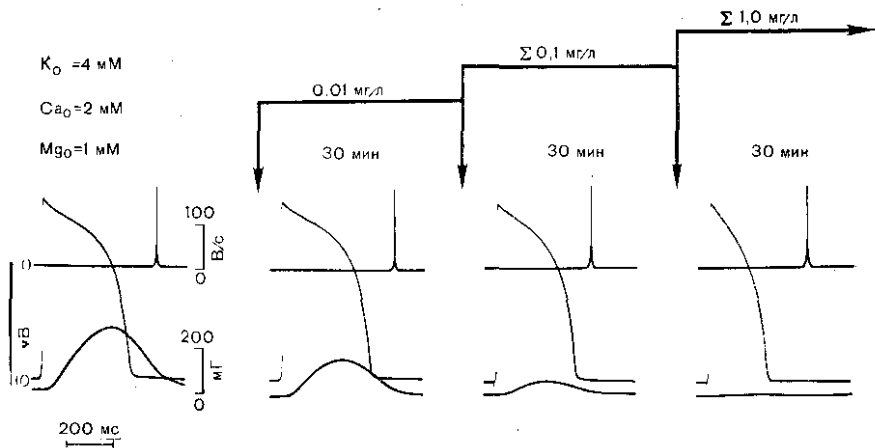
ПРОТИВОПОЛОЖНОЕ ДЕЙСТВИЕ КАЛЬЦИЕВЫХ АНТАГОНИСТОВ И β -АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ КАТЕХОЛАМИНОВ НА ТРАНССАРКОЛЕММАЛЬНОЕ ПОСТУПЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ И РАЗВИТИЕ СИЛЫ СОКРАЩЕНИЯ СЕРДЦА

На рис. 15.1 показаны результаты основополагающих экспериментов очевидного Ca^{2+} -антагонистического действия на развитие силы сокращения изолированных препаратов папиллярной мышцы морской свинки нескольких Ca^{2+} -антагонистов. Очевидно, что сокращение, регистрируемое в изометрическом режиме, полностью угнетается высокими дозами верапамила, нифедипина или дилтиазема. Используемые при этом высокие концентрации достаточны для практически полного блокирования «медленного» входящего тока ионов Ca^{2+} через возбужденную мембрану сарколеммы миокардиальных клеток, как установлено путем прямых измерений этого тока с помощью метода фиксации потенциала [14, 15]. «Быстрый» вход ионов Na^+ , ответственный за возникновение потенциала действия, остается при этом без изменений. Поэтому на рис. 15.2 и 15.3 не наблюдается никаких изменений скорости нарастания потенциала действия и величины овершута. По-видимому, слегка укорачивается лишь плато потенциала действия вследствие того, что ток, переносимый ионами Ca^{2+} , блокирован и не может участвовать в поддержании д

Рис. 15.1. Селективное угнетение сократимости миокарда кальциевыми антагонистами. Максимальная скорость нарастания потенциала действия ($dV/dt_{\text{макс}}$), зависящая от быстрого натриевого тока, и амплитуда потенциала действия не изменяются (см. верхние кривые записи dV/dt на рис. б и в). Восстановление амплитуды силы сокращения при действии изопроterenола (рис. а) или при повышении внеклеточной концентрации ионов Ca^{2+} (рис. в). Препарат папиллярной мышцы, выделенной из сердца морской свинки, в растворе Тироде, содержащем 2 мМ Ca^{2+} . Рис. а воспроизведен из [60].



Нифедипин

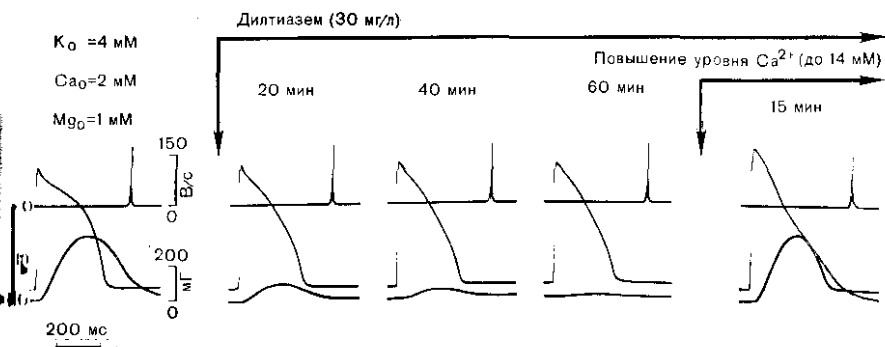


Папиллярная мышца морской свинки

Частота стимуляции: 30 мин^{-1}

Температура : 30°C

б



Папиллярная мышца морской свинки

Частота стимуляции: 30 мин^{-1}

Температура : 30°C

Влияние снижения концентрации Ca^{2+}

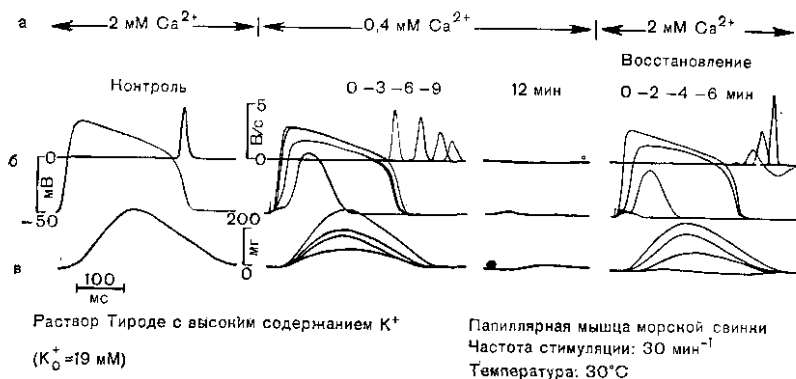


Рис. 15.2. Одновременное угнетение кальциевого потенциала действия и силы сокращения папиллярной мышцы сердца морской свинки, частично деполаризованной в растворе Тироде с высоким содержанием K^+ (19 мМ), при снижении внеклеточной концентрации ионов Ca^{2+} от 2 до 0,4 мМ.

а — $dV/dt_{\text{макс}}$; б — потенциал действия; в — сила сокращения, зарегистрированная в изометрическом режиме. Частота стимуляции 30/мин; температура 22°C.

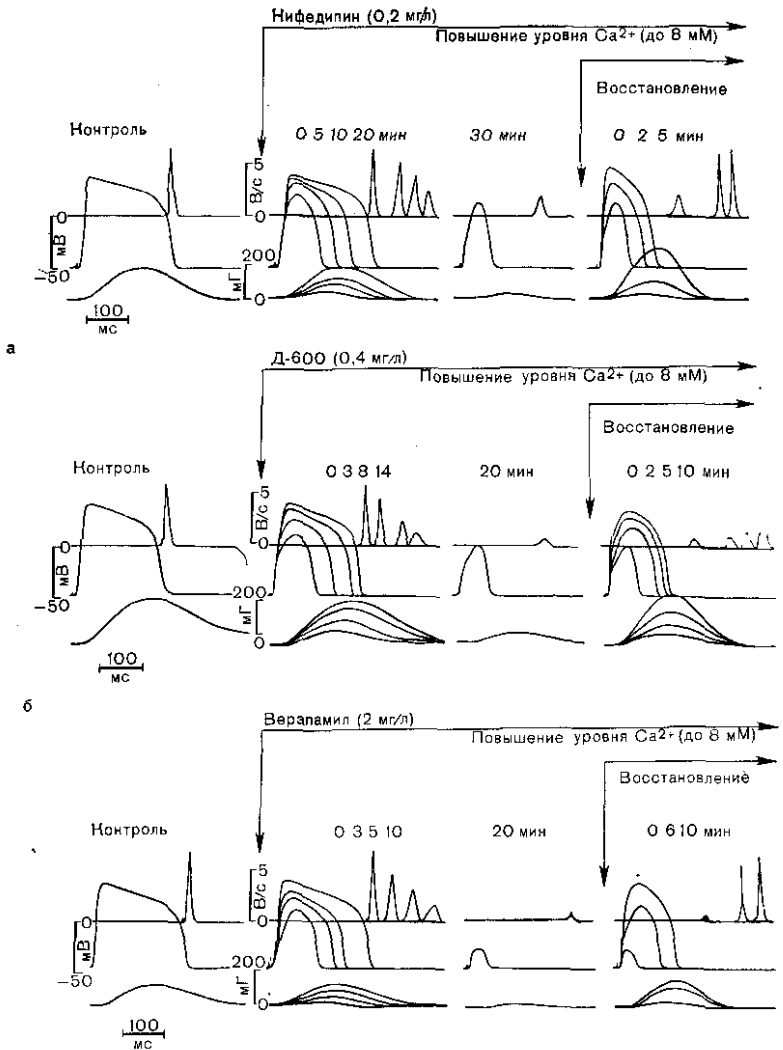
поляризации в конце фазы плато. Ca^{2+} -антагонисты и симпатические медиаторы оказывают такое же противоположное действие на медленный входящий Ca^{2+} -ток: Ca^{2+} -антагонисты уменьшают трансмембранный вход ионов Ca^{2+} в то время как стимуляция β -рецепторов увеличивает входящий Ca^{2+} -ток даже в присутствии Ca^{2+} -антагонистов. Все специфические Ca^{2+} -антагонисты группы А при введении в чрезвычайно высокой концентрации способны избирательно подавить сократительную активность сердца в равной степени, достигающей почти 100%, и во всех этих случаях β -адренергические соединения в подходящих дозах восстанавливали сократительные ответы [5].

Несомненно, что мембрана сарколеммы является основным местом действия Ca^{2+} -антагонистов. В нашей лаборатории было показано, что способность Ca^{2+} -антагонистов управлять силой сокращения исчезает, если сарколеммальную мембрану миокардиальных волокон заранее удалить путем экстракции в смеси глицерина с водой или при помощи метода Winegrada [16]. В таких скиннированных волокнах Ca^{2+} -антагонисты не вызывают никакого угнетения величины механического напряжения, активируемого непосредственным добавлением в среду АТФ и Ca^{2+} . Это свидетельствует о том, что структурная целостность мембраны сарколеммы кардиомиоцитов является необходимым для проявления действия Ca^{2+} -антагонистов. Очевидно, что эти вещества утрачивают свои способности, в случае если ионы Ca^{2+} имеют свободный доступ к миофибриллам, где происходит расщепление АТФ. Следовательно, Ca^{2+} -антагонисты непосредственно не влияют на Ca^{2+} -зависимую активацию миофибриллярной АТФазы и превращение энергии в миофибриллах. Аналогично этому отри-

дательные результаты были получены в нескольких попытках показать ингибирующее влияние верапамила в концентрациях, вызывающих отрицательное инотропное действие на связывание, аккумуляцию и Ca^{2+} -обмен в фрагментах саркоплазматического ретикулула [17—19]. Более того, в изолированных из миокарда митохондриях верапамил угнетает поглощение Ca^{2+} только при концентрациях, более чем в 1000 раз превышающих необходимые для подавления сократительной активности [20]. Другими словами, в настоящее время отсутствуют какие-либо убедительные доказательства действия Ca^{2+} -антагонистов в концентрациях, оказывающих отрицательное инотропное действие на внутриклеточные органеллы.

Результаты многих исследований показывают, что сарколема не только регулирует поступление Ca^{2+} из внеклеточного пространства в миоплазму, но играет также важную роль в качестве Ca^{2+} -аккумулирующей системы, которая активно захватывает Ca^{2+} из среды. По-видимому, наибольшая концентрация Ca^{2+} достигается в тех участках сарколеммы, которые вогнуты внутрь в виде Т-тубул. Из этого положения ионы Ca^{2+} поступают внутрь миокардиальных волокон через медленные каналы сразу после того, как распространяющаяся волна возбуждения деполяризует эти структуры. Основная реакция, приводящая к увеличению количества связанных с мембраной ионов Ca^{2+} , по-видимому, связана с образованием цАМФ [22, 23], хотя в базальной мембране содержится много мукополисахаридных соединений, как в свободной форме, так и связанных с отрицательно заряженными белками, обладающими избирательным сродством к Ca^{2+} [21]. Согласно этой концепции, β -адренергические катехоламины, стимулируя образование цАМФ, активируют мембраносвязанную протеинкиназу, которая в свою очередь вызывает фосфорилирование мембранных белков вблизи медленных каналов или даже внутри них. Вследствие этой реакции увеличивается число фиксированных отрицательных фосфатных групп, способных связывать ионы Ca^{2+} , в то время как ионы Mg^{2+} , по-видимому, вытесняются с мембраны [5]. Таким способом, вероятно, β -адренергические катехоламины способствуют накоплению поверхностного пула ионов Ca^{2+} , в котором они содержатся в слабосвязанной форме, и поэтому мгновенно поступают к медленным каналам, как только происходит деполяризация. Другими словами, β -адренергические катехоламины, по-видимому, увеличивают емкость поверхностных запасников Ca^{2+} , поэтому усиливается как захват Ca^{2+} , из среды, так и последующий вход Ca^{2+} через сарколемму даже при значительном уменьшении внеклеточной концентрации Ca^{2+} или в присутствии Ca^{2+} -антагонистов. Дибутирил цАМФ увеличивает входящий кальциевый ток наиболее прямым способом, т. е. без активации адренергических β -рецепторов.

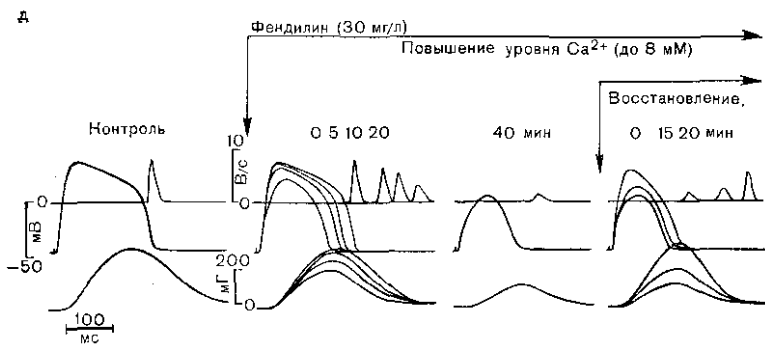
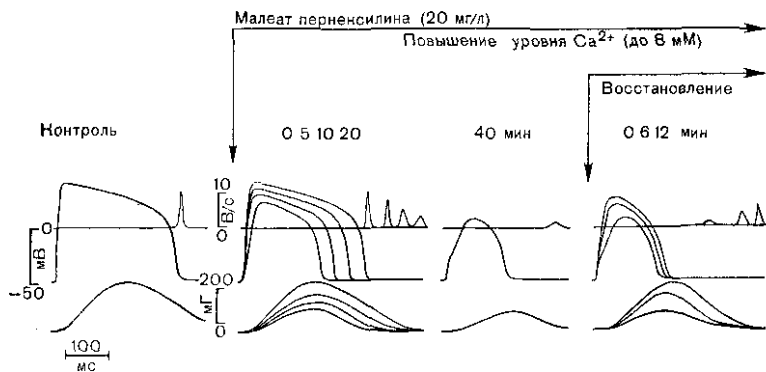
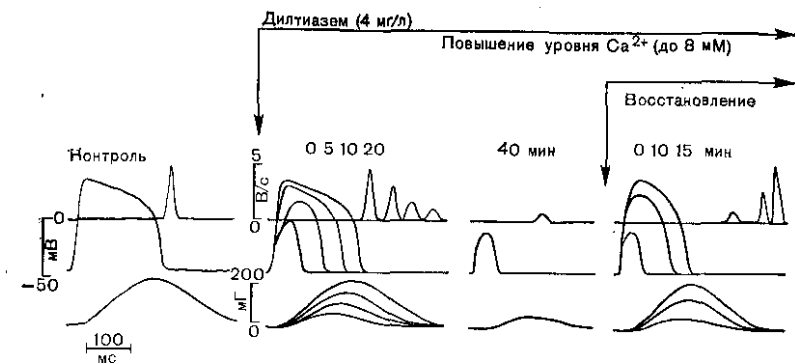
Вместе с тем Ca^{2+} -антагонисты оказывают прямо противоположное действие на связывание Ca^{2+} с поверхностью сарколеммы. Они не влияют на образование цАМФ [19], но, по-видимому, вытесняют Ca^{2+} с поверхности клеток, не говоря уже об их прямом дей-



Раствор Тироде с высоким содержанием K^+
 $\text{K}_0^+ = 19 \text{ мМ}$

Папиллярная мышца морской свинки
 Частота стимуляции: 30 мин^{-1}
 Температура: 30°C

Рис. 15.3. Одновременное угнетение кальциевого потенциала действия и силы сокращения папиллярной мышцы сердца морской свинки, частично деполяризованной в растворе Тироде с высоким содержанием K^+ (19 мМ) и нормальной концентрацией Ca^{2+} (2 мМ), при действии различных кальциевых антагонистов (а—в). Метод регистрации и экспериментальные условия те же, что на рис. 15.2.



Раствор Тироде с высоким содержанием K^+
 $\text{K}_0^+ = 19 \text{ мМ}$

Палиллярная мышца морской свинки
 Частота стимуляции: 30 мин^{-1}
 Температура: 30°C

ствии на входящий кальциевый ток по медленным каналам. В соответствии с этим можно с помощью верапамила вытеснить весь связанный Ca^{2+} с поверхности изолированных фрагментов саркомеромы кардиомиоцитов [18]. Мембраны кардиомиоцитов имеют два типа мест связывания Ca^{2+} : с высоким сродством и с низким сродством к Ca^{2+} [24]. Верапамил специфически угнетает связывание Ca^{2+} с низкоаффинными местами связывания.

ция верапамила, эффективно блокирующая низкоаффинные места связывания Ca^{2+} в изолированных фрагментах сарколеммы кардиомиоцитов, оказалась равной 1,4 мкМ [23]. Следовательно, верапамил и другие Ca^{2+} -антагонисты, по-видимому, в основном снижают Ca^{2+} -связывающую емкость сарколеммы, что значительно уменьшает количество Ca^{2+} , который может проходить через медленные каналы. Ca^{2+} -антагонисты группы А избирательно угнетают связывание Ca^{2+} с мембраной и прохождение ионов Ca^{2+} через мембрану с медленным входящим током. Ca^{2+} -антагонисты группы В действуют менее специфично, так что они также угнетают электрические процессы на мембране, связанные с ионами Mg^{2+} [5].

ЛИНЕЙНАЯ КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ ИНГИБИРОВАНИЕМ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПОСТУПЛЕНИЯ КАЛЬЦИЯ И СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПРИ ДЕЙСТВИИ КАЛЬЦИЕВЫХ АНТАГОНИСТОВ

Для количественного изучения корреляции между изменением входа Ca^{2+} и развиваемой миокардом силы сокращения в нашей лаборатории были проведены эксперименты на изолированных папиллярных мышцах сердца кошки и морской свинки. Система быстрого натриевого тока была заранее блокирована [5, 25]. Например, если трансмембранный потенциал покоя сердечных волокон снизить до -45 мВ, то быстрый натриевый ток инактивируется, а медленные кальциевые каналы продолжают отвечать на электрическую стимуляцию. Наиболее простой метод получения такого критического уровня деполяризации состоит в добавлении KCl (19 мМ) к нормальному раствору Тироде, используемому в экспериментах. Такие предварительно деполяризованные миокардиальные волокна сохраняют способность проводить распространяющиеся потенциалы действия. Но в этих условиях от медленного входящего кальциевого тока зависит не только сократительная активность миокарда, но и развитие потенциала действия. Такие кальциевые потенциалы действия в частично деполяризованных миокардиальных волокнах очень чувствительны к внеклеточной концентрации Ca^{2+} . Поэтому скорость нарастания, амплитуда и длительность кальциевых потенциалов действия быстро уменьшаются в среде с пониженной концентрацией Ca^{2+} . Приведенные на рис. 15.2 результаты такого эксперимента показывают, что электрическая активность вместе с сокращением полностью исчезали через 12 мин после снижения концентрации Ca^{2+} с 2 мМ до 0,4 мМ. Однако кальциевые потенциалы действия и сила сокращения восстанавливались через 6 мин после возвращения в нормальный раствор, содержащий 2 мМ Ca^{2+} .

На рис. 15.3 показано насколько точно Ca^{2+} -антагонисты имитируют эффекты простого удаления Ca^{2+} из среды на таких частично деполяризованных папиллярных мышцах сердца морской

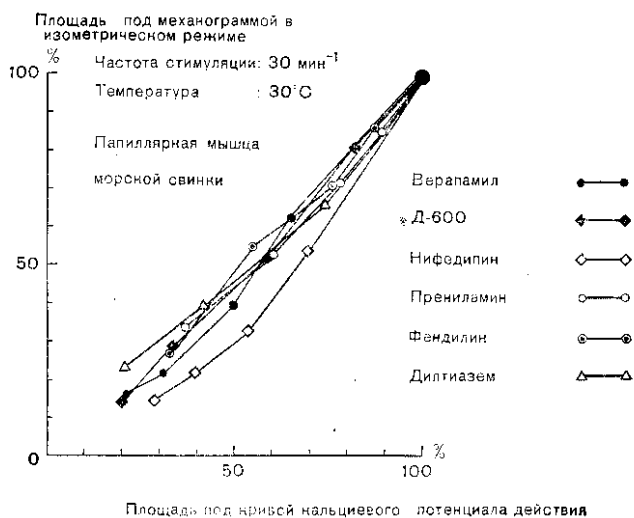


Рис. 15.4. Линейная связь между уменьшением площади под изометрической механограммой и уменьшением площади под кальциевым потенциалом действия, вызванным влиянием различных кальциевых антагонистов. В качестве контроля (100%) были приняты соответствующие величины площадей, полученные в эксперименте на папиллярной мышце сердца морской свинки, частично деполяризованной в результате 30-минутной инкубации в растворе Тироде с высокой концентрацией ионов K^+ (19 мМ) и ионов Ca^{2+} в концентрации (2 мМ). Продолжительность воздействия кальциевых антагонистов составляла 20—40 мин.

свинки. Как можно видеть из этих наложенных друг на друга записей, зарегистрированных с помощью запоминающего осциллографа, изменение активности мышц при действии нифедипина (0,2 мг/л), Д-600 (0,4 мг/л) и верапамила (2 мг/л) при нормальной концентрации Ca^{2+} (2 мМ) точно такое же, как если бы мышцы поместили в раствор с низкой концентрацией Ca^{2+} (см. рис. 15.3). Можно видеть, что во всех случаях развитие ингибирования кальциевого потенциала действия во времени точно совпадает с падением силы сокращения. В конце эксперимента действие Ca^{2+} -антагонистов было нейтрализовано путем повышения концентрации Ca^{2+} до 6 или 8 мМ. И в этом случае восстановление электрической активности мышцы развивалось более или менее параллельно с восстановлением механической активности. На рис. 15.3 представлены результаты аналогичных экспериментов с дилтиаземом, малеатом перхексиллина и фендилином.

Использование частично деполяризованного миокарда желудочков создает уникальные возможности количественного определения корреляции между трансмембранным входом Ca^{2+} , мерой которого могут служить параметры кальциевого потенциала действия, и механическим сокращением. Например, максимальная скорость нарастания ($dV/dt_{\text{макс}}$) кальциевого потенциала действия отражает величину трансмембранного входа Ca^{2+} через мед-

ленные каналы, в то время как длительность кальциевого потенциала действия отражает продолжительность поступления Ca^{2+} . Действительно, сила сокращения изменяется параллельно с этими параметрами кальциевого ответа. В качестве примера на рис. 15.4 представлены графики зависимости площади под кривой изометрической механограммы как наиболее подходящего параметра сократительной активности, от площади под кривой кальциевого потенциала действия. Эти графики ясно демонстрируют строгую линейную связь между электрической и механической активностями, что подтверждает вывод о том, что различные Ca^{2+} -антагонисты, изученные в данной работе, действуют одинаково, т. е. они угнетают силу сокращения в такой же степени, в какой они способны блокировать трансмембранный входящий кальциевый ток, который в данном случае определяет как электрическую, так и механическую активность.

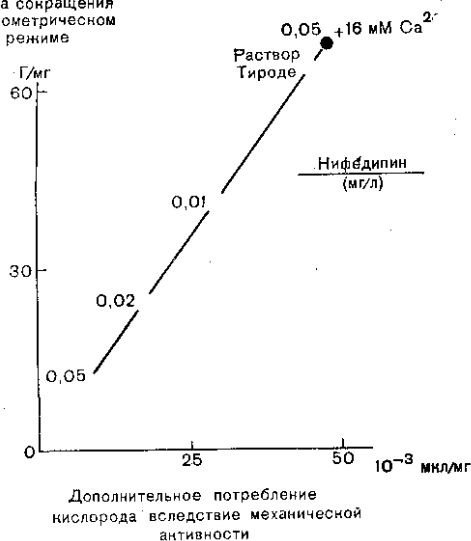
КАРДИОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ КАЛЬЦИЕВЫХ АНТАГОНИСТОВ: СНИЖЕНИЕ ПОТРЕБНОСТИ МИОКАРДА В КИСЛОРОДЕ — ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ НЕЖЕЛАТЕЛЬНЫХ ПОСЛЕДСТВИЙ ПЕРЕГРУЗКИ КАРДИОМИОЦИТОВ ИОНАМИ КАЛЬЦИЯ

Ca^{2+} -антагонисты и β -адренергические соединения противодействуют друг другу почти во всех аспектах своего действия на миокард. β -Адренергические катехоламины увеличивают связывание Ca^{2+} в поверхностном примембранном пуле, трансмембранный вход Ca^{2+} по медленному каналу, расщепление АТФ миофибриллярной АТФазой, силу сокращения и потребности сокращающегося сердца в кислороде, Ca^{2+} -антагонисты, наоборот, уменьшают все эти зависимые от Ca^{2+} параметры. Общеизвестно, что интенсивность окислительного метаболизма в сердце зависит от скорости потребления АТФ. Поэтому Ca^{2+} -антагонисты (подобно простому удалению Ca^{2+} из внеклеточной среды) всегда снижают потребность в кислороде в той же степени, в которой они уменьшают Ca^{2+} -зависимое расщепление АТФ и развитие силы сокращения в изометрических условиях (рис. 15.5). Понятно, что относительно небольшие дозы Ca^{2+} -антагонистов, применяемые при лечении больных, способны вызвать лишь умеренное уменьшение совершаемой сердцем работы и потребности его в кислороде. Тем не менее соответствующие дозы Ca^{2+} -антагонистов можно успешно использовать для лечения больных с гиперкинезией сердца или страдающих ИБС. В данном случае определенное ограничение активности сердца, зависящее от дозы препарата, может быть полезным для восстановления необходимого баланса между поступлением кислорода по коронарным сосудам, сниженным в результате заболевания, и реальными потребностями сердца в кислороде. Поэтому Ca^{2+} -антагонисты благоприятно действуют на больных со стенокардией аналогично

Рис. 15.5. Линейная связь между уменьшением амплитуды в изометрическом режиме

Сила сокращения в изометрическом режиме

и снижением дополнительного потребления кислорода миокардом при механической активности под действием различных концентраций нифедипина (0,01; 0,02; 0,05 мг/л) в растворе Тироде, содержащем 2 мМ Ca^{2+} . Концентрация 0,05 мг/л значительно угнетает силу сокращения и снижает дополнительное потребление кислорода. Этот эффект может быть полностью нейтрализован повышением внеклеточной концентрации Ca^{2+} до 16 мМ в присутствии 0,05 мг/л нифедипина. Эксперимент проводился на папиллярной мышце сердца кролика (сырая масса 0,8 мг). По [55].



β -блокаторам, хотя механизмы их влияния различны: Ca^{2+} -антагонисты ингибируют трансмембранный вход Ca^{2+} , действуя прямо на медленные каналы, а β -блокаторы уменьшают вход Ca^{2+} косвенным образом, нейтрализуя активирующее действие β -адренергических катехоламинов. И в том и в другом случае снижается количество Ca^{2+} , поступающего к сократительной системе, так что в итоге происходит уменьшение расщепления АТФ, расхода энергии на сокращение и потребностей миокарда в кислороде.

Довольно уникальное свойство Ca^{2+} -антагонистов состоит в том, что они обеспечивают прямую защиту сердца от функциональных и структурных повреждений, вызываемых ионами Ca^{2+} . В 1968 г. нам удалось показать, что при избыточном входе свободных ионов Ca^{2+} в миоплазму через сарколеммальную мембрану, когда наблюдается явная недостаточность мощности процессов, связывающих или удаляющих Ca^{2+} из кардиомиоцитов, в них происходят существенные изменения, приводящие в конечном счете к некрозу [5, 12, 13, 26—30]. Наиболее значительным событием в развитии таких повреждений является снижение внутриклеточного содержания макроэргических фосфатов, которое является следствием: 1) чрезмерной активации внутриклеточных АТФаз, активируемых ионами Ca^{2+} ; 2) повреждением митохондрий, вызванным накоплением в них Ca^{2+} и проявляющимся их разбуханием, образованием вакуолей, исчезновением крист, потерей дыхательного контроля и способности фосфорилировать АДФ.

В табл. 15.2 приведены различные патогенетические условия, в которых решающим этиологическим фактором повреждения миокардиальных волокон является перегрузка кардиомиоцитов ионами Ca^{2+} (см. также главу 18). Во всех этих случаях Ca^{2+} -антагонисты были способны полностью сохранить функциональную

Таблица 15.2. Ведущая роль кальциевой перегрузки в развитии некроза миокардиальных клеток

Разрушение миокарда вследствие перегрузки клеток Ca^{2+}	<ol style="list-style-type: none"> 1. Передозировка катехоламинами 2. Передозировка витамина D или дигидроахистерола (АТ 10) 3. Нехватка Mg и K в пище 4. Генетические дефекты (врожденная миокардиопатия сирийского хомячка) 5. Разрушение мембран миокардиальных клеток при аноксии или ишемии 	Защитное действие кальциевых антагонистов на миокард благодаря предотвращению кальциевой перегрузки
--	---	---

При очень тяжелых разрушениях клеточной мембраны с высоким уровнем утечки развивается чрезмерное поступление Ca^{2+} в клетки («кальциевый парадокс», «скиннированные волокна»). В этих случаях Ca^{2+} -антагонисты могут оказаться неэффективными.

и структурную целостность клеток. Ca^{2+} -антагонисты уменьшают распад АТФ и креатинфосфата, ограничивая трансмембранный вход ионов Ca^{2+} в клетки, и, следовательно, предотвращают нежелательное истощение запасов макроэргических фосфатов. В качестве примера на рис. 15.6 и 15.7 показано сильное увеличение поглощения Ca^{2+} и $^{45}Ca^{2+}$ в сердце крысы при подкожном введении кардиотоксичных доз изопроterenола, и сильное угнетение такого поглощения при действии Ca^{2+} -антагонистов. Верапамил и другие Ca^{2+} -антагонисты предотвращают перегрузку кардиомиоцитов ионами Ca^{2+} , уменьшают распад макроэргических фосфатов и препятствуют структурным повреждениям. Лечение хомячков с наследственной кардиомиопатией с постоянным применением Ca^{2+} -антагонистов также позволяет поддерживать их содержание в сердце в нормальном диапазоне, и обеспечивать таким образом полную кардиопротекцию [31]. Следует напомнить, что на результатах этих экспериментов основывалось первое успешное использование верапамила авторами работы [32] для лечения обструктивной гипертрофической кардиомиопатии у человека.

Перегрузка кардиомиоцитов ионами Ca^{2+} также в значительной степени ответственна за повреждение митохондрий в аноксическом или ишемическом миокарде. Поэтому такие Ca^{2+} -антагонисты, как верапамил [33], нифедипин [34] или дилтиазем [35, 36], способны защитить миокардиальные клетки сердца при гипоксии или ишемии от дополнительного повреждения, вызываемого ионами Ca^{2+} , при котором наблюдался бы распад клеточной структуры. Очевидно, что Ca^{2+} -антагонисты продлевают время выживания клеток в зоне ишемии и смягчают вредное влияние аноксии. Поэтому неудивительно, что Ca^{2+} -антагонисты в последнее время стали использоваться в качестве добавок к кардиоплегическим растворам для обеспечения лучшей сохранности миокардиальной ткани и при операциях на сердце [37].

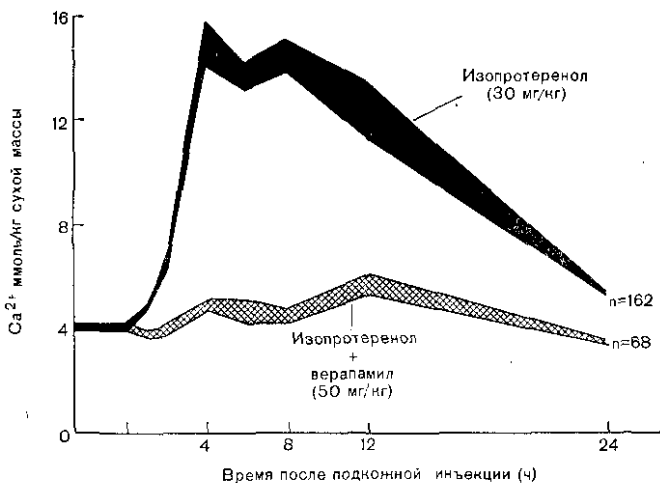


Рис. 15.6. Защитное действие верапамила против перегрузки миокарда правого желудочка крысы ионами Ca^{2+} , вызванной изопротеренолом. Наблюдения проводились в течение 24 ч. Изопротеренон (30 мг/кг) или без него.

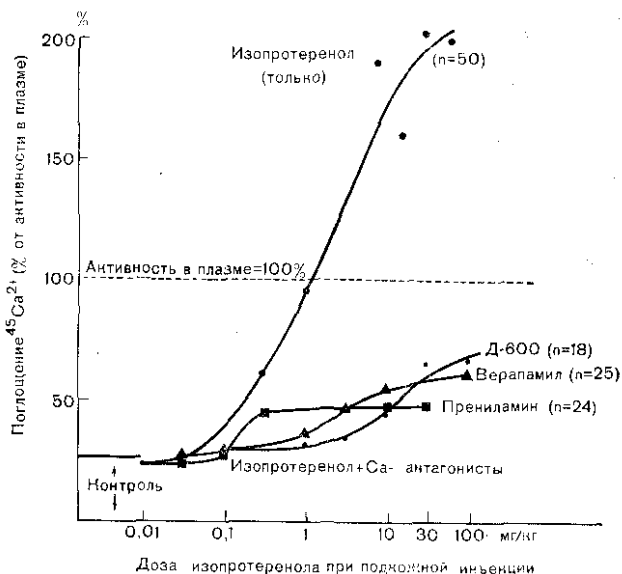


Рис. 15.7. Предотвращение избыточного поглощения меченого Ca^{2+} миокардом правого желудочка крысы, вызванного изопротеренолом, при действии различных кальциевых антагонистов. Кривые доза — эффект для поглощения Ca^{2+} тканью были получены для влияния только изопротеренола, а также комбинации его с Д-600 (10 мг/кг); верапамила (17 мг/кг) или прениламила (250 мг/кг). Все изменения проводили через 6 ч после подкожного введения веществ. По [12].

ПРОТИВОПОЛОЖНОЕ ДЕЙСТВИЕ КАЛЬЦИЕВЫХ АНТАГОНИСТОВ И АКТИВАТОРОВ ЗАВИСИМЫХ ОТ КАЛЬЦИЯ ПРОЦЕССОВ НА НОРМАЛЬНУЮ И ЭКТОПИЧЕСКУЮ ПЕЙСМЕКЕРНУЮ АКТИВНОСТЬ

Ca^{2+} -антагонисты и β -адренергические катехоламины взаимодействуют также друг с другом при влиянии на водителя ритма сердца, что схематически показано на рис. 15.8, и, действительно, не только инициация сокращения, но и основные процессы, обеспечивающие автоматизм в СА- и АВ-узлах, а также проведение по АВ-узлу обусловлены трансмембранным входом ионов Ca^{2+} . Более того, система, обеспечивающая поступление Ca^{2+} через мембранных узловых клеток, очень похожа на механизм «медленных мембранных каналов» обычных миокардиальных волокон. Поэтому, как в узловых клетках, так и в обычных миокардиальных волокнах такие каналы реагируют практически на одни и те же активаторы и ингибиторы входящего кальциевого тока [38—40]. Следовательно, β -агонисты и дибутирил-цАМФ, увеличивая вход Ca^{2+} по медленным каналам, не только вызывают рост силы сокращения, но приводят также к возрастанию частоты сердечного ритма и скорости атриовентрикулярного проведения. И наоборот, боль-

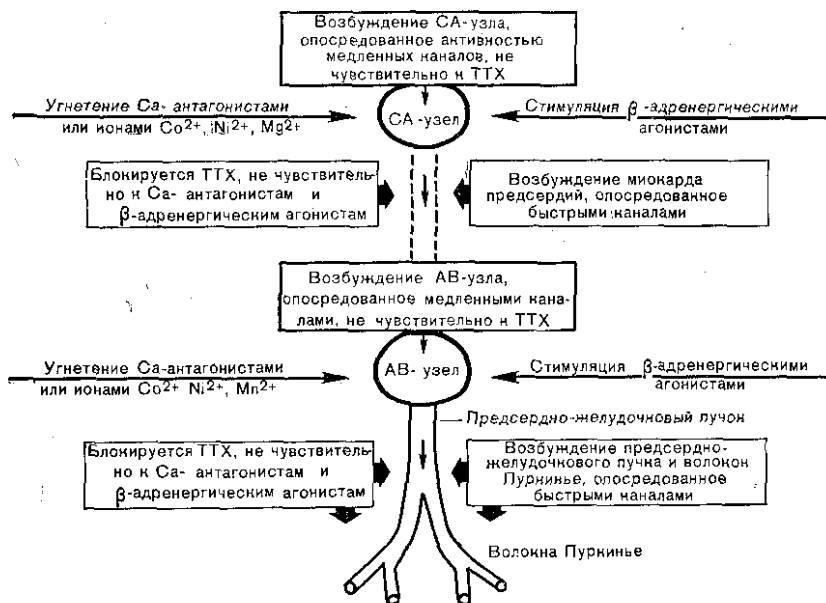


Рис. 15.8. Схема противоположного влияния кальциевых антагонистов и Ca^{2+} -агонистов (β -адренергических агонистов) на автоматизм СА-узла и проведение по АВ-узлу, определяемые работой медленного канала, не чувствительного к ТТХ. Нечувствительность к этим воздействиям скорости проведения по предсердиям, предсердно-желудочковому пучку и волокнам Пуркинье, определяющаяся в нормальных условиях потенциалом действия, чувствительным к ТТХ.

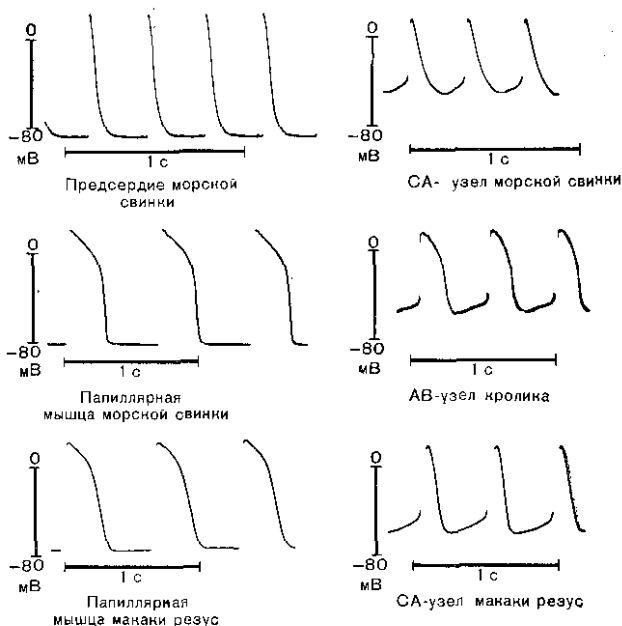


Рис. 15.9. Сравнительная запись трансмембранных потенциалов действия в миокардиальных волокнах, не обладающих автоматией, при электрической стимуляции с потенциалом действия спонтанно возбуждающихся клеток СА- и АВ-узлов. Характерным признаком спонтанно возбуждающихся узловых клеток является медленная диастолическая деполяризация, запускающая распространяющийся потенциал действия в момент достижения потенциалом на мембране некоторого критического уровня (пороговый потенциал). На калибровке по вертикали показан уровень нулевого потенциала и потенциала, составляющего -80 мВ. Калибровка времени равна 1 с на всех регистрациях.

большинство Ca^{2+} -антагонистов одновременно вызывают отрицательное инотропное, отрицательное хронотропное и отрицательное дромотропное действие [41, 42]. Аналогичным образом влияют двухвалентные ионы Co^{2+} , Ni^{2+} и Mn^{2+} , являющиеся Ca^{2+} -антагонистами, которые подавляют как сократительную способность миокарда, так и пейсмекерную активность путем угнетения входа Ca^{2+} по медленным каналам сарколеммы. Те же самые нарушения функций сердца наблюдаются при простом удалении Ca^{2+} из среды. Однако тетродотоксин, который, как известно, блокирует быстрые натриевые каналы, не ингибирует их и не ингибирует автоматическую активность СА- и АВ-узлов или атриовентрикулярное проведение. Следовательно, существуют два противоположных способа генерации потенциала действия в миокардиальной ткани, которые легко различить по их разной чувствительности к лекарствам и по типичной для каждого из них форме потенциала действия (рис. 15.9).

1. Первый тип возбуждения определяется быстрым натрие-

вым током и характерен для миокарда предсердий, предсердно-желудочкового пучка, волокон Пуркинье и миокарда желудочков (максимальная скорость деполяризации или $dV/dt_{\text{макс}}$: 170—400 В/с; скорость проведения: 60—200 см/с). Этот тип возбуждения довольно мало чувствителен к действию Ca^{2+} -антагонистов и активаторов процессов, связанных с ионами Ca^{2+} .

2. Второй тип возбуждения и проведения потенциалов действия основан на медленном кальциевом входящем токе и наблюдается в СА- и АВ-узлах (максимальная скорость деполяризации: 2—7 В/с; скорость проведения: 2—6 см/с). Этот тип возбуждения легко реагирует на действие лекарств, влияющих на кальциевую проводимость мембраны.

Однако если при падении потенциала покоя мембраны возникает эктопический автоматизм в поврежденном миокарде предсердий или желудочков, то ситуация существенно изменяется. В этом случае происходит переход процесса возбуждения от обычного натрийзависимого к зависящему от работы медленных кальциевых каналов, что характерно для частично деполяризованного миокарда. Поэтому Ca^{2+} -антагонисты (относящиеся к антиаритмическим препаратам «четвертого класса», согласно классификации, предложенной в [43]) способны подавить неуправляемую генерацию возбуждения в таком эктопическом фокусе, расположенном в предсердии или желудочке, а также блокировать пути рециркуляции возбуждения, распространяющегося по типу кальциевого потенциала действия, зависящего от работы медленных каналов. На рис. 15.10 схематично показан механизм генерации эктопической активности при низких потенциалах (от —30 до —50 мВ). При таких низких потенциалах покоя спонтанная электрическая активность может быть двух типов: а) в виде местных подпороговых осцилляций мембранного потенциала; б) в виде распространяющихся пейсмекерных потенциалов действия, возникающих в случаях, когда местные осцилляции потенциала достигают порога возбуждения. На этой схеме также указано, что вход ионов Ca^{2+} является основным процессом, ответственным за возникновение спонтанных деполяризаций. Это справедливо как для фазы деполяризации местных осцилляций, так и для фазы нарастания распространяющегося кальциевого потенциала действия. Вторым процессом, развивающимся после поступления в клетки ионов Ca^{2+} , является возникновение задержанного входящего кальевого тока, который возвращает мембранный потенциал к более высокому по абсолютной величине диастолическому потенциалу. Очевидно, что Ca^{2+} -антагонисты, угнетая эти циклы последовательного открывания кальциевых и калиевых каналов, подавляют основной процесс, лежащий в основе эктопического автоматизма, в то время как β -агонисты, стимулируя входящий кальциевый ток, усиливают спонтанную генерацию возбуждений. Нормальные и эктопические пейсмекерные клетки в основном одинаково реагируют на такие воздействия этих веществ. На рис. 15.11 показан пример угнетения нормального автоматизма СА- и АВ-узлов такими Ca^{2+} -антагонистами, как вера

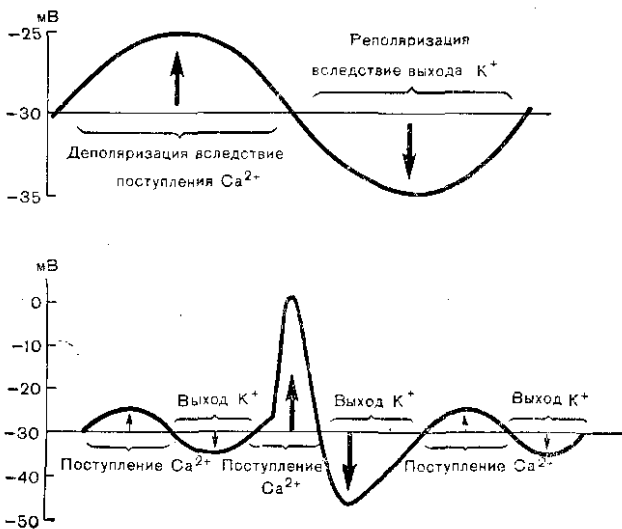


Рис. 15.10. Схема сцепленного Ca^{2+} — K^{+} -обмена, лежащего в основе электрогенеза эктопических подпороговых колебаний потенциала (вверху) и распространяющегося эктопического пейсмекерного потенциала действия (внизу) при низком уровне потенциалов на мембране (выше -50 мВ). В обоих случаях деполаризующий входящий ток переносится ионами Ca^{2+} , проходящими по медленным каналам, в то время как реполаризация является следствием выхода из клетки соответствующего количества ионов K^{+} (I_K), вызывающего возвращение потенциала на мембране к диастолическому уровню. В случае распространяющегося эктопического пейсмекерного потенциала действия поступления ионов Ca^{2+} значительно больше, что, по-видимому, компенсируется снижением мембранного потенциала при реполаризации на некоторое время меньше нормального диастолического уровня.

памил и Д-600. Адреналин же восстанавливает спонтанную генерацию возбуждения в СА- и АВ-узлах и нормальную скорость проведения в АВ-узле, которые угнетены Ca^{2+} -антагонистами. Более того, общеизвестно, что адреналин и другие β -агонисты способствуют также развитию предсердных и желудочковых аритмий эктопической природы.

Одновременно с этими физиологическими и патофизиологическими исследованиями в ряде клинических работ было проведено также изучение эффективности Ca^{2+} -антагонистов для лечения определенных типов аритмий. В 1966 г. было обнаружено, что угнетающее действие верапамила на атриовентрикулярное проведение можно использовать на практике для снижения частоты возбуждений желудочков в случаях фибрилляции и трепетания предсердий [44]. Авторы работ [45, 46—48] предложили эти исследования, продемонстрировав высокую эффективность верапамила при внутривенном введении для прекращения рециркуляторной атриовентрикулярной тахикардии. Более того, оказалось, что такие Ca^{2+} -антагонисты, как верапамил и даже нифедипин,

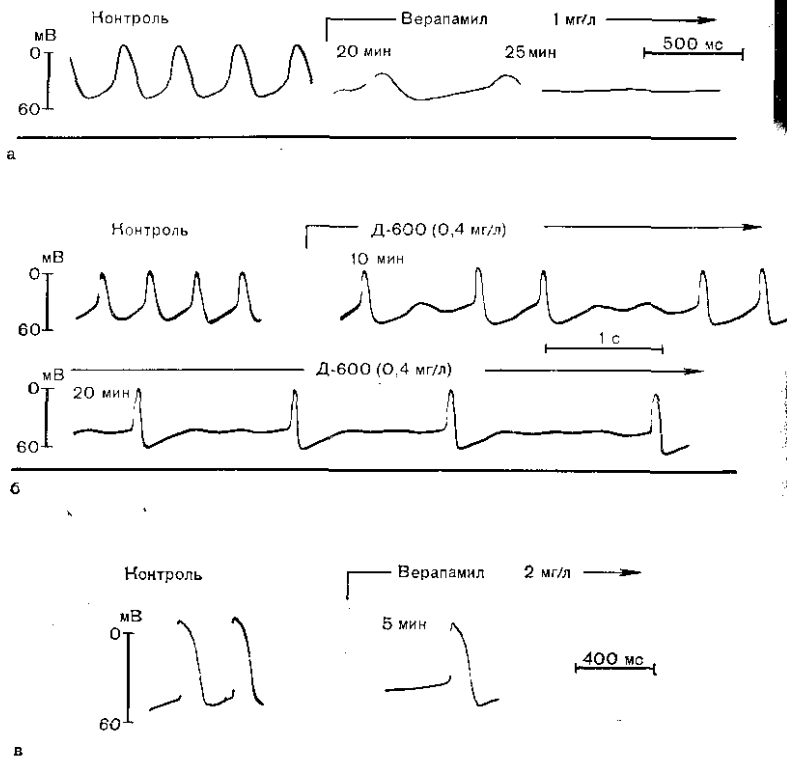


Рис. 15.11. Угнетение пейсмерной активности клеток СА- и АВ-узлов, выделенных из сердца кролика, под действием верапамила и Д-600. Оба вещества уменьшают крутизну медленной диастолической деполяризации, оказывая отрицательное хронотропное действие, а также снижают скорость нарастания фронта потенциала действия в узловых клетках. При продолжительном воздействии уменьшается также овершут и увеличивается гиперполяризация мембраны в фазе диастолы. Как показано на рис. б, под влиянием Д-600 узловые клетки постепенно теряют способность генерировать распространяющиеся потенциалы действия. Это обусловлено снижением амплитуды естественных колебаний диастолического потенциала (а) и повышением порогового потенциала (б). Поэтому все большее число спонтанных локальных деполяризаций оказывается неспособными вызвать распространяющийся ответ в — изолированный АВ-узел. Каждый результат, показанный на рис. а—в, получен при устойчивой регистрации внутриклеточного потенциала в одной клетке в течение всего времени регистрации. (Рис. а — по [41]; рис. б — по Trithart и соавт., неопубликованные данные; рис. в — по [42]).

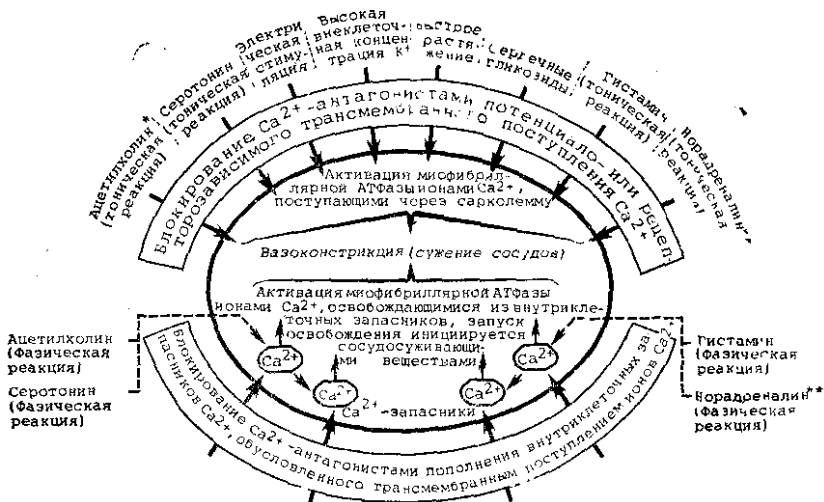
эффективно подавляют желудочковые нарушения ритма, возникающие в ишемизированном миокарде при спазме коронарных сосудов. Такой метод лечения также дает положительные результаты во многих случаях эктопических нарушений ритма желудочков, связанных с нестабильной стенокардией и острым инфарктом миокарда.

ДЕЙСТВИЕ КАЛЬЦИЕВЫХ АНТАГОНИСТОВ НА СОСУДЫ: РАССЛАБЛЕНИЕ ГЛАДКИХ МЫШЦ КОРОНАРНЫХ СОСУДОВ И СНИЖЕНИЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО СОПРОТИВЛЕНИЯ ТОКУ КРОВИ

Хотя данная глава посвящена преимущественно действию Ca^{2+} -антагонистов на сердце, нельзя не отметить высокую эффективность этих соединений в качестве вазодилаторов, что является еще одной важной причиной, способствующей их антиангинальному действию. Как схематически показано на рис. 15.12, оба типа сокращения гладких мышц стенки артерий — и фазическое, и тоническое — зависят от количества свободных ионов Ca^{2+} . Эти ионы поступают либо из внеклеточного пространства через потенциалозависимые или связанные с рецепторами кальциевые каналы, чувствительные к электрическим, механическим или фармакологическим воздействиям, либо освобождаются из внутриклеточных запасников по механизмам, не связанным с электрическим возбуждением. Ca^{2+} -антагонисты наиболее эффективно прямо блокируют потенциалозависимый и определяемый рецепторным влиянием вход Ca^{2+} , и кроме того, уменьшают количество Ca^{2+} , запасенного внутри клетки, угнетая трансмембранное движение Ca^{2+} , причем этот эффект часто развивается с некоторой задержкой. Поэтому действие Ca^{2+} -антагонистов в конце концов приводит в зависимости от дозы препарата к угнетению всех типов сократительной активности гладких мышц [5, 7—10].

Интересно, что сосудорасширяющее действие Ca^{2+} -антагонистов наиболее значительно проявляется в коронарных сосудах и в периферических артериолах большого круга кровообращения. Поэтому при действии Ca^{2+} -антагонистов любое снижение сократительной активности сердца, даже очень небольшое, всегда сопровождается значительным уменьшением тонуса коронарных сосудов с сопутствующим снижением сопротивления току крови в большом круге кровообращения, приводящем к уменьшению постнагрузки сердца. Например, дилатация коронарных сосудов при действии Ca^{2+} -антагонистов обычно происходит уже при дозах, находящихся в пределах $1/3$ — $1/10$, необходимых для развития отрицательного инотропного эффекта in situ.

Основное действие Ca^{2+} -антагонистов на гладкие мышцы стенки сосудов заключается в разобщении электромеханического сопряжения, что легко продемонстрировать in vitro на модели калиевого спазма сосудов. На рис. 15.13 показаны результаты сравнительных исследований [5, 6] действия различных Ca^{2+} -антагонистов на полоски коронарных сосудов свиньи. По ординате отложен процент разобщения электромеханического сопряжения. По абсциссе — молярная концентрация Ca^{2+} -антагонистов в логарифмическом масштабе. Очевидно, что все Ca^{2+} -антагонисты, тестируемые в этих экспериментах, более эффективны, чем папаверин. По сравнению с папаверином нифедипин действует приблизительно в 3000 раз сильнее, за ним следуют Д-600 (гал-



* Гладкая мускулатура стенок системных артерий не активируется ацетилхолином

** Норадреналин вызывает контрактуру стенок поверхностных коронарных артерий только после β-блокаторов

Рис. 15.12. Схема действий двух источников ионов Ca^{2+} для активации тонического и фазического сокращения гладких мышц сосудов. К ним относятся: 1) поступление Ca^{2+} через клеточную мембрану, зависящее от потенциала или рецепторных взаимодействий, которое определяет тонические реакции; 2) освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных запасников, определяющее фазические реакции на сосудосуживающие воздействия. Кальциевые антагонисты непосредственно и наиболее эффективно угнетают трансмембранное поступление Ca^{2+} , т. е. поступление из источника (1). Однако они также влияют и на источник (2), хотя и в меньшей степени, что, по-видимому, связано со снижением пополнения внутриклеточных запасников ионами Ca^{2+} . Точная анатомическая локализация внутриклеточных запасников Ca^{2+} пока не известна (они могут находиться в плазматической мембране, внутренней поверхности плазматической мембраны, в структурах СР).

лопамил), верапамил и дилтиазем. Таким образом, высокоспецифичные Ca^{2+} -антагонисты группы А оказались также наиболее эффективными вазодилататорами коронарных сосудов. Более того, следует отметить, что они оказывают сосудорасширяющее действие в нужных участках коронарного сосудистого ложа, т. е. на крупные поверхностные стволы коронарных артерий (включая коллатерали и анастомозы). Более чем в 95% случаев процесс атеросклеротического стенозирования действительно локализуется именно в этой части коронарного сосудистого ложа. Наиболее ярко выражено улучшение коронарного кровообращения в случаях «варианбельной» стенокардии Принцметала и при других формах коронарораспазмов, которые часто сопутствуют несимметричным атеросклеротическим повреждениям сосудов и могут возникать даже при отсутствии каких-либо признаков структурного стенозирования на ангиограммах.

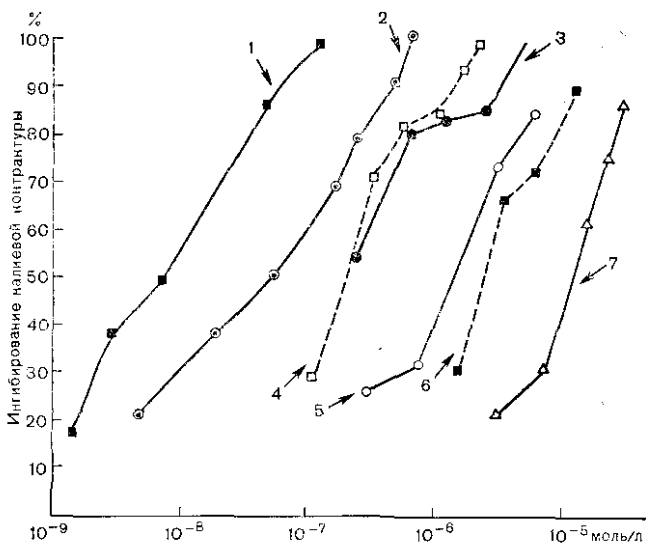


Рис. 15.13. Расслабление полосок коронарных сосудов свиньи, деполяризованных K^+ , при действии различных кальциевых антагонистов. Показана сравнительная способность этих веществ вызывать расслабление полосок коронарных сосудов свиньи, находящихся в состоянии максимальной контрактуры вследствие деполяризации ионами K^+ . Во всех экспериментах препараты выдерживали в растворе Тироде с высоким содержанием K^+ (43 мМ KCl) в течение одного и того же времени (40 мин). Затем в раствор добавляли кальциевый антагонист и измеряли максимальное расслабление, наступающее через 1 ч. По сравнению с расслабляющей способностью папаверина (7) нифедипин (1) действует сильнее приблизительно в 300 раз, галлопамил (2) — в 300 раз, верапамил (4) и дилтиазем (3) — в 50–100 раз. Каждая точка характеризует среднюю величину расслабления, рассчитанную для не менее 15 отдельных экспериментов при каждой концентрации; 5 — преламин; 6 — фендилин; стандартное отклонение не превышало 2%. Содержание Ca^{2+} в растворе Тироде было постоянным (1 мМ); температура $35^{\circ}C$; pH 7,4; оксигенация карбогеном (97% O_2 + 3% CO_2). По [6, 11].

Однако наиболее важная перспектива использования некоторых из Ca^{2+} -антагонистов в терапевтических целях основывается на их вероятной эффективности для профилактики кальциноза стенки артерий. Начиная с 1971 г. этот эффект широко изучался на крысах, которым давали в высоких дозах витамин D или дигидротахистерол, или на животных, у которых после введения аллоксана развился диабет. Интересно, что деструкция медиального слоя артерий вследствие таких экспериментальных процедур напоминает особую форму атеросклероза человека с кальцинацией сосудов, описанную Мёнскеберг, или спонтанный атеросклероз сосудов у пожилых людей. Очевидно, что патогенетический механизм этого явления, однаково неблагоприятного как для кардиомиоцитов, так и для гладкомышечных клеток сосудов, инициируется перегрузкой клеток ионами Ca^{2+} . Однако профилактический прием таких Ca^{2+} -антагонистов, как верапамил или дилтиазем

зем, может способствовать сохранению целостности структуры миокарда и сосудов [5, 49—53]. Настало время в клинических исследованиях выяснить, какое практическое значение имеют эти экспериментальные наблюдения для возможного продолжительного лечения больных с коронарным атеросклерозом с помощью Ca^{2+} -антагонистов.

Заключение

Ca^{2+} -антагонисты влияют на трансмембранный вход Ca^{2+} по медленным каналам в клетки предсердий и желудочков при возбуждении. Это уменьшает Ca^{2+} -зависимое расщепление АТФ, силу сокращения миокарда и потребность сокращающегося сердца в кислороде. Кроме того, что Ca^{2+} -антагонисты снижают расход энергии на сокращение, они также уменьшают входящий кальциевый ток в клетках СА- и АВ-узлов. Это замедляет частоту спонтанных возбуждений нормального водителя ритма сердца, а также скорость атриовентрикулярного проведения. Большинство таких препаратов угнетает эктопический фокусный автоматизм поврежденных миокардиальных волокон. Поэтому Ca^{2+} -антагонисты противодействуют активирующему влиянию β -адренергических катехоламинов на сердце. Более того, Ca^{2+} -антагонисты защищают миокард от вредных последствий перегрузки клеток ионами Ca^{2+} , которую следует рассматривать как основной этиологический фактор некроза миокарда, обусловленного: а) чрезмерной активностью симпатической нервной системы; б) высокими дозами витамина D или дигидротрахистерола; в) дефицитом K^+ и Mg^{2+} в пище или г) генетическими дефектами как в случае врожденной кардиомиопатии сирийского хомячка. Ca^{2+} -антагонисты способны также смягчить или даже устранить последствия гипоксического или ишемического повреждения миокарда, так как в этом случае перегрузка клеток ионами Ca^{2+} на ранней стадии заболевания усугубляет его и приводит к разрушению клеточной структуры.

Ca^{2+} -антагонисты снижают также Ca^{2+} -зависимый тонус гладких мышц стенки сосудов и устраняют их спастическое сокращение. У страдающих ИБС они расслабляют гладкие мышцы стенок крупных поверхностных магистральных сосудов. Кроме того, они также снижают сопротивление в большом круге кровообращения благодаря дилатации артериол, облегчая, таким образом, работу сердца. Более того, имеются экспериментальные данные, указывающие, что некоторые Ca^{2+} -антагонисты способны защитить стенки артерий от перегрузки ионами Ca^{2+} , устраняя, таким образом, один из наиболее важных факторов атеросклеротического разрушения стенок сосудов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fleckenstein A. Die Bedeutung der energiereichen Phosphate für Kontraktilität und Tonus des Myokards. Verh. dtsh. Ges. inn. Med., 1964, vol. 70, p. 81—99.

2. *Fleckenstein A., Doring H. J., Kammermayer H.* Experimental heart failure due to inhibition of utilisation of highenergy phosphates. — In: Proceedings of and International Symposium on the Coronary Circulation and Energetics of the Myocardium, Milan, 1966. Basle: Karger, 1967, p. 220—236.
3. *Fleckenstein A., Kammermeier H., Doring H. J., Freund H. J.* Zum Wirkungsmechanismus neuartiger Koronardilatoren mit gleichzeitig Sauerstoff-einsparenden Myokard-Effecten, Prenylamin und Iproveratril. — *Z. Kreisf.-Forsch.*, 1967, vol. 56, p. 716—744, p. 839—853.
4. *Fleckenstein A., Tritthart H., Fleckenstein B.* et al. A new group of competitive Ca-antagonists (Iproveratril, D 600, Prenylamine) with highly potent inhibitory effects on excitation-contraction coupling in mammalian myocardium. — *Pflügers. Arch.*, 1969, vol. 307, p. R25.
5. *Fleckenstein A.* Calcium antagonism in heart and smooth muscle: experimental facts and therapeutic prospects. Monograph edited by John Wiley. New York: John Wiley, 1983.
6. *Fleckenstein A.* Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers, and vascular smooth muscle. — *Ann. Rev. Pharmacol., Toxicol.*, 1977, vol. 17, p. 149—166.
7. *Fleckenstein-Grun G.* Control of coronary spasms by calcium antagonists. — In: Calcium modulators/Ed. T. Godfraind, A. Albertini, R. Paoletti. Amsterdam: Elsevier Biomedical, 1982, p. 141—154.
8. *Fleckenstein-Grun G., Fleckenstein A.* Ca-dependent changes in coronary smooth muscle tone and the action of Ca-antagonistic compounds with special reference to Adalat. — In: New therapy of ischemic heart disease/Ed. W. Lochner, W. Braasch, G. Kroneberg. 2nd International Adalat Symposium, Amsterdam, 1974, Berlin: Springer-Verlag, 1975, p. 66—75.
9. *Fleckenstein-Grun G., Fleckenstein A.* Calcium-Antagonismus, ein Grundprinzip der Vasodilatation. — In: Calcium-Antagonismus/Ed. A. Fleckenstein, H. Roskamm. Proceedings of an international symposium on calcium antagonism, Frankfurt, December 1978. Berlin: Springer-Verlag, 1980, p. 191—207.
10. *Fleckenstein-Grun G., Fleckenstein A.* Calcium antagonism, a basic principle in vasodilatation. — In: Calcium antagonism in cardiovascular therapy: experience with verapamil/Ed. A. Zanchetti, D. M. Kirkler. Proceedings of an international symposium, Florence, 2—4 October 1980, Amsterdam: Excerpta Medica, 1981, p. 30—48.
11. *Grun G., Fleckenstein A.* Die elektromechanische Entkoppelung der glatten Gefassmuskulatur als Grundprinzip der Coronardilatation durch 4-(2'-Nitrophenyl)-2,6-dimethyl-1,4, dihydropyridin-3,5-dicarbonsaure-dimethylester (Bay a 1040, Nifedipin). — *Arzneimittel-Forsch.*, 1972, vol. 22, p. 334—344.
12. *Fleckenstein A.* Specific inhibitors and promoters of calcium action in the excitation-contraction coupling of heart muscle and their role in the production or prevention of myocardial lesions. — In: Calcium and the heart. Proceedings of the meeting of the european section of the international study group for research in cardiac metabolism/Ed. P. Harris, L. Opie. London, 6 September 1970, London: Academic, 1971, p. 135—188.
13. *Fleckenstein A., Doring H. J., Janke J., Byon Y. K.* Basic action of ions and drugs on myocardial highenergy phosphate metabolism and contractility. — In: Handbook of experimental pharmacology/Ed. J. Schmier, O. Eichler. New series, vol. 16/3. Berlin: Springer-Verlag, 1975, p. 345—405.
14. *Kohlhardt M., Bauer B., Krause H., Fleckenstein A.* Differentiation of the transmembrane Na and Ca channel in mammalian cardiac fibres by the use of specific inhibition. — *Pflügers. Arch.*, 1972, vol. 335, p. 309—322.
15. *Kohlhardt M., Fleckenstein A.* Inhibition of the slow inward current by nifedipine in mammalian ventricular myocardium. — *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak.*, 1977, vol. 298, p. 267—272.
16. *Winegrad S.* Studies of cardiac muscle with a high permeability to calcium produced by treatment with ethylenediamine-tetracetic acid. — *J. gen. Physiol.*, 1971, vol. 58, p. 71—93.
17. *Entmann M. L., Allen J. C., Bornet E. P.* et al. Mechanisms of calcium ac-

51. *Fleckenstein A., Witzleben H., Frey M., Milner T. G.* Prevention of cataracts of alloxan-diabetic rats by longterm treatment with verapamil. — *Pflügers, Arch. (Suppl.)*, vol. 391, p. R12.
52. *Frey M., Keidel J., Fleckenstein A.* Verhütung experimenteller Gefass-Verkalkungen (Monckerberg's Typ der Arteriosklerose) durch Calcium-Antagonisten. — In: *Calcium-Antagonismus/Ed. A. Fleckenstein, H. Roskamm. Proceedings of an international symposium on calcium antagonism, Frankfurt, December, 1978. Berlin: Springer-Verlag, 1980. p. 258—264.*
53. *Janke J., Hein B., Pachinger O. et al.* Hemmung arteriosklerotischer Gefassprozesse durch prophylaktische Behandlung mit $MgCl_2$, KCl und organischen Ca^{++} -Antagonisten (quantitative Studien mit Ca^{45} bei Ratten). — In: *Vascular smooth muscle. Proceedings of a satellite symposium 25 th Congress International Union Physiological Sciences Tubingen 20—24 July 1971/Ed. E. Betz. Berlin: Springer-Verlag, 1972, p. 71—72.*
54. *Fleckenstein A., Grun G., Byon Y. K. et al.* The basic Ca antagonistic actions of nifedipine on cardiac energy metabolism and vascular smooth muscle tone. — In: *New therapy of ischemic heart disease. First International Nifedipine (Adalat) Symposium/Ed. K. Hashimoto, E. Kimura, T. Kobayashi, Tokyo, 1973. Tokyo: University of Tokyo, 1975, p. 31—44.*
55. *Fleckenstein A., Tritthart H., Doring H. J., Byon Y. K.* Bay a 1040, ein hockaktiver Ca^{++} -antagonistischer Inhibitor der electro-mechanischen Kopplungsprozesse im Warm blutter-Myokard. — *Arzneimittel-Forsch.*, 1972, Bd 22, S. 22—33.
56. *Fleckenstein A., Fleckenstein-Grun G., Byon Y. K. et al.* Vergleichende Untersuchungen uber die Ca-antagonistischen Grundwirkungen von Niludipin (Bay a 7168) und Nifedipin (Bay a 1040) auf Myokard, Myometrium und glatte Gefassmuskulatur. — *Arzneimittel-Forsch.*, 1979, Bd 29, S. 230—246.
57. *Nakajima H., Hoshiyama M., Yamashita K., Kiyomoto A.* Effect of diltiazem on electrical and mechanical activity of isolated cardiac ventricular muscle of guinea pig. — *Jap. J. Pharmacol.*, 1975, vol. 25, p. 383—392.
58. *Fleckenstein A., Fleckenstein-Grun G., Byon Y. K.* Fundamentale Herz- und Gefasswirkungen des Ca^{++} -antagonistischen Koronartherapeutikums Fendilin (Sensit^R). — *Arzneimittel-Forsch.*, 1977, Bd 27, S. 562—571.
59. *Fleckenstein-Grun G., Fleckenstein A., Byon Y. K., Kim K. W.* Mechanism of action of Ca^{2+} -antagonists in the treatment of coronary disease with special reference to perhexiline maleate. — In: *Proceedings of the symposium on perhexiline maleate, Strasbourg, 18 September 1976. Amsterdam: Excerpta Medica, 1978, p. 1—22.*
60. *Fleckenstein A.* Experimentelle Pathologie der akuten und chronischen Herzinsuffizienz. — *Verh. dtsh. Ges. Kreisl.-Forsch.* 1968, Bd 34, S. 15—34.
61. *Fleckenstein A.* Fundamental actions of calcium antagonists on myocardial and cardial pacemaker cell membranes. — In: *New Perspectives on Calcium Antagonists, GB Weiss ed., p. 59—81, Am. Physiol. Society, Clinical Physiological Series, 1981.*
62. *Fleckenstein A.* Pharmacology and electrophysiology of calcium antagonists. — In: *Calcium Antagonism in Cardiovascular Therapy: Experience with Verapamil; Proceed. of an Internat. Symp. on Calcium Antagonism in Cardiovascular Therapy, Florence, October 1980/Ed. A. Zanchetti, D. M. Krikler, p. 10—29, Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton, 1981.*

Глава 16

КЛЕТочНАЯ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЯ И ИШЕМИЯ

Р. ЛАЗЗАРА, В. Дж. ШЕРЛАГ (R. LAZZARA, V. J. SCHERLAG)

ВВЕДЕНИЕ

Вызванные ишемией значительные изменения на ЭКГ сразу привлекли внимание практических врачей, начавших использовать их в диагностических целях. Необходимо было объяснить электрофизиологические изменения в клетках при ишемии, которые обуславливают аномалии, наблюдаемые на ЭКГ. Несмотря на множество предложенных механизмов и схем, не удалось получить достаточного количества убедительных данных, позволяющих решить эту проблему. В учебниках по электрокардиографии демонстрировались потенциалы действия и приводились потенциалы покоя клеток, полученных из зоны ишемии еще до широкой разработки техники внутриклеточных регистраций. Эти представления были основаны на хорошо известном эффекте повреждения возбудимых клеток, выражающемся в их деполяризации, а также на том, что длительность потенциала действия в ишемизированных клетках уменьшена. Цепь объяснений строилась на представлении о том, что основные изменения в клетках, вызываемые ишемией, просты и немногочисленны: частичная деполяризация, укорочение потенциала действия или полное прекращение электрической активности вследствие гибели клеток. Даже после разработки техники внутриклеточных регистраций прямые электрофизиологические изменения в клетках при ишемии было довольно трудно зафиксировать, и их было немного. Истинные условия ишемии могут быть получены только на сокращающемся сердце под нагрузкой, кровь к которому поступает по коронарным сосудам. В таких условиях регистрация внутриклеточной активности требует слишком многих усилий, является неточной и ограничена поверхностью эпикарда. Тем не менее самые первые регистрации, полученные во время острой ишемии, подтвердили представление о том, что она вызывает уменьшение абсолютной величины потенциала покоя и укорочение потенциала действия [1, 2].

В последнее время активность в изучении клеточных электрофизиологических эффектов ишемии усилилась в результате возрастающего интереса к природе аритмий, возникающих при ишемии. Такой интерес обуславливается катастрофическим числом случаев внезапной смерти от аритмий в развитых капиталистических странах в последнее десятилетие. Трудности регистра-

ции внутриклеточных потенциалов на сокращающемся сердце поставили перед исследователями задачу найти другой подход для решения этой проблемы. Наиболее распространенным последние годы было выделение ткани для исследования *in vitro* из участков миокарда, ишемизированных *in vivo*. Но во время исследований *in vitro* ткань уже не находится в условиях ишемии, что является очевидным недостатком такого подхода. Выводы, основывающиеся на наблюдениях, осуществленных в таких условиях, требуют допущения, что изменения клеток, вызванные ишемией *in vivo*, сохраняются в течение некоторого времени перфузии ткани *in vitro*, даже если перфузат содержит достаточное количество кислорода и субстратов.

Другим многообещающим подходом является моделирование ишемии *in vitro* путем удаления из перфузата кислорода и (или) добавления метаболитов или изменения их концентрации, или ионов для имитации изменений, которые предположительно происходят в зонах ишемии *in vivo*. Такой подход, однако, страдает от недостаточности информации относительно всех существенных изменений, происходящих в зонах ишемии на различных ее стадиях и при различной глубине, а также от трудностей, возникающих при попытках воспроизвести нарушения, происходящие при ишемии, с помощью воздействий на внутриклеточную среду. Нет смысла упорно утверждать, что ни гипоксия, ни ингибирование метаболизма не моделируют условий ишемии. Все большее внимание привлекают проявления, вызываемые побочными продуктами застоя тканевого обмена. Обсуждение этого вопроса будет сосредоточено в основном на исследованиях, проведенных на ишемической ткани *in vivo* и *in vitro*, и лишь немного внимания будет уделено отдельным работам по изучению нормальных тканей, перфузируемых раствором, моделирующим условия ишемии, наиболее обычным из которых является гипоксия.

ПОТЕНЦИАЛ ПОКОЯ

Самые первые регистрации внутриклеточного потенциала в ишемизированных клетках показали, что частичная деполяризация миокардиальных клеток субэпикарда развивается через несколько минут после окклюзии коронарных артерий [1, 2]. После проведения этих измерений определялся кровоток в субэпикардиальном слое, и оказалось, что сразу после окклюзии в центре зоны ишемии он составляет 25% от нормы [3]. Выявление частичной деполяризации миокардиальных клеток при ишемии не вызвало удивления, так как уже давно было известно, что гипоксия [4, 5] и ингибирование метаболизма [6] вызывают потерю потенциала покоя. Многочисленные исследования показали также, что в зоне ишемии быстро повышается внеклеточная концентрация калия вследствие утечки ионов калия из внутриклеточной жидкости [7—10]. В проведенных недавно исследованиях с помощью калий-селективных электродов была сделана количест-

венная оценка изменений внеклеточной концентрации калия в миокарде *in vivo* после окклюзии коронарной артерии [11]. Повышение внеклеточной концентрации калия имеет большую величину и происходит наиболее быстро в субэпикардиальных слоях, и менее выражено в субэпикарде, но и в субэпикардиальных слоях концентрация калия за несколько минут достигает около 8 мМ. Такие изменения способны в значительной степени, но не исчерпывающе объяснить изменение потенциала покоя. Механизм, приводящий к потере клетками ионов K^+ , точно не установлен. Исследования, проведенные *in vitro* на миокардиальных клетках в условиях гипоксии, показали, что при этом происходит увеличение выходящего, не зависящего от времени (фонового) калиевого тока [12]. Было выдвинуто предположение, что фактором, вызывающим увеличение калиевого тока, является повышение концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле [13]. Кроме того, повышение внеклеточной концентрации K^+ способно самостоятельно вызывать дальнейшее увеличение проницаемости мембраны для ионов K^+ [14]. Не ясно еще, как во времени развивается угнетение работы натрий-калиевого насоса [15]. При работе этого насоса, если он является электрогенным *in vivo*, генерируется выходящий ток, вносящий определенный вклад в увеличение абсолютной величины потенциала покоя. Однако получены данные, что утечка калия происходит раньше угнетения работы натрий-калиевого насоса при гипоксии [16]. Эти данные позволяют предположить, что угнетение работы насоса не является основным фактором, определяющим развитие деполяризации, начинающейся на очень ранней стадии ишемии.

Когда ишемия продолжается несколько часов и более, выжившие клетки в ее зоне ишемии оказываются деполяризованными в разной степени. Маловероятно, что в такой поздней стадии ишемии основным фактором, определяющим величину деполяризации, является внеклеточная концентрация K^+ . Многочисленные исследования продемонстрировали, что такая деполяризация сохраняется даже в условиях перфузии ткани раствором с нормальной внеклеточной концентрацией K^+ [17—29]. Возможно, что при длительной ишемии происходит снижение внутриклеточной концентрации (и активности) K^+ и уменьшение отношения его внутри- и внеклеточных концентраций, сопровождающееся падением калиевого равновесного потенциала. Кроме того, в поздней стадии ишемии может быть уменьшен вклад электрогенного натрий-калиевого насоса в потенциал покоя вследствие угнетения его активности [15]. Недавно было выдвинуто предположение, что электрогенный насос вносит свой вклад в потенциал покоя не только прямо за счет генерации выходящего гиперполяризующего тока, но и косвенно, так как наличие такого тока необходимо для поддержания «нормальной» вольтамперной зависимости в противоположность другой возможной зависимости, сдвинутой вниз (в направлении входящего тока) и дающей устойчивый потенциал покоя с более положительным значением [24]. Подразумевается, что обе зависимости могут наблюдаться в ре-

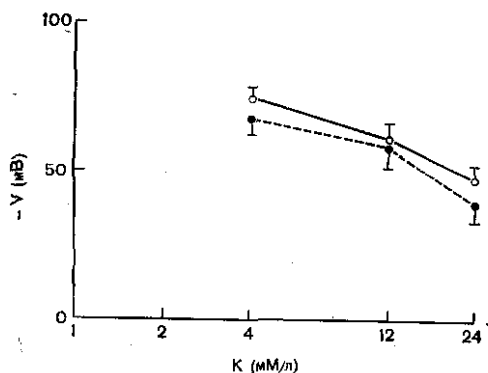


Рис. 16.1. Зависимость потенциала покоя мембраны (V_m) от внеклеточной концентрации K^+ (K) для клеток ткани, выделенной из ишемической зоны (темные кружки) и для клеток нормальной ткани, выделенной на границе зоны ишемии (светлые кружки). Препараты эпикарда, изолированные из сердца собаки через 1—7 дней после окклюзии коронарной артерии. Средние величины и стандартные отклонения рассчитаны по результатам 10 независимых экспериментов (как для клеток ишемической зоны, так и для клеток нормальной ткани).

альной мембране, но под действием гиперполяризующего тока, генерируемого при работе натрий-калиевого насоса, доминирующей является «нормальная» зависимость, приводящая к появлению нормального потенциала покоя.

Было показано, что потенциал покоя клеток желудочка сердца человека, страдающего хроническим заболеванием сердца, понижен (приблизительно до -50 мВ), и его величина не изменяется в зависимости от внеклеточной концентрации K^+ в пределах 2—10 мМ [24]. Эти данные позволили исследователям предположить возможное понижение калиевой проводимости в этих клетках, т. е., что мембрана не является в этом случае чисто калиевым электродом. Субэпикардиальные клетки, выделенные из тканей ишемической зоны сердца собаки через несколько дней после окклюзии коронарной артерии, отличаются от таковых, выделенных из нормальных участков тех же тканей, по соотношению между внеклеточной концентрацией K^+ и мембранным потенциалом, но эти отличия невелики (рис. 16.1). Смещение кривой для ишемизированных клеток вниз может быть объяснено снижением внутриклеточной концентрации K^+ .

Возможный вклад других видов ионной проводимости в потенциал покоя деполяризованных клеток миокарда человека был исследован путем изучения действия тетродотоксина — блокатора быстрых натриевых каналов, и метоксиверапамила — блокатора медленных кальциевых каналов [24]. Эти вещества не влияли на потенциал покоя, поэтому можно сделать вывод, что фоновые входящие натриевый или кальциевый токи не вносят никакого существенного вклада в деполяризацию. Однако таких наблюдений получено пока немного. Необходимо получить больше данных о внутриклеточных концентрациях и относительных проницаемостях основных ионов при длительной ишемии, а также о влиянии ишемии на вольтамперные зависимости в мембране в установившихся условиях.

Влияние ишемии на клетки специализированной проводящей системы отличается от ее влияния на окружающие клетки рабо-

чего миокарда. Проводящие сердечные миоциты в участке миокарда, снабжавшемся кровью через окклюзированную артерию, остаются частично деполяризованными в течение нескольких дней после окклюзии, и такие миоциты в субэндокарде выживают и полностью восстанавливают свою активность в отличие от окружающих их субэндокардиальных клеток рабочего миокарда, погибающих в течение первого дня после окклюзии коронарной артерии сердца собаки [17—21]. В условиях *in vitro* проводящие сердечные миоциты также оказались более устойчивыми к отсутствию кислорода, чем таковые в рабочем миокарде [5].

Не исключена возможность, что более низкие потребности проводящих сердечных миоцитов в кислороде могут частично удовлетворяться вследствие диффузии кислорода из крови, находящейся в полости левого желудочка. Однако некоторые исследователи наблюдали частичную деполяризацию проводящих сердечных миоцитов в ткани, выделенной из сердца через 20 мин после окклюзии коронарной артерии [29], что в свете относительной устойчивости таких миоцитов к гипоксии *in vitro* является удивительной находкой. Пока не ясна достоверность таких наблюдений для ткани, выделенной из участков миокарда в ранней стадии острой ишемии. Предполагается, что одним из основных факторов, вызывающих такую деполяризацию проводящих сердечных миоцитов, является повышение внеклеточной концентрации ионов K^{2+} за счет массивного выхода K^+ из клеток рабочего миокарда.

Причины деполяризации проводящих сердечных миоцитов, как и клеток рабочего миокарда, в поздней стадии ишемии (один день и более) неясны. Потенциал покоя поврежденных проводящих сердечных миоцитов имеет тенденцию к восстановлению нормальной величины при многочасовой перфузии раствором, даже лишенным кислорода и субстратов, что позволяет предположить связь деполяризации с действием какого-то вещества (или веществ), которое медленно (в течение часов) выводится из ткани при перфузии [19]. Восстановление электрической активности проводящих сердечных миоцитов в процессе перфузии *in vitro* показано на рис. 16.2. Из различных веществ, внутриклеточная или внеклеточная концентрация которых повышается при ишемии, особое внимание в последнее время привлекли некоторые продукты распада липидов, так называемые лизофосфолипиды [30—32]. Если нормальные клетки в условиях *in vitro* подвергнуть воздействию этих веществ в концентрациях, соответствующих наблюдаемым в ишемических участках, то в них возникают электрофизиологические аномалии, напоминающие электрическую активность ишемизированных клеток. Очень интересна гипотеза о возможности продуктов распада липидов встраиваться в сарколемму и изменять ее свойства [33]. Она уже получила некоторое экспериментальное подтверждение, однако роль этого явления в развитии электрофизиологических аномалий *in vivo* еще предстоит выяснить.

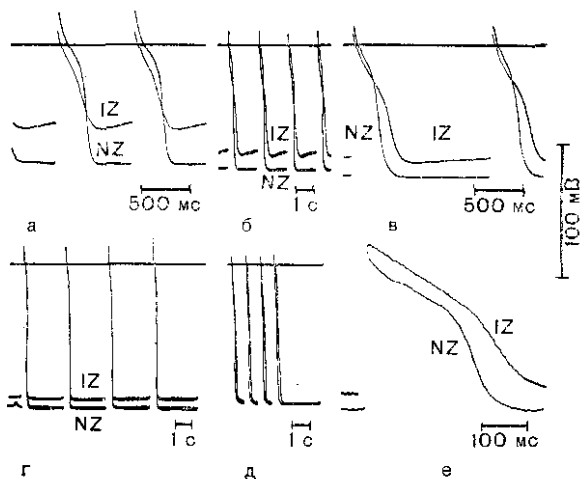


Рис. 16.2. Восстановление нормального потенциала действия при перфузии частично деполяризованного волокна Пуркинье (IZ), выделенного из сердца собаки через 24 ч после окклюзии коронарной артерии. Потенциал действия в волокне Пуркинье из ишемической зоны был зарегистрирован через 10 мин после выделения (а); одновременно регистрировали потенциал действия в нормальной ткани (NZ). Ишемическая клетка была частично деполяризована, и в ней наблюдалось ускорение диастолической деполяризации, а также удлинение потенциала действия. Через 1½ ч перфузии (б) существенно повысилась абсолютная величина потенциала покоя. При непрерывной перфузии в течение 12 ч (в—д) потенциал покоя и скорость диастолической деполяризации нормализовались. Однако длительность потенциала действия продолжала оставаться увеличенной (д). Запись потенциала действия клетки из зоны ишемии на рис. д сдвинута вверх, поэтому разница потенциалов покоя на рис. е получена искусственно. По [19].

В связи с тем, что миокардиальные клетки и проводящие сердечные миоциты, характеризующиеся целым спектром аномальных свойств, продолжают функционировать в ишемическом миокарде, возникла дискуссия относительно размера, формы и положения «границной зоны», окружающей зону инфаркта миокарда [34]. Было предположено, что при ишемии клетки либо нормально снабжаются кислородом, либо погибают вследствие гипоксии, а промежуточных состояний, образующих заметную пограничную зону, не существует [35]. Такая простая формулировка этой гипотезы не объясняет выживание клеток с аномальной активностью в течение длительного времени, хотя это явление несомненно можно обнаружить в миокарде после ишемического повреждения. Например, после окклюзии коронарной артерии сердца собаки тонкий слой миокардиальных клеток, лежащих непосредственно под эпикардом, в течение некоторого времени сохраняет свою активность и образует пограничную зону с клетками, расположенными над зоной инфаркта, проявляющими аномальные электрофизиологические признаки. Так как использо-

вание метода регистрации внутриклеточных потенциалов позволяет полностью исключить все артефакты, возникающие вследствие неоднородности ишемического участка миокарда, содержащего как нормальные, так и погибшие клетки, то гипотезу несоблюдения модифицировать, чтобы в ней учитывались следующие явления: 1) возможное существование промежуточных уровней снабжения клеток кислородом в течение длительного времени, или 2) что длительное воздействие продуктов распада ткани из зоны некроза на клетки, получающие нормальное количество кислорода, или 3) способность клеток длительное время выживать в условиях сильной гипоксии. Кроме того, если создать однородные гипоксические условия *in vitro*, то и в этом случае наблюдаются гетерогенные реакции, так что гетерогенность *in vivo* может частично не зависеть от гетерогенности нарушений кровотока [36].

ФАЗА НАРАСТАНИЯ ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ: ТОК, ОТВЕТСТВЕННЫЙ ЗА ВОЗБУЖДЕНИЯ

На ранней стадии ишемии наблюдается сильное угнетение переднего фронта потенциала действия [2, 37—40], что неизменно характерно для поврежденных клеток на поздних стадиях [17, 28]. Угнетение скорости нарастания фронта потенциала действия и уменьшение его амплитуды является следствием деполяризации клеток, вызывающей инактивацию быстрых натриевых каналов, однако несомненно, что угнетение более выражено, чем можно было бы объяснить только этой причиной. В ишемических клетках кривая зависимости $\dot{V}_{\text{макс}}$ от мембранного потенциала сдвинута вниз по сравнению с таковой для нормальных клеток, как показано на рис. 16.3. Сдвиг этой кривой вниз означает прямое подавление входящего тока, ответственного за возбуждение. Положение аномальной кривой по отношению к нормальной может сильно варьировать. Часто кривая сильно сдвинута вниз и влево, отражая не только существенное подавление входящего тока, но и возникновение его при таких уровнях мембранного потенциала, при которых нормальные быстрые каналы полностью инактивированы. Выявление зависимостей такого типа (рис. 16.4) позволило предположить возможное участие медленных каналов в генерации возбуждения ишемических клеток. Однако эксперименты с использованием блокаторов быстрого тока (тетродотоксина) и медленного тока (метоксиверапамила) показали, что при ишемии вероятнее происходит изменение характеристик быстрых каналов, обуславливающих развитие более медленно нарастающего потенциала действия при низком уровне потенциала покоя [27]. По-видимому, ишемия влияет на зависимость «воротного механизма» от потенциала. Действие тетродотоксина на потенциал действия с угнетенным фронтом, регистрируемый в эпикардальных клетках зоны ишемии, показано на рис. 16.5. При острой ишемии миокарда сердца свиньи, когда развивается замедление проведения и в ишемизированных субэпикардальных слоях наблю-

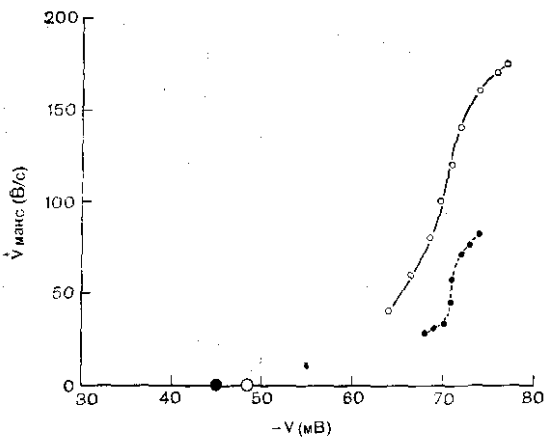


Рис. 16.3. Зависимость между максимальной скоростью нарастания потенциала действия ($\dot{V}_{\text{макс}}$) от мембранного потенциала в момент возбуждения (V_m) для клетки нормальной ткани (светлые кружки) и клетки ткани из ишемической зоны. Препарат эпикарда, выделенный из сердца собаки через 2 дня после окклюзии коронарной артерии. Мембранный потенциал изменяли, используя различную концентрацию K^+ в перфузате. Кружками на абсциссе показаны потенциалы покоя в этих клетках при концентрации K^+ , составляющей 24 мМ.

заны потенциалы покоя в этих клетках при концентрации K^+ , составляющей 24 мМ.

дается рециркуляция возбуждения, ток, ответственный за возбуждение, по-видимому, генерируется частично подавленными быстрыми каналами, так как лидокаин вызывает дальнейшее угнетение электрической активности [41]. Лидокаин также сильно влияет на чувствительные к тетродотоксину угнетенные потенциалы действия в ишемическом миокарде собаки [42]. Однако в препаратах эндокарда человека, полученных во время операций у больных с аневризмой желудочка сердца, наряду с чувствительными к тетродотоксину угнетенными потенциалами действия наблюдаются и чувствительные к блокаторам медленных каналов потенциалы [24, 26]. Неэффективность блокаторов медленных каналов при желудочковых тахикардиях, развивающихся при ИБС, и эффективность веществ, блокирующих быстрые каналы, таких как лидокаин и прокаинамид, позволяют предположить, что раз-

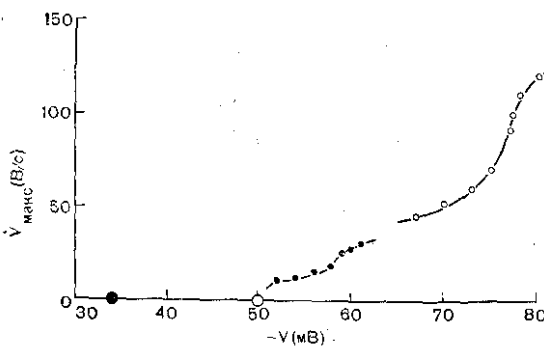


Рис. 16.4. Связь между максимальной скоростью нарастания потенциала действия ($\dot{V}_{\text{макс}}$) и трансмембранным потенциалом (V_R) в момент возбуждения клетки нормальной ткани (светлые кружки) и клетки ткани ишемической зоны (темные кружки) препарата эпикарда, выделенного из сердца собаки через 24 ч после окклюзии коронарной артерии. Различные величины транс-

мембранного потенциала получали, изменяя концентрацию K^+ в перфузате. Символы на абсциссе отмечают потенциал покоя при концентрации K^+ , составляющей 24 мМ.

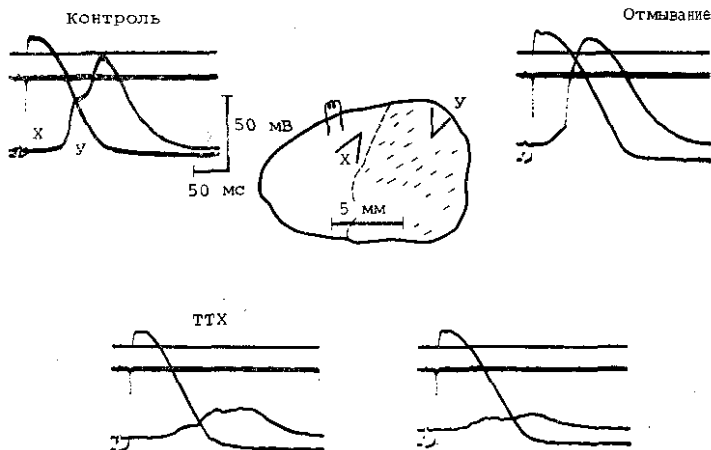


Рис. 16.5. Влияние тетродотоксина (ТТХ) на область распространения потенциала действия ишемической миокардиальной клетки (Y), имеющей низкую скорость нарастания и неправильную форму. Препарат выделен из вепикарда сердца собаки через 3 дня после окклюзии коронарной артерии. Показан также потенциал действия и скорость его нарастания (запись в середине) в клетке нормальной ткани (X), расположенной на границе ишемической зоны. Добавление ТТХ в перфузат приводит к значительному угнетению потенциала действия в клетке ткани ишемической зоны, в то время как в нормальной ткани ($\dot{V}_{\text{макс}}$) потенциал действия угнетается слабее (приблизительно на 2%).

витие рециркуляторных тахикардий у человека в большинстве случаев связано с угнетенной работой быстрых каналов. Перфузия левой передней нисходящей артерии изолированного сердца свиньи раствором, не содержащим глюкозы, с высоким содержанием K^+ , приводит к угнетению фазы быстрой деполяризации потенциалов действия в такой же степени, как и при острой окклюзии коронарной артерии [43]. Эти данные противоречат наблюдениям, полученным *in vitro* другой группой исследователей, обнаруживших, что перфузия фрагмента миокарда кровью, оттекающей из зоны ишемии донора, сильнее угнетает потенциал действия, чем перфузия с высокой концентрацией K^+ [44]. Исследователи предположили, что расхождения результатов этих двух работ могут быть обусловлены отсутствием сократительной активности и более высоким напряжением кислорода *in vitro* по сравнению с условиями *in vivo*. Имеющиеся в настоящее время данные указывают, что простые факторы, которыми манипулировали в этих экспериментах, способны частично, если не полностью, объяснить угнетение возбудимости при острой ишемии. На поздних ее стадиях, по-видимому, действуют другие факторы.

Фронт потенциала действия при ишемии не только угнетен, но часто имеет неправильную форму, что показано на рис. 16.6, на котором приведены потенциалы действия, генерируемые в ишемических субэпикардиальных клетках. Такое явление может быть следствием гетерогенности свойств быстрых каналов в мик-

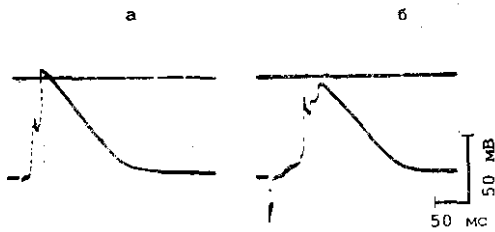


Рис. 16.6. Искаженная форма фронта потенциала действия миокардиальной клетки ткани ишемической зоны, зарегистрированного в эпикардиальном препарате, выделенном из сердца собаки через 2 дня после окклюзии коронарной артерии. На рис. а интенсивность стимуляции выше, чем на рис. б, что можно видеть по различной амплитуде артефактов стимула. При более низкой интенсивности стимула искажения фронта потенциала действия усиливались (б).

ность стимуляций выше, чем на рис. б, что можно видеть по различной амплитуде артефактов стимула. При более низкой интенсивности стимула искажения фронта потенциала действия усиливались (б).

ромасштабе: разные группы каналов вблизи микроэлектрода могут иметь различную кинетику и зависимость от потенциала. Это может быть также обусловлено влиянием на фронт волны активации неправильной формы, т. е. несинхронным поступлением волн возбуждения с разных направлений к клетке, в которой производится регистрация. На предполагаемую возможность такого механизма указывают записи, представленные на рис. 16.6. Различия между потенциалами действия на рис. 16.6, а и 16.6, б вызваны изменением интенсивности стимуляции (на рис. 16.6, б, она меньше). Стимулирующий ток вероятнее всего влияет на фронт активации, а не на саму клетку, так как ее активация наступает через 15—20 мс после окончания стимула. При стимуляции большой интенсивности (см. рис. 16.6, а) наблюдается фронт неправильной формы, а при меньшей интенсивности стимула сначала возникает длительная преддеполяризация, за которой следует фронт еще более неправильной формы. Было показано, что последовательность активации ишемических участков может быть сильно искажена, особенно при высокой частоте стимуляции, когда начинается проявление рефрактерности [45—48]. Угнетенные и искаженные фронты потенциалов действия частично регистрируются на электрограмме ишемического миокарда в виде низкоамплитудных полифазных зубцов [48—53]. Несмотря на немногочисленность прямых данных относительно межклеточного сопряжения и внутриклеточного сопротивления при ишемии, предполагают, что ишемия вызывает частичное разобщение клеток, сопровождающееся повышением внутриклеточного сопротивления. Известно, что увеличение концентрации Ca^{2+} и Na^+ и падение рН в цитозоле, что, по-видимому, и происходит при ишемии, вызывает разобщение клеток в результате повышения сопротивления пексусов [54—56]. В гипоксическом миокарде наблюдается увеличение внутреннего сопротивления, сопровождающееся ростом механического напряжения в покое [57], что свидетельствует о тесной связи разобщения клеток с повышением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Было бы разумно предположить, что такие участки разобщения клеток неоднородно распределены в зоне ишемии, что вносит определенный вклад в замедление и искажение последовательности активации, а также в искажение фронта потенциала действия. Следствия этого эффекта неодно-

значны. Частичное разобщение способно в действительности повысить вероятность возбуждения и увеличить скорость нарастания потенциала действия в условиях частичного угнетения входящего тока, ответственного за возбуждение [58]. При укорочении постоянной длины меньшая часть такого угнетенного тока будет рассеиваться по миоплазме и большая его часть будет поступать для зарядки емкости мембраны до порогового потенциала.

РЕПОЛЯРИЗАЦИЯ И РЕФРАКТЕРНОСТЬ

При острой ишемии всегда наблюдается уменьшение длительности потенциала действия, причем ускорение реполяризации преимущественно происходит за счет укорочения фазы плато [1, 2, 29, 38—40]. Гипоксия вызывает аналогичное действие, как и острая ишемия, за исключением того, что при гипоксии *in vitro* требуется значительно больше времени [44, 59], чтобы получить те же эффекты, которые развиваются через несколько минут ишемии *in vivo* [1, 2, 37—40]. Были исследованы изменения свойств мембраны при гипоксии, предрасполагающие к наблюдаемым изменениям формы потенциала действия [12]. На ранней стадии и при умеренной интенсивности гипоксия, по-видимому, вызывает увеличение независимого от времени калиевого тока. Этот результат согласуется с полученными ранее данными о том, что при гипоксии возрастает выход калия из клеток [16]. Такое увеличение калиевой проводимости может быть связано с повышением концентрации Ca^{2+} в цитозоле. В других работах показано, что при более глубокой гипоксии наблюдается угнетение медленного входящего тока, что приводит к уменьшению длительности фазы плато [60]. Ранее было установлено, что медленный входящий ток зависит от уровня цАМФ в клетке и метаболической энергии, поэтому можно объяснить падение медленного входящего тока на поздних стадиях ишемии следствием уменьшения уровня АТФ [61, 62]. Играет ли этот механизм какую-либо роль при ишемии, окончательно не установлено, но можно предположить, что увеличение калиевой проводимости и уменьшение медленного входящего тока также наблюдаются и при ишемии, так как при этом состоянии, как и при гипоксии, одинаково изменяются процессы реполяризации, одинаково увеличивается выход K^+ из клеток и так же быстро происходит падение силы сокращения. В условиях гипоксии *in vitro* первыми проявляются изменения процесса реполяризации, в то время как при ишемии примерно к этому же времени происходит частичная деполяризация мембраны [1, 2, 37—40], возможно вследствие накопления в межклеточном пространстве выходящих из клеток K^+ . Повышение внеклеточной концентрации K^+ при ишемии *in vivo* может быть, кроме того, одним из факторов, приводящих к укорочению потенциала действия и усилению калиевой проводимости.

Параметры, характеризующие реполяризацию клеток в поздней стадии ишемии, могут сильно варьировать. Наблюдали как

удлинение, так и укорочение процесса реполяризации [17—29]. Обычно длительность процесса реполяризации в миокардиальных клетках ишемического эпикарда, исследованных через 1—10 дней после окклюзии коронарной артерии, либо соответствует норме, либо слегка уменьшена, но в более глубоких слоях ишемического миокарда можно обнаружить клетки с очень длинным потенциалом действия [22], что также характерно для миокардиальных клеток ткани сердца кошки, выживших через несколько месяцев после окклюзии коронарной артерии [25]. Периферические проводящие сердечные миоциты, выделенные через 1—5 дней после окклюзии коронарной артерии сердца собаки, также имеют однородно удлиненные потенциалы действия [17—20]. В настоящее время обсуждаются причины изменений, происходящих в клетках на поздней стадии ишемии. И в этом случае можно рассматривать возможное участие ишемических продуктов. Реполяризация кардиомиоцитов замедляется при воздействии различных факторов, основными из которых являются повышение содержания в миокарде лактата [63] и лизофосфолипидов [30], а также CO_2 -ацидоз [64]. Ионные механизмы замедления процесса реполяризации при ишемии не известны.

При ишемии может измениться зависимость длительности потенциала действия от частоты сердечного ритма. В ряде случаев такая зависимость оказалась очень слабой или вообще отсутствовала [22, 24]. Однако в настоящее время нет каких-либо экспериментальных данных о причинах такой относительной нечувствительности процесса реполяризации к интервалу между последовательными возбуждениями сердца. Колебания внутриклеточной концентрации свободных ионов Ca^{2+} в сердечном цикле, влияющие на реполяризующие калиевые токи, могут быть подавлены на поздней стадии ишемии вследствие угнетения медленного входящего тока.

В изолированных миокардиальных клетках ишемического эпикарда *in vitro* часто наблюдаются необычные реакции на преждевременную стимуляцию. Например, можно выделить некоторый диапазон интервалов между стимулами, при котором преждевременный стимул вызывает появление потенциала действия с длительностью фазы плато, превышающую контрольную. Вместе с удлинением потенциала действия наблюдается увеличение его амплитуды, что не сопровождается повышением скорости проведения, более того, скорость нарастания потенциала действия уменьшается. Эти изменения можно объяснить увеличением медленного тока, происходящим в течение определенного интервала в пределах сердечного цикла, но причины этого остаются неясными. Пример такого аномального поведения потенциала действия показан на рис. 16.7.

Особое внимание уделено сообщениям о том, что длительность рефрактерного периода в ишемических клетках, особенно находящихся в сильно угнетенном состоянии, обычно превышает длительность потенциала действия и часто в значительной степени [21, 28]. Период невозбудимости (абсолютный рефрактерный

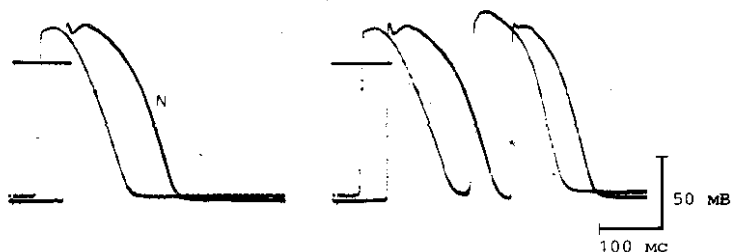


Рис. 16.7. Аномальное изменение фазы плато потенциала действия при преждевременной стимуляции. Слева — потенциалы действия, зарегистрированные в миокардиальных клетках ткани ишемической зоны (ИЗ) и нормальной ткани (N) в эпикардиальном препарате, выделенном из сердца собаки через 5 дней после окклюзии коронарной артерии; справа — реакции двух описанных выше клеток на экстрасимул. По сравнению с потенциалом действия в ритмическом ряду стимуляции потенциал действия клетки ткани ишемической зоны при экстрасимуле характеризуется большей амплитудой, особенно во время фазы плато, и большей длительностью плато. Реакция потенциала действия клетки нормальной ткани отличается как обычно укорочением фазы плато и полной длительности потенциала действия.

период) может наблюдаться в течение всего потенциала действия и распространяться на диастолу, а относительный рефрактерный период, характеризуемый большей величиной тока для возбуждения и частично угнетенной реакцией, может захватывать большую часть диастолы. Более того, часто отмечается аномальная прямая зависимость между продолжительностью рефрактерного периода и частотой сердечного ритма: чем выше частота, тем больше рефрактерный период. Эти свойства после реполяризации рефрактерности показаны на рис. 16.8.

Аномальная рефрактерность ишемических клеток подобно рефрактерности нормальных клеток зависит от частоты сердечного ритма, но перестройка рефрактерности происходит не за один сердечный цикл. Время, необходимое для перехода в новое равновесное состояние, и величина изменений рефрактерности в ходе такой перестройки в случае аномальной рефрактерности больше, чем в случае нормальной. Зависимость потенциала действия от частоты возбуждения накладывается на рефрактерность в данном цикле, что и проявляется постепенным переходом в новое положение равновесия. На рис. 16.8 при межстимуляционном интервале 3000 мс рефрактерный период в ишемической клетке составлял приблизительно 400 мс. Когда межстимуляционный интервал снизили до 1000 мс, рефрактерный период, измеряемый в одном цикле, увеличился до 650 мс, а следующий потенциал действия в ритмическом ряду был также угнетен, несмотря на то, что он находился уже вне рефрактерного периода. Зависимость потенциала действия от времени и от межстимуляционного интервала показана на рис. 16.9 и 16.10. Если быстро переключить стимуляцию на более высокую частоту, то потенциал действия со временем сменяется, и иногда возбудимость полностью исчезает. При введении продолжительной паузы возбудимость

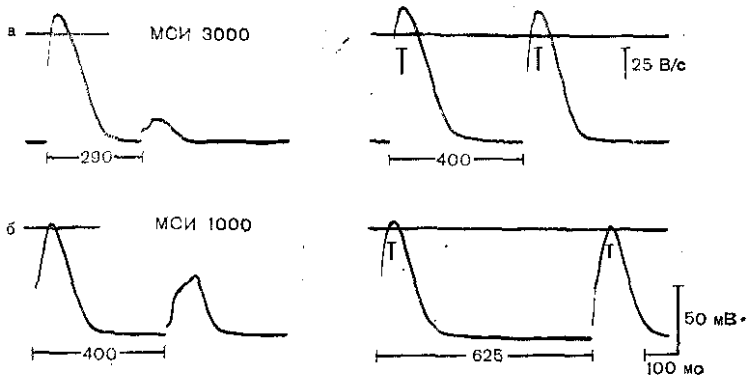


Рис. 16.8. Аномальные рефрактерные свойства ишемической зоны миокардиальной клетки ткани. Слева — реакции клетки ткани ишемической зоны на экстрастимулы с короткой задержкой при основном межстимуляционном интервале (МСИ), составляющем 3000 мс (а) и 1000 мс (б); абсолютный рефрактерный период далеко заходит в фазу диастолы и увеличивается при более коротких МСИ; справа — реакции на экстрастимулы с более длинной задержкой, которые мало отличаются от потенциалов действия в ритмическом ряду стимуляции. Они отмечают границы относительного рефрактерного периода. Скорости нарастания потенциалов действия в ритмическом ряду, вызванных экстрастимуляцией, показаны в виде вертикальных отрезков внутри записи потенциала. Относительный рефрактерный период в таких клетках также отличается большой длительностью, возрастающей при увеличении МСИ, по сравнению с относительным рефрактерным периодом клеток нормальной ткани, длительность которого определяется фазой реполяризации потенциала действия. Записи сделаны в ишемической зоне эпикардиального препарата, выделенного из сердца собаки через 3 дня после окклюзии коронарной артерии.

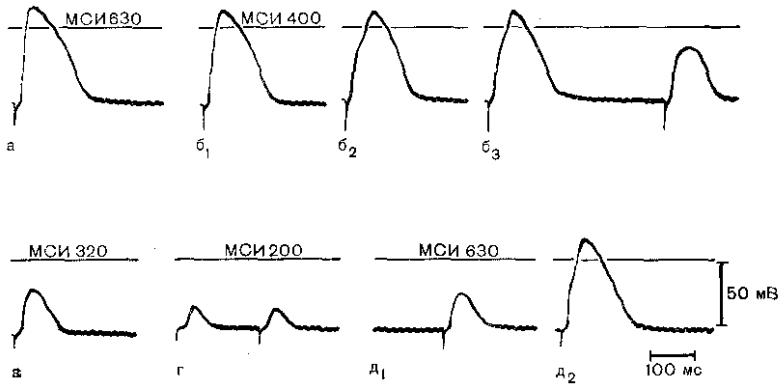
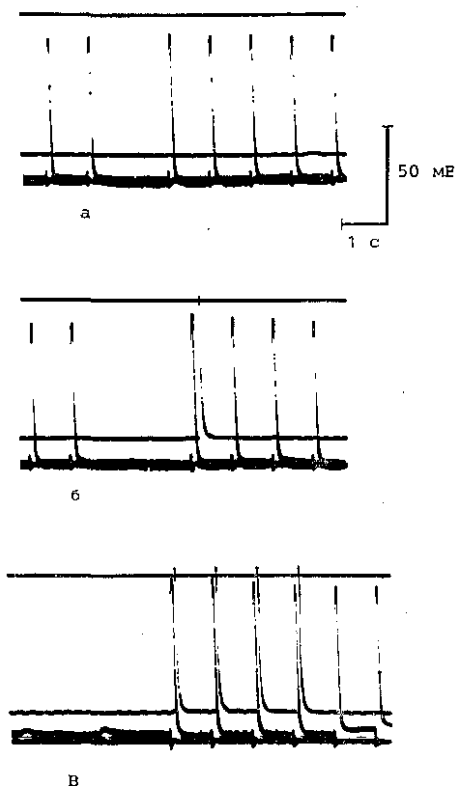


Рис. 16.9. Угнетение потенциала действия в миокардиальных клетках ткани ишемической зоны в зависимости от частоты стимуляции и от времени (усталость).

а—г — потенциалы действия, вызываемые в ритмическом ряду стимуляции при разных значениях МСИ; д — возврат к исходному МСИ (630 мс); б₁ — первый потенциал действия, развивающийся при изменении МСИ от 630 до 400 мс; б₂ — потенциал действия через 20 с; б₃ — потенциал действия через 40 с, наблюдались альтерации потенциала действия с переменной сменой амплитуды от больших до меньших значений. При возврате к МСИ—630 мс первый потенциал действия (д₁) лишь слегка увеличился, но через 15 с (д₂) усиление его уже явно выражено. Такие изменения формы потенциала действия не сопровождаются заметными изменениями потенциала покоя. Записи сделаны в клетке ишемической зоны эпикардиального препарата, выделенного из сердца собаки через 5 дней после окклюзии коронарной артерии.

Рис. 16.10. Восстановление возбудимости клетки ткани ишемической зоны после введения паузы. Потенциалы действия регистрировали одновременно в двух клетках ишемической зоны эпикардального препарата, выделенного из сердца собаки через 4 дня после окклюзии коронарной артерии. Стимуляция препарата с частотой 1 Гц приводит к невозбудимости одной из клеток через 10—15 с после начала стимуляции. Выключение стимуляции на 2 с (а) не привело к восстановлению возбудимости в этой клетке, но после 3-секундной паузы возникло однократное возбуждение (на рис. б отмечено звездочкой). Если пауза продолжалась 8 с (в), то при восстановлении стимуляции отмечались четыре последовательных потенциала действия, вслед за которыми вновь наступила невозбудимость.



восстанавливается и последующие стимулы вызывают потенциалы действия (см. рис. 16.10), что обозначают термином «усталость» [21]. Такое развитие реакций во времени обычно не зависит от изменений потенциала действия, но иногда при высокой частоте сердечного ритма наблюдается постепенная деполяризация (рис. 16.11). При кратковременных изменениях частоты (до нескольких минут) деполяризация наблюдается реже, чем простое угнетение ответа. По-видимому, со временем происходит накоп-

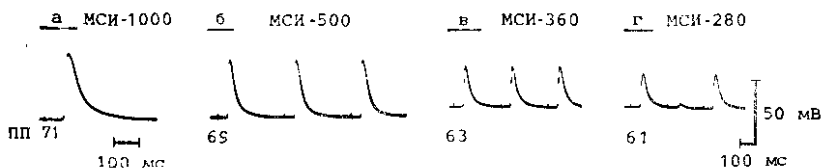


Рис. 16.11. Уменьшение потенциала покоя (ПП) и угнетение возбудимости ишемической миокардиальной клетки при повышении частоты стимуляции. Препарат эпикарда, выделенный из сердца собаки через 24 ч после окклюзии коронарной артерии. а — г — потенциал покоя (ПП) и потенциал действия при различных величинах межстимуляционного интервала. При уменьшении интервала от 1000 до 280 мс происходит постепенная деполяризация клетки. Одновременно с этим уменьшаются амплитуда и скорость нарастания потенциала действия.

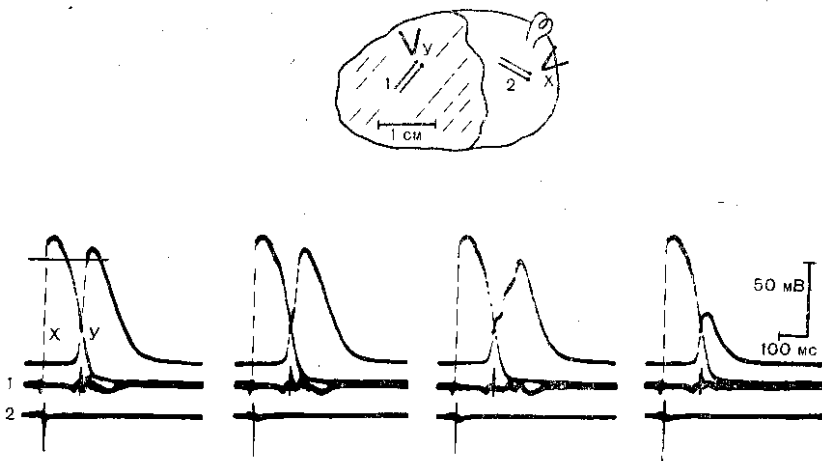


Рис. 16.12. Постепенное угнетение фазы быстрой деполаризации потенциала действия ишемической миокардиальной клетки (Y) в ритмическом ряду стимуляции. Препарат эпикарда, выделенный из сердца собаки через 24 ч после окклюзии коронарной артерии. Показаны также потенциалы действия, зарегистрированные в клетке нормальной ткани (X), вместе с электрограммами, полученными в ткани ишемической зоны (1) и в нормальной ткани (2) вблизи мест регистрации соответствующих потенциалов действия.

ление некоторого угнетающего фактора или истощение некоторого активирующего фактора, которые влияют на ток, ответственный за возбуждение. Значительное увеличение времени восстановления тока, ответственного за возбуждение, по-видимому, отражает задержку восстановления из состояния инактивации угнетенных натриевых каналов. Деполаризация, зависящая от частоты сердечного ритма, может быть обусловлена аккумуляцией K^+ в межклеточном пространстве, но это маловероятно в перфузируемых препаратах изолированного эпикарда. Кроме того, возможно угнетение работы электрогенного насоса вследствие истощения уровня АТФ в клетке.

Было показано, что восстановление нормальных быстрых натриевых каналов из инактивированного состояния замедляется при частичной деполаризации [65] или при воздействии веществ, угнетающих быстрые каналы, таких как, например, хинидин [66]. Время, необходимое для восстановления каналов в ишемических клетках, слишком велико, чтобы его можно было объяснить простой частичной деполаризацией. Такие данные говорят о прямом угнетающем действии на быстрые каналы некоторого фактора, связанного с ишемией миокарда. Так, в АВ-узле наложение возбуждения на рефрактерный период после предыдущего потенциала действия вызывает появление некоторой повторяющейся серии возбуждений, в которой каждый последующий потенциал действия progressively угнетается до потери способности к распространению. Это так называемый феномен Венкебаха, показанный на рис. 16.12.

Комбинация гетерогенного распределения длительностей потенциала действия в миокарде вместе с различиями во времени восстановления тока, ответственного за возбуждение, приводит к существенной дисперсии рефрактерных периодов в ишемических участках. Более того, особым признаком послереполяризационной рефрактерности является аномально большая длительность относительных рефрактерных периодов, т. е. периодов, во время которых возникают потенциалы действия еще более угнетенные, чем просто в условиях ишемии, что еще более нарушает последовательность активации. Вероятность рециркуляции возбуждения в этих условиях значительно повышена. Подробное картирование последовательности активации при возникновении формирования рециркуляции возбуждения показало важное значение аномальной вариабельности рефрактерных периодов в возникновении беспорядочной последовательности активации, приводящей к рециркуляции.

АВТОМАТИЗМ

Диастолическая деполяризация в ишемических проводящих сердечных миоцитах происходит быстрее и частота их спонтанной активности выше [18, 19]. На ранних стадиях ишемии такого явления не наблюдается, но оно сильно выражено в 1-й день после окклюзии артерии и постепенно исчезает через несколько дней, что можно видеть на рис. 16.2, на котором показано исчезновение некоторых аномалий электрической активности, включая повышенный автоматизм при перфузии проводящих сердечных миоцитов раствором Тироде. Даже при низком содержании кислорода и глюкозы в перфузионном растворе скорость диастолической деполяризации постепенно снижается до нормы. Такое повышение скорости диастолической деполяризации не связано со стимуляцией β -адренергических рецепторов, так как при их блокаде скорость не уменьшается до нормы, но может еще более возрастать под воздействием β -агонистов [19, 67]. Лидокаин в меньшей степени угнетает диастолическую деполяризацию ишемических проводящих сердечных миоцитов, чем клеток нормальных тканей [68], а этmozин — в большей [69]. Такие реакции на фармакологические вещества означают, что ионные токи, ответственные за диастолическую деполяризацию в ишемических тканях, могут отличаться от тех, которые определяют автоматизм нормальных проводящих сердечных миоцитов. В этом случае можно предполагать также участие некоторого вымываемого продукта ишемии. Такую роль могут играть несколько веществ. Например, лизофосфолипиды увеличивают скорость диастолической деполяризации в проводящих сердечных миоцитах.

В этих клетках и в миокардиальных клетках глубоких слоев ишемической зоны развивается также аномальная форма электрической активности в виде следовой деполяризации [22, 24, 70, 71]. Так как такая следовая деполяризация не наблюдается ни в субэндокарде, ни в субэпикарде, возникают проблемы, связанные

с необходимостью рассечения ткани миокарда для исследования глубоких слоев миокарда. Появление задержанных следовых деполяризаций неудивительно в свете имеющихся данных, подтверждающих, что такие задержанные следовые деполяризации определяются колебаниями повышенной концентрации внутриклеточных ионов Ca^{2+} [72]. Степень участия этого явления в развитии эктопических тахикардий *in vivo* нуждается в дальнейшем уточнении. Ионным осваиванием возникновения таких ранних следовых деполяризаций пока не уделялось достаточного внимания, поэтому нельзя даже выдвинуть какое-либо предположение относительно возможной связи этого явления с ишемией.

ЭКТОПИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Возбуждение нормальной миокардиальной ткани, источник которого находится в зоне ишемии, независимо от механизма его возникновения представляет собой одну из форм эктопической активности. Получены убедительные данные о том, что наиболее частой причиной возникновения эктопической активности является рециркуляция возбуждения. Последняя возникает как нарушение нормальной последовательности активации миокарда, для проявления которой необходимы разобщение клеток и столкновение ряда необычных факторов. Потенциал действия должен непрерывно распространяться, пока клетки окружающего нормального миокарда находятся в абсолютном рефрактерном периоде. Размеры сердца и нормальная длительность рефрактерного периода обуславливают необходимость аномально медленного проведения для выполнения этого условия. Для ишемической ткани характерно снижение скорости проведения, по разному выраженное в различных участках ишемической зоны. Замедление проведения особенно выражено в том случае, когда фронт возбуждения наталкивается на аномально продолжительный относительный рефрактерный период в ишемических клетках, остающийся после предыдущего возбуждения. Поэтому такое нарушение электрической активности играет особенно значительную роль в развитии эктопической активности. Так как поступающая извне волна возбуждения в принципе способна активировать клетки по всей границе зоны ишемии, необходимы определенные условия для того, чтобы потенциал действия распространялся в каком-либо одном направлении, т. е. должен иметь место однопольный блок проведения, иначе волна возбуждения слондет, натолкнувшись на фронт потенциала противоположного направления. Такое однопольное проведение многократно регистрировали в зоне ишемии. Основная причина его возникновения связана с рефрактерностью. Потенциал действия, распространяющийся по одному направлению, попадает на участок ткани, находящийся в состоянии рефрактерности, и слондет. Через некоторое время возбудимость этого участка восстанавливается, и как раз в этот момент к нему с противоположного направления поступает с некоторой задержкой волна возбуждения,

распространяющаяся с меньшей скоростью. Наконец, для завершения образования замкнутого пути проведения должны иметь место так называемые дырки, т. е. участки между местом входа возбуждения в цепь и местом его выхода из цепи, через которые оно не проходит. Такой участок разделения может представлять собой линию с нулевой толщиной, как предложено в гипотезе о «ведущем пути рециркуляции» [73], в которой предполагается, что место входа в цепь отделяется от места выхода линией абсолютной рефрактерности. В зоне ишемии такими «дырками» могут быть участки рубцовой ткани или участки невозбудимого, но непогибшего миокарда. Как уже было показано (см. рис. 16.9, 16.10), невозбудимость или длительное отсутствие возбуждения миокарда могут быть связаны с рефрактерностью миокардиальных клеток. Таким образом, отдельные участки пути рециркуляции возбуждения образуются в результате сочетания сложного временного и пространственного взаимодействия замедленного проведения и неоднородного распределения аномальных характеристик рефрактерного периода.

Возникновение периодических возбуждений, имеющих по-видимому, рециркуляторную природу в небольших препаратах субэпикарда, содержащих ишемические клетки, показано на рис. 16.13. Если преждевременная стимуляция подается на участки с разными рефрактерными свойствами, то в одних она не вызывает никакого ответа, в других ответ будет сильно угнетен, а в третьих возникает полноценный потенциал действия. Так как картирование пути рециркуляции не проводилось, то невозможно сказать, является ли невозбудимый участок важной составной частью этого пути. Тем не менее ясно, что такие невозбудимые участки, или «дырки», могут возникать вследствие аномальных рефрактерных свойств ткани. Преждевременная стимуляция, приводящая к тахикардии, обуславливает значительно большие вариации временного развития и формы потенциалов действия в различных участках миокарда, чем экстрастимул, который не приводит к рециркуляции возбуждения.

Взаимодействие между клетками, обладающими различными свойствами, способно оказывать влияние даже на развитие быстрого входящего тока, которое в принципе определяется только свойствами мембраны данной клетки и больше ни от чего не зависит. Например, было показано, что увеличение деполяризующего входящего тока может вызвать появление медленной диастолической деполяризации в частично деполяризованных клетках или ускорить уже существующую [74—76]. Ток, протекающий между соседними клетками, имеющими разный уровень трансмембранного потенциала, может влиять на автоматическую активность клетки или кластера клеток. В участках с задержкой проведения через такую «дырку» могут возникать электротонические взаимодействия между клетками, которые уже реполяризовались, и клетками, которые активируются с некоторой задержкой. Это явление было названо явлением «отражения» [77]. Такой механизм способен усилить следовые деполяризации или вследствие

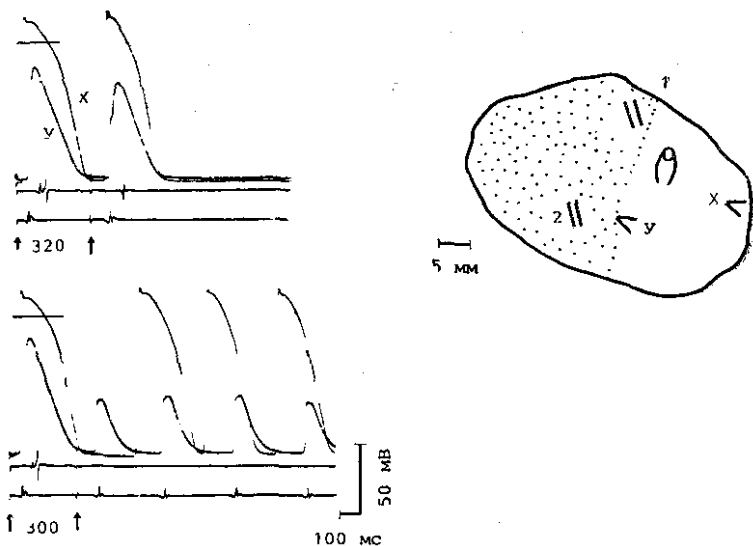


Рис. 16.13. Возникновение частых повторяющихся возбуждений (тахикардии) в энкардиальном препарате, содержащем нормальный и ишемический (отмечен точками) участки. Препарат выделен из сердца собаки через 4 дня после окклюзии коронарной артерии. Потенциалы действия регистрировали в клетке ткани на границе зоны ишемии (Y) и в клетке нормальной ткани (X). Электрограммы снимали в зоне ишемии (1 и 2) при интервале 320 мс между основным и экстрасимулом, во всех точках наблюдали ответы, несущественно отличающиеся от реакций на основной ритм стимуляции. При интервале сцепления 300 мс в точке 1 ответ не наблюдался, а в точке Y потенциал действия был угнетен. В точке X с некоторой задержкой возникал полный потенциал действия, за которым следовало развитие ритмической активности в точках 2, X и Y, причем амплитуда потенциала действия в точке Y была значительно снижена. Тахикардия сопровождалась постоянным блоком проведения в точке 1.

электротонического взаимодействия вызвать изменения трансмембранного потенциала, которые напоминают настоящие следовые деполяризации. Этой концепции близко определение «фокусное ревозбуждение» [78], т. е. возбуждение при прохождении тока между соседними клетками, имеющими разный уровень мембранного потенциала вследствие различной скорости реполяризации в них. Существует также вопрос, связанный с тем, что вокруг зоны ишемии при реполяризации и во время диастолы могут наблюдаться электротонические токи большой амплитуды [45, 46]. Они являются причиной возникновения «токов повреждения» и «смещения сегмента ST» на ЭКГ, которые наиболее заметны в острой стадии ишемии. Однако на поздней ее стадии электротонические токи могут быть уменьшены вследствие разобщения клеток. Возбуждение клеток электротоническими токами во время реполяризации или в фазе диастолы может быть облегчено при появлении резких различий в условиях на соседних участках миокарда, подобно сахарозной щели *in vitro*. На участках, где изменение электрофизиологических свойств клеток происходит

плавно без резких скачков, электротоническое взаимодействие между соседними клетками способствует уменьшению разности потенциалов и тока, протекающего между ними [79]. Была исследована возможность фокусного ревозбуждения или отражения при острой ишемии, являющегося следствием высокоамплитудных токов «повреждения» и узости «невозбудимого участка» между ишемической и нормальной тканью [80]. Пока не ясна степень влияния неоднородности электрофизиологических свойств миокарда на величину электротонического тока, определяющую возможность аномального возбуждения. Несомненна, однако, роль гетерогенности в возникновении рециркуляции возбуждения в зоне ишемии.

Влияние ишемии на миокард имеет множество аспектов, обусловленных различными факторами, связанными с истощением субстратов и появлением необычных для миокарда соединений, которые происходят с разной скоростью. Кроме того, влияние ишемии на миокард определяется также взаимодействием между неоднородно аномальной и нормальной тканью, косвенными эффектами нарушения насосной функции желудочков, механическим перерастяжением, изменением автоматической активности и т. д. Изучение этой проблемы тормозится вследствие невозможности регистрации внутриклеточных потенциалов в условиях ишемии *in vivo*. Тем не менее понимание вопросов углубляется и интерес к нему не ослабевает.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kardesch M., Hogancamp C. E., Bing R. J.* Effect of complete ischemia on the intracellular electrical activity of the whole mammalian heart. — *Circulat. Res.*, 1958, vol. 6, p. 715—725.
2. *Samson W. E., Scher A. M.* Mechanism of S-T segment alteration during acute myocardial injury. — *Circulat. Res.*, 1960, vol. 8, p. 780—787.
3. *Bishop S. P., White F. C., Bloor C. M.* Regional myocardial blood flow during acute myocardial infarction in the conscious dog. — *Circulat. Res.*, 1976, vol. 38, p. 429—438.
4. *Trautwein W., Gottstein U., Dudel J.* Der Aktionsstrom der Myokardfaser un sauerstoffmangel. — *Pflügers. Arch.*, 1954, vol. 260, p. 40—60.
5. *Coraboeuf E., Gargouil Y. M., Laplaud J., Desplaced A.* Action de l'anoxie sur les potentiels electriques des cellules cardiaques de mammiferes actives et enertes (tissu ventriculaire isole de cobaye). — *C. R. Acad. Sci. [D] (Paris)*, vol. 246, p. 3—400.
6. *Webb J. L., Hollander P. B.* Metabolic aspects of the relationship between the contractility and membrane potentials of the rat atrium. — *Circulat. Res.*, 1956, vol. 4, p. 618—626.
7. *Moore D. J.* Potassium changes in the functioning heart under conditions of ischemia and congestion. — *Amer. J. Physiol.*, 1938, vol. 123, p. 44.
8. *Harris A. S., Bisteni A., Russel R. A.* et al. Excitatory factors in ventricular tachycardia resulting from myocardial ischemia: potassium a major excitant. — *Science*, 1954, vol. 119, p. 200.
9. *Regan T. J., Harman M. A., Lehan P. H.* et al. Ventricular arrhythmias and potassium transfer during myocardial ischemia and intervention with procainamide, insulin, or glucose solution. — *J. Clin. Invest.*, 1967, vol. 46, p. 1657—1668.
10. *Jennings R. B., Crouer J. R., Smetters G. W.* Studies on distribution and localization of potassium in early myocardial ischemic injury. — *Arch. Path.*, 1957, vol. 63, p. 586—592.

Глава 17

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АНТИАРИТМИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Л. М. ХОНДЕГХЕМ, Б. Г. КАТЦУНГ (L. M. HONDEGHEM,
B. G. KATZUNG)

ВВЕДЕНИЕ

В этой главе рассматривается гипотеза модулированного средства рецепторов, представляющая механизм действия некоторых антиаритмических препаратов на миокард. Приводится краткий обзор работ, обусловивших создание этой гипотезы, подробное описание механизма и применение его к описанию действия некоторой группы антиаритмических препаратов в случае нарушений ритма, при которых эти препараты эффективны.

Антиаритмическое действие оказывает большое число лекарственных препаратов, например, противомаларийные препараты, местные анестетики, блокаторы адренорецепторов и холинорецепторов, антигистаминные и противоэпилептические препараты. Выяснение механизма действия группы таких разнообразных химических соединений привело к выдвигению нескольких гипотез. Они в первую очередь были необходимы для классификации рассматриваемых препаратов и лишь некоторые из них относились к механизму угнетения антиаритмическими препаратами аномальной электрической активности без влияния на электрогенез нормального потенциала действия.

Применение электрофизиологических методов для изучения действия препаратов на клеточную мембрану позволило выявить некоторые их свойства, с которыми, по-видимому, связано угнетение аномальной электрической активности.

Первым свойством, для которого была точно показана его корреляция с антиаритмическим действием, оказалась способность к местной анестезии [1]. Такое действие, связанное с блокированием натриевых каналов, в настоящее время считается основным для наиболее часто применяемых антиаритмических препаратов, например, хинидина, лидокаина и их производных. В нервной ткани проведение потенциалов действия блокируется как в здоровых, так и в поврежденных волокнах при относительно высоких концентрациях местных анестетиков. В сердечной мышце проведение в волокнах с угнетенной возбудимостью подавляется, а нормальное проведение остается практически без изменений, если препараты применяют не в токсических дозах. Другими словами, эти вещества в концентрациях, назначаемых при лечении

аритмий, селективно угнетают проведение в поврежденных сердечных волокнах. Такая селективность, по-видимому, имеет наиболее важное значение для подавления рециркуляторных аритмий [2].

Два других эффекта, оказываемых антиаритмическими препаратами, также, по крайней мере частично можно обосновать их способностью блокировать натриевые каналы. Блокирование натриевых каналов имеет значение для увеличения рефрактерности, возникающей при действии некоторых из этих препаратов. Оно играет также определенную роль в подавлении аномальной пейсмейкерной активности, развивающейся при более отрицательных диастолических потенциалах [3].

Препараты, блокирующие кальциевые каналы, были разработаны в качестве сосудорасширяющих средств, однако некоторые из них оказывают также антиаритмическое действие [4]. Эти препараты расслабляют нормальную гладкомышечную мускулатуру сосудов и вызывают небольшое или умеренное угнетение активности сердца. Однако некоторые из них сильно угнетают аномальную электрическую активность миокарда, например, медленные ответы в ишемической и деполяризованной ткани [55]. Имеются данные о том, что реакция гладких мышц на блокаторы кальциевых каналов также зависит от мембранного потенциала [6]. Таким образом, некоторые из этих лекарственных препаратов, по-видимому, вызывают селективное блокирование каналов, с которыми они взаимодействуют.

Вследствие этого можно сделать вывод, что селективное подавление мембран с угнетенным электрогенезом, по-видимому, является общим механизмом действия антиаритмических препаратов по крайней мере из двух важных подгрупп. Механизм такого селективного подавления в настоящее время наиболее убедительно объясняется гипотезой модуляции средства рецепторов [7, 8]. Эта гипотеза постулирует, что связывание блокирующего вещества с рецептором мембранного ионного канала изменяется в зависимости от состояния канала.

Наиболее общепринятым методом изучения действия препарата, блокирующего ионные каналы, является метод фиксации потенциала, так как блокирование канала по определению приводит к уменьшению ионного тока, поступающего через канал. Метод фиксации потенциала может быть относительно просто применен для регистрации тока в некоторых крупных клетках (например, в аксоне кальмара), но в миокарде его применение ограничено рядом технических проблем [9, 10]. Последние ограничивают скорость управления мембранным потенциалом при развитии больших ионных токов. Особенно такие ограничения относятся к натриевому току, ответственному за фазу быстрого нарастания (фаза 0) нормального потенциала действия в клетках предсердий, предсердно-желудочкового пучка проводящих волокон Пуркинье и миокарда желудочков. Поэтому большинство исследователей использовали скорость нарастания (dV/dt или \dot{V}) потенциала действия в качестве меры натриевого тока. Путем

математического моделирования было подтверждено, что максимальная величина \dot{V} ($\dot{V}_{\text{макс}}$ или $dV/dt_{\text{макс}}$) является приемлемым показателем максимума натриевого тока [11, 12]. Этот результат подкрепляется также данными прямых измерений натриевого тока в небольших миокардиальных препаратах, в которых возможна фиксация потенциала даже во время развития натриевого тока [13—15]. Следует, однако, отметить, что, для того чтобы можно было принять $\dot{V}_{\text{макс}}$ в качестве правильной оценки натриевой проводимости, необходимо соблюдение нескольких критериев: а) ионный ток вдоль волокна должен быть равен нулю [16]; б) мембранный потенциал, при котором достигается $\dot{V}_{\text{макс}}$, не должен изменяться при воздействиях; в) задержка между стимулом и моментом достижения $\dot{V}_{\text{макс}}$ должна быть постоянной [12]; г) вклад других токов, кроме натриевого, в момент достижения $\dot{V}_{\text{макс}}$ должен быть пренебрежимо мал [11].

Измерение кальциевого тока I_{SI} является значительно более легкой задачей: так как он меньше по амплитуде и более медленный, чем натриевый ток. По тем же причинам оценка I_{SI} на основании величины скорости парастания кальциевого потенциала действия является значительно более рискованной, так как очень вероятно влияние на $\dot{V}_{\text{макс}}$ натриевого и калиевых токов. Поэтому большая часть описанных ниже данных, относящихся к блокаторам кальциевого канала, получена в экспериментах по фиксации потенциала.

ПРЕДЫСТОРИЯ ВОПРОСА

Гипотеза модулированного средства рецепторов объясняет селективность действия антиаритмических препаратов на основании разницы генерации электрической активности в нормальной и аномальной ткани. Она включает различия в потенциале покоя, в форме и длительности потенциала действия, во времени, необходимом для восстановления возбудимости после окончания потенциала действия. Ранние работы, подтверждающие эти наблюдения, удобнее всего рассматривать относительно основных переменных: потенциала и времени.

Действие антиаритмических препаратов, зависящее от потенциала

В 1955 г. было показано [1], что кокаин уменьшает величину $\dot{V}_{\text{макс}}$ потенциала действия волокон Пуркинье овцы без значительного влияния на потенциал покоя. Кроме того, было сделано еще одно важное наблюдение, что при гиперполяризации даже на фоне постоянного действия препарата величина $\dot{V}_{\text{макс}}$ восстанавливается. Автор работы [1] интерпретировал эти результаты, показав, что кокаин инактивирует систему, ответственную за дви-

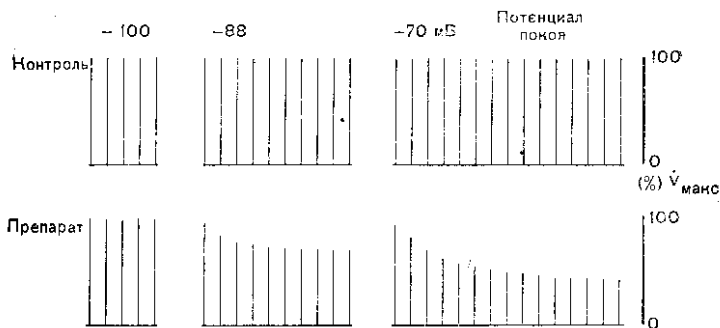


Рис. 17.1. Зависимость угнетения \dot{V}_{\max} прокаиномидом (180 мкМ) от потенциала покоя. Папиллярную мышцу сердца морской свинки стимулировали с частотой 3,3 Гц. Перед началом каждой записи делали паузу продолжительностью 20 с. Потенциал покоя мембраны изменяли пропусканием тока. Обратите внимание, что угнетение \dot{V}_{\max} под действием прокаиномиды усиливалось при деполяризации (–70 мВ) и ослаблялось при гиперполяризации (–110 мВ).

жение ионов натрия через мембрану. Авторы работы [17] показали, что фентоин в терапевтических дозах мало или совсем не влияет на величину \dot{V}_{\max} при низком содержании калия в растворе, но значительно снижает ее в случаях, когда мембрана деполяризована в результате повышения внеклеточной концентрации калия. Тот же эффект наблюдался и для лидокаина [18] (рис. 17.1). Авторы работ [2, 19] предположили, что основным механизмом действия некоторых антиаритмических препаратов является селективное блокирование натриевых каналов, деполяризованных в результате гипоксии или ишемии. Это предположение было затем подтверждено в нескольких лабораториях [20–24].

Действие антиаритмических препаратов, зависящее от времени

В работах [25, 26] было показано, что возбуждение мембраны в ритмическом ряду усиливает блокирование натриевых каналов хинидином (рис. 17.2). На основе изучения действия местных анестетиков на нервные волокна авторы работ [27, 28] предположили, что при каждом возбуждении (активации и инактивации) каналов часть из них блокируется веществом. При исследовании хинидина и лидокаина было установлено [29], что в течение временного промежутка между потенциалами действия происходит восстановление проводимости ранее заблокированных каналов. Кроме того, было показано, что скорость восстановления проводимости натриевых каналов в значительной мере зависит от потенциала; восстановление происходит быстрее в ткани с нормальным потенциалом покоя, чем в частично деполяризованной ткани. Мы обнаружили, что при фиксации потенциала на уровне –140 мВ вос-

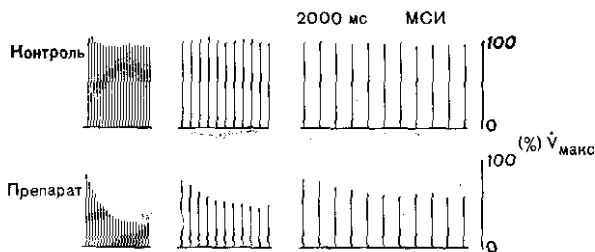


Рис. 17.2. Зависимость угнетения \dot{V}_{\max} априндином (14 мкМ) от частоты стимуляции. После 20-секундного периода покоя напильниковую мышцу стимулировали с частотой 3,3; 1 или 0,5 Гц. Обратите внимание, что угнетение \dot{V}_{\max} сильнее выражено при более высокой частоте стимуляции (менее продолжительно мембрана находится при отрицательных потенциалах; большее число активаций канала отмечается за единицу времени и более продолжительное время мембрана оказывается деполяризованой).

становление проводимости натриевых каналов в присутствии лидокаина или хинидина в терапевтической концентрации завершается менее чем за 200 мс [30].

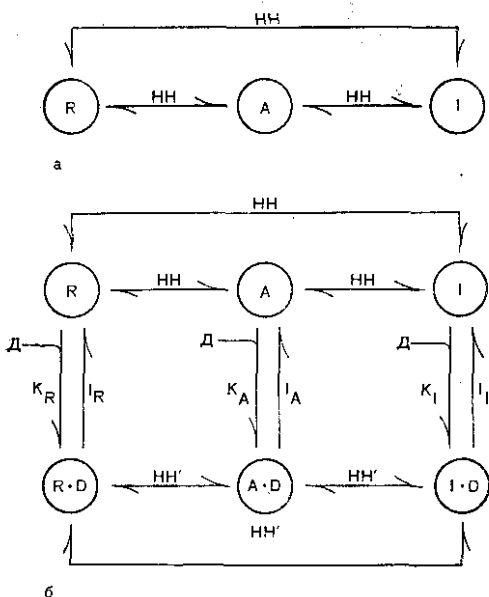
Действие антиаритмических препаратов, зависящее от состояния канала

Авторы работ [7, 8] предположили, что зависимое от потенциала и времени блокирование каналов при действии местных анестетиков и антиаритмических препаратов может быть объяснено с помощью модели, основанной на трех состояниях канала (рис. 17.3, а), описанных в работе [31]. При отрицательных потенциалах наибольшую вероятность имеет состояние покоя; при деполяризации каналы быстро проходят активированное состояние и переходят в инактивированное, в котором остаются до момента реполяризации мембраны.

Данные, полученные с помощью протокола для измерения кинетики развития блока, а также установившегося частотно-независимого блока, позволили предположить, что используемые в клинике антиаритмические препараты характеризуются различными наборами кинетических констант связывания и диссоциации для каждого из трех состояний канала (покоя, активации и инактивации), т. е. препарат взаимодействует с рецептором, сродство к которому изменяется в зависимости от состояния канала (см. рис. 17.3, б) [30, 32]. Каналы, с рецепторами которых препарат связался, не проводят ионного тока; кроме того, они реагируют так, как будто связь между потенциалом и инактивацией этих каналов сдвинута в сторону отрицательных потенциалов. Причины таких предположений объясняются следующим: необходимость предположения о взаимодействии веществ с каналом, находящимся в активированном состоянии, вызвана тем, что для многих препаратов блокирование выражено сильнее при увеличении частоты открываний канала [27]. Так как блокирование каналов в некоторой степени происходит и в состоянии по-

Рис. 173. Схематическое представление модуляции средства рецепторов.

а — без блокатора. Натриевые каналы могут находиться в трех состояниях: покоя (R, преобладает при отрицательных потенциалах), активации (A, каналы на короткое время открываются при деполяризации) и инактивации (I, преобладает при более положительных потенциалах). Переход между этими тремя состояниями осуществляется в соответствии с теорией Ходжкина—Хаксли [31]. б — в присутствии препарата. Молекулы препарата могут связываться (стрелка вниз) или диссоциировать (стрелка вверх) при взаимодействии с каналом, находящимся в любом из трех состояний. Канал, с рецептором которого оказалась связанной молекула препарата (R·D, A·D I·D), находится в состоянии, аналогичном таковому при менее отрицательном потенциале, т. е. параметры Ходжкина—Хаксли сдвинуты к более положительным потенциалам (НН'). Кроме того, каналы, с рецепторами которых оказался связанным препарат, блокированы, т. е. не пропускают ионный ток даже в состоянии активации.



коя [28, 29, 32], то это означает, что взаимодействие препарата с рецептором может происходить и при закрытом канале. Однако так как рецептор в состоянии покоя обычно имеет значительно более низкое сродство к препарату и кинетика взаимодействия значительно быстрее, чем при инактивированном состоянии рецептора [8], то возникает необходимость предположить, что все эти три состояния характеризуются различными кинетическими константами. Предположение о сдвиге зависимости инактивации от потенциала выдвинуто потому, что блокированные каналы реагируют как если бы они находились при потенциале менее отрицательном, чем измеренный мембранный потенциал [1, 28].

Гипотеза модулированного средства рецепторов была сформулирована количественно в виде набора дифференциальных уравнений, описывающих взаимодействие препарата с каналом как функцию времени и мембранного потенциала [8]. Эта модель была проверена в нескольких лабораториях и успешно использовалась для объяснения действия многих антиаритмических препаратов в различных экспериментальных условиях [30, 32—63].

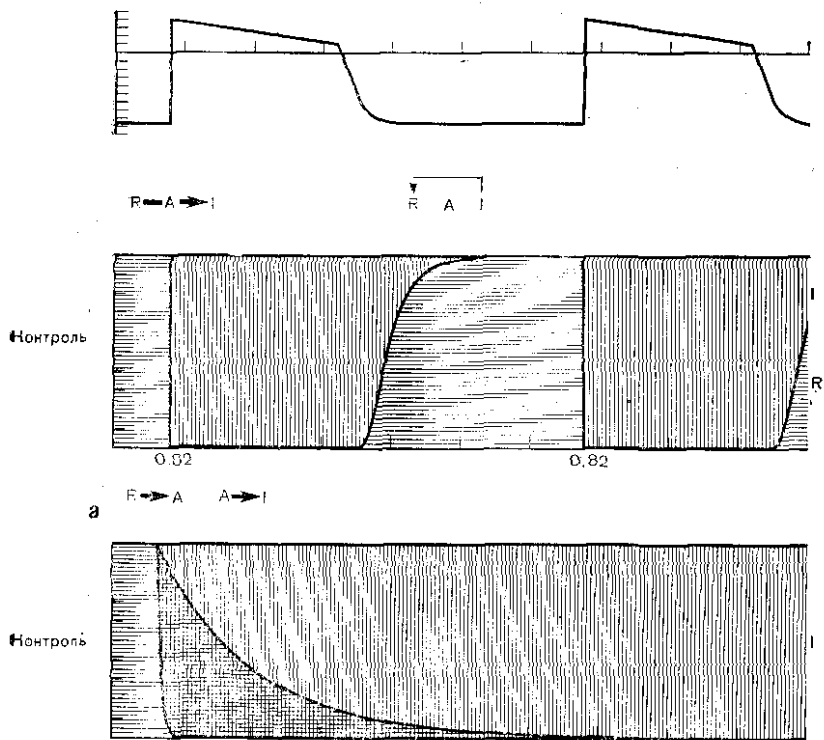
Для решения этой системы уравнений мы использовали лабораторный компьютер. Метод позволяет оценить по Ходжкину—Хаксли) долю каналов, находящихся в каждом из трех состояний, покоя, активированном и инактивированном, а также определить, какая часть каналов в данном состоянии связана с препаратом. Общее количество каналов принято за 1. Все оценки $\dot{V}_{\text{макс}}$, приведенные ниже, нормализованы в соответствии с этой величиной.

МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА С КАНАЛОМ, УЧИТЫВАЮЩИЙ СОСТОЯНИЕ КАНАЛА

Модель модуляции сродства рецепторов позволяет получить динамическую «движущуюся картину» состояния мембранных каналов — процесса, вызываемого физиологическими изменениями времени и потенциала, а также фармакологическим связыванием молекулы вещества с рецептором канала. Для демонстрации этих изменений на статических иллюстрациях мы объединили основную схему взаимодействия вещества с каналом, подчиняющуюся уравнениям Ходжкина — Хаксли (рис. 17.3, б), с полуколичественными графиками долей общего числа каналов, находящихся в различных состояниях, в зависимости от времени (рис. 17.4—17.8). На каждом графике показаны результаты, рассчитанные для одного или нескольких потенциалов действия, вызываемых стимуляцией после периода покоя, длительностью 20 с, на которых полное число каналов принято равным 1 (ордината), а доля каналов, находящихся в одном из трех состояний, обозначена разной штриховкой. Во всей серии рисунков каналы, находящиеся в состоянии покоя, отмечены горизонтальной штриховкой, активированные каналы — клеткой, а инактивированные — вертикальной штриховкой.

Штриховка тонкими линиями означает те каналы, с которыми препарат не связался, а более толстыми линиями заблокированные каналы.

На рис. 17.4 показано поведение модели в отсутствие препарата: применена кинетика Ходжкина — Хаксли. Когда на клеточной мембране поддерживается нормальный потенциал покоя (например — 85 мВ) все каналы находятся в состоянии покоя (горизонтальная штриховка тонкими линиями на рис. 17.4). При деполяризации каналы активируются, но состояние активации продолжается столь короткое время (менее 2 мс), что его невозможно показать на рис. 17.4, а. Этот переход на рис. 17.4, а обозначен над графиком в виде толстых стрелок от R (покой) через A (активация) к I (инактивация). Только при сильном увеличении временного масштаба можно увидеть момент нахождения канала в активированном состоянии (область в клетку на рис. 17.4, б). Хотя канал находится в активированном состоянии очень короткое время, но именно в этот момент через канал проходит ионный ток. Величина этого тока пропорциональна доле каналов, находящихся в активированном состоянии; если препарат имеет высокое сродство к каналу, находящемуся в активированном состоянии, то в течение этого времени может развиться существенная блокировка. Активированный канал быстро переходит в состояние инактивации (вертикальная штриховка тонкими линиями на рис. 17.4, а и б), в котором он находится в течение всей фазы плато. Во время реполяризации довольно быстро восстанавливается возбудимость каналов (переход вертикальной штриховки в горизонтальную, I в R на рис. 17.4, а).



- 6

Рис. 17.4. Моделирование переходов канала в различные состояния в отсутствие вещества.

В верхней части рисунка показаны два потенциала действия, вызванные стимуляцией с частотой 3,3 Гц после периода покоя (20 с). Метка по горизонтальной оси — 500 мс. а — распределение и переход каналов из одного состояния в другое во время описанных выше потенциалов действия; переход каналов из одного состояния в другое представлен над графиком ($R \rightarrow A \rightarrow I$). Можно видеть быстрый переход каналов из состояния покоя, через активацию в состояние инактивации, происходящей в течение фазы быстрой деполаризации первого потенциала действия. Толщина стрелки, соединяющей R с I отражает относительную скорость превращения одного состояния в другое. В течение фазы реполяризации первого потенциала действия происходит наиболее медленное восстановление каналов из состояния реактивации ($I \rightarrow R$). Приводится количественное описание переходов каналов. На рис. 17.4—17.8 горизонтальной штриховкой толстыми линиями обозначены не заблокированные веществом каналы в состоянии покоя, вертикальной штриховкой тонкими линиями — не заблокированные веществом каналы в состоянии инактивации. Сумма каналов, находящихся во всех трех состояниях, равна единице. а — при шкале времени 500 мс переход каналов из состояния покоя в состояние инактивации происходит так быстро, что активированные каналы можно выявить, только сильно растянув временную шкалу; б — переходы состояний во время фазы быстрой деполаризации первого потенциала действия при шкале времени — 2,4 мс; клеткой показана часть каналов, находящихся в открытом (активированном) состоянии. Максимальная величина натриевой проницаемости (нормированная к i), достигаемая во время фазы быстрой деполаризации каждого из этих двух потенциалов действия, равна 0,82, что указано под графиком на рис. а. Эта величина меньше единицы даже в отсутствие блокатора, так как часть каналов успевает инактивироваться за время, необходимое для открытия остальных каналов.

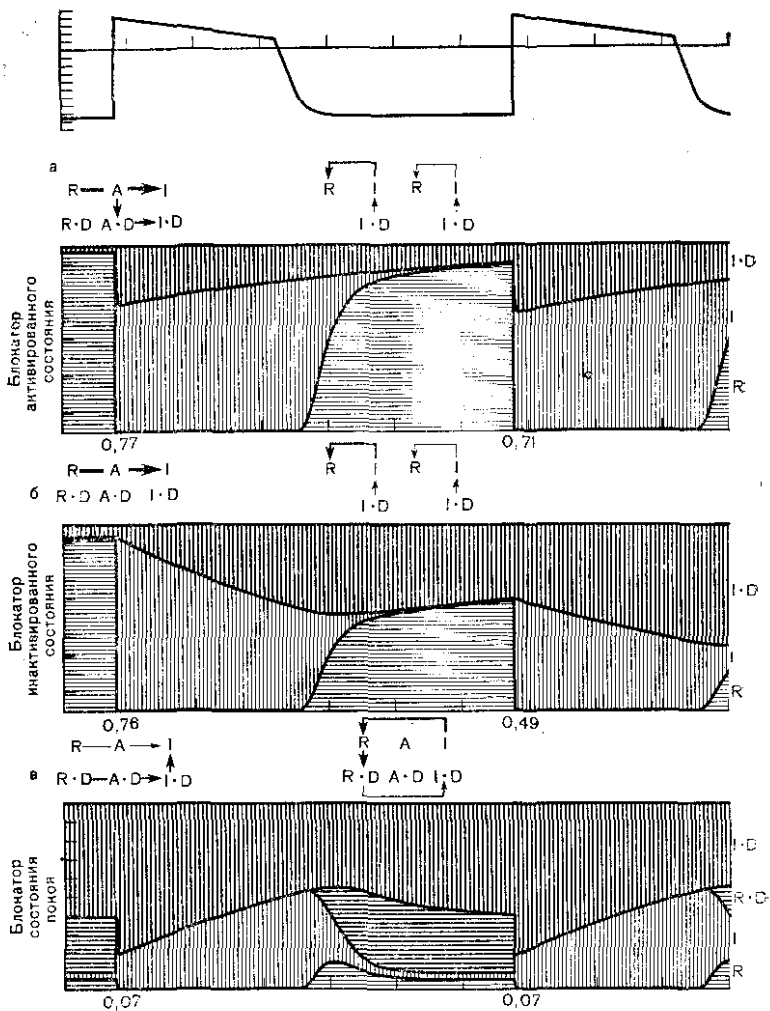


Рис. 17.5. Диаграммы состояний каналов при действии блокатора активированных каналов (а), блокатора инактивированных каналов (б) и блокатора покоящихся каналов (в).

Потенциалы действия, задаваемые компьютером (верхняя запись), и неблокируемые каналы (показаны горизонтальной штриховкой тонкими линиями) так же как и на рис. 17.4. Связанные с блокатором каналы, находящиеся в состоянии покоя ($R \cdot D$) (показаны вертикальной штриховкой толстыми линиями). Вертикально штриховкой толстыми линиями выделены блокированные каналы в состоянии активации ($I \cdot D$). Блокируемые каналы в состоянии активации ($A \rightarrow D$ не видны в графике вследствие плохого временного разрешения). Кинетические параметры для этих гипотетических препаратов взяты из табл. 17.1. (см. текст). а — блок развивается исключительно при активации, т. е. в течение фазы быстрого нарастания потенциала действия ($A \rightarrow AD$). В течение фазы плато и диастолы происходит освобождение каналов от блокатора ($I \rightarrow D \rightarrow I$). В зависимости от скорости диссоциации в промежутка времени до следующего потенциала действия, некоторые каналы могут оставаться блокированными к началу следующего потенциала действия, что приводит к уменьшению его $\dot{V}_{\text{макс}}$; б — при активации не происходит связывания блокатора с каналом, блокирование развивается в течение фазы плато потенциалом действия. Диссоциация происходит только во время диастолы. Так как в этом случае в течение потенциала действия достигается более высокий уровень блокировки, а на восстановление остается меньше времени, то на рис. б наблюдается

Следствие разного сродства при разных состояниях

Для того чтобы показать значение изменения сродства в зависимости от состояния канала, мы сначала рассмотрели набор из трех гипотетических препаратов (табл. 17.1) с высоким срод-

Таблица 17.1. Кинетические параметры для гипотетических препаратов, действие которых показано на рис. 17.4—17.8

Кинетические константы выбраны таким образом, чтобы обеспечить высокое (1 мкМ) и низкое (1 мМ) сродство и реальные постоянные времена: для каждого вещества. Постоянные времена рассчитаны по формуле: $1/(k \cdot \text{доза} + l)$; константы диссоциации: $K_d = 1/k \cdot \text{доза}$ (8).

Состояние канала	Кинетические константы				Постоянная времени (мс) для концентрации препарата 10^{-5} М
	высокое сродство $K_d = 10^{-6}$ М		низкое сродство $K_d = 10^{-3}$ М		
	k (мс $^{-1}$ М $^{-1}$)	l (мс $^{-1}$)	k (мс $^{-1}$ М $^{-1}$)	l (мс $^{-1}$)	
Покой	10^4	10^{-2}	10^2	10^{-1}	~ 10
Активация	$1,5 \times 10^5$	0,15	$1,5 \times 10^3$	1,5	$\sim 0,6$
Инактивация	4×10^2	4×10^{-4}	4,0	4×10^{-3}	~ 230

Пример: гипотетический препарат с наибольшим сродством к активированному каналу можно получить, если использовать высокоаффинные кинетические константы для состояния активации ($1,5 \times 10^5$ и 0,15) и низкоаффинные кинетические константы для состояния покоя и инактивации (10^2 , 10^{-1} , $4,4 \times 10^{-3}$ соответственно).

сством к одному из состояний канала (малая константа диссоциации, $K_d = 10^{-6}$ М) и низким сродством к двум другим состояниям (большая константа диссоциации, $K_d = 10^{-3}$ М). Кинетические константы k и l выбраны таким образом, чтобы K_d соответствовала требуемой величине, а постоянные времена находились в диапазоне, соответствующем реальным препаратам. Для получения реальной степени блокирования канала предположили, что связывание препарата с каналом вызывает сдвиг инактивации на 25 мВ в сторону гиперполяризации. Это означает, что каналы, с рецепторами которых связался препарат, реагируют как если бы мембранный потенциал был для них на 25 мВ менее отрицательным, чем измеряемый. Эффект такого сдвига по оси потенциалов рассматривается ниже.

Действие гипотетического препарата с наибольшим сродством к рецептору канала, находящегося в активированном состоянии.

существенное снижение $\dot{V}_{\text{макс}}$ с 0,76 до 0,49. На рис. в большая часть находящихся в состоянии покоя каналов блокирована, т. е. очень небольшое число каналов способно пропустить ток во время активации, поэтому амплитуда $\dot{V}_{\text{макс}}$ очень низка (0,07) уже для первого потенциала действия. Блокатор покидает канал только во время фазы плато, т. е. когда они инактивированы. Следовательно, каналы либо блокированы, либо инактивированы, но ни в том, ни в другом случае они не способны проводить натриевый ток.

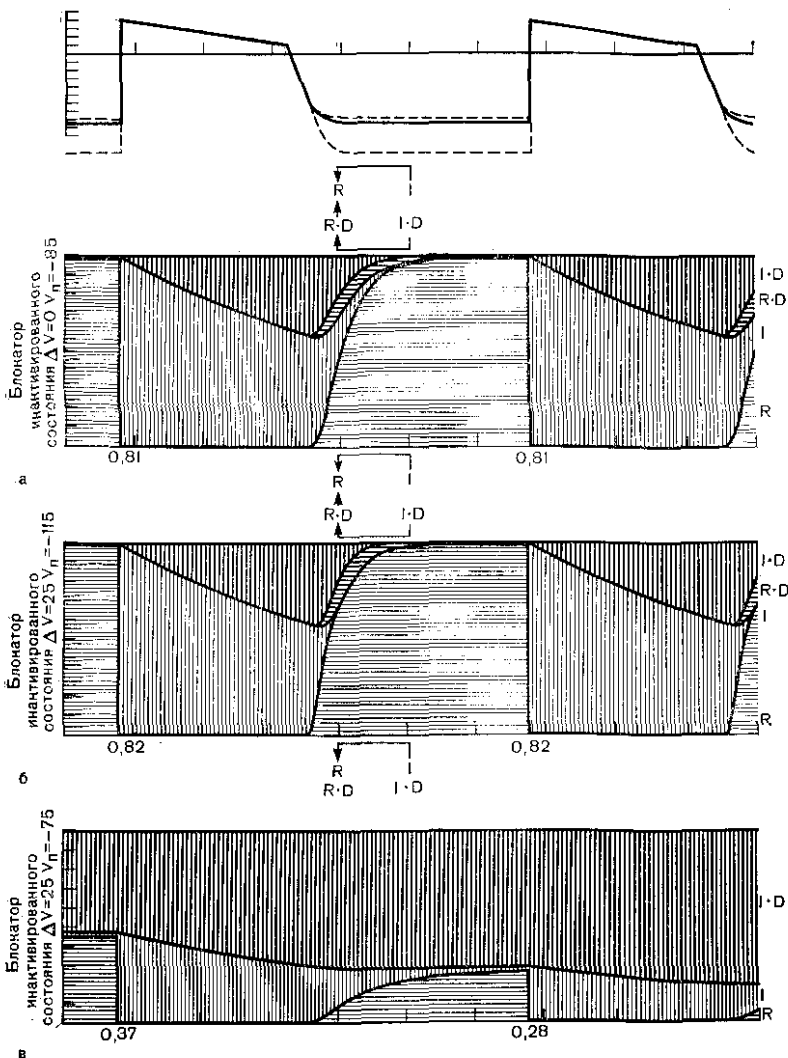


Рис. 17.6. Влияние отказа от сдвига зависимости инактивации от потенциала (а), гиперполяризации мембраны (б) и деполяризации (в) на диаграмму состояний каналов. За исключением описанных выше изменений потенциалозависимых параметров, все остальные условия те же, что и на рис. 17.5, б.

а — отсутствие сдвига потенциала позволяет каналам выходить из состояния I·D во время реполяризации двумя путями: медленный переход I·D в I и более быстрый переход I·D в R·D. Так как последний путь во много раз быстрее, большая часть каналов, находящихся в состоянии I·D быстро освобождаются от блокатора, переходя из R·D в R, а путь из I·D в I становится малозначимым; б — тот же самый результат, полученный с учетом сдвига потенциала, но при гиперполяризации до -115 мВ; в — клеточная мембрана в покое слегка деполяризована. Деполяризация подчеркивает важность сдвига потенциала, так как еще больше перекрывает быстрый путь I·D в R·D, а также повышает вероятность состояния I, что в свою очередь также усиливает блок проводимости (сравните с рис. 17.5, а). Сравнение диаграмм (б) (в) ясно показывает, каким образом антиаритмический препарат способен селективно блокировать патриевую проводимость в деполяризованной ткани.

Как показано на рис. 17.5, а, в течение длительного периода покоя практически все каналы переходят в состояние покоя и не блокированы препаратом (горизонтальная штриховка тонкими линиями), так как ни рецепторы каналов, находящихся в инактивированном состоянии, ни рецепторы каналов в покое не обладают достаточным сродством к препарату. Во время быстрого нарастания потенциала действия (при активации каналов) сродство увеличивается в 1000 раз и около 30% рецепторов каналов связываются с препаратом. Такой сдвиг от А к А·D (указанный над графиком на рис. 17.5, а) не отражается на графике, так как он происходит очень быстро, но результат этого процесса — резкое повышение количества заблокированных каналов в инактивированном состоянии (I·D вертикальная штриховка толстыми линиями на графике) — проявляется немедленно. Предполагаемая величина V_{\max} для первого после паузы потенциала действия равна 0,77, что не намного меньше контрольной (0,82) (см. рис. 17.4), так как очень небольшое число каналов попадает в пул I·D во время покоя или блокируется в течение первой части фазы быстрого нарастания потенциала действия до достижения V_{\max} . В течение последующей фазы плато каналы перераспределяются между пулами I и I·D (указано под графиком на рис. 17.5, а); так как сродство препарата к инактивированному каналу низко, то каналы, находящиеся в I·D-пуле, медленно экспоненциально переходят в I-пул. В конце фазы плато первого потенциала действия происходит быстрый переход инактивированных каналов, не связанных с препаратом, в состояние с восстановленной возбудимостью (R-пул, горизонтальная штриховка тонкими линиями), по мере того как потенциал на мембране возвращается к уровню потенциала покоя. Однако заблокированные каналы (I·D-пул, показан вертикальной штриховкой толстыми линиями) не возвращаются в состояние покоя, так как сдвиг потенциала, возникающий при связывании с препаратом, заставляет их реагировать как при потенциале на 25 мВ более положительном, т. е. при -65 мВ вместо -85 мВ. Во время второго потенциала действия 30% из оставшихся незаблокированных каналов попадает в I·D-пул. В ритмическом ряду потенциалов действия этот процесс будет каждый раз повторяться до достижения установившегося уровня блокирования, в данном случае $V_{\max} = 0,70$.

Действие гипотетического препарата с наибольшим сродством к рецептору канала, находящегося в инактивированном состоянии. Связывание гипотетического вещества с рецептором в основном происходит в течение фазы плато потенциала действия, а не во время быстрой деполяризации. На рис. 17.5, б это отражено на схеме перехода каналов из одного пула в другой, помещенной над графиком, а также на самом графике — увеличением пула I·D, вертикальная штриховка толстыми линиями. Реполяризация в конце фазы плато обращает этот процесс: незаблокированные инактивированные каналы (вертикальная штриховка тонкими линиями) быстро переходят в состояние покоя (горизонтальная штри-

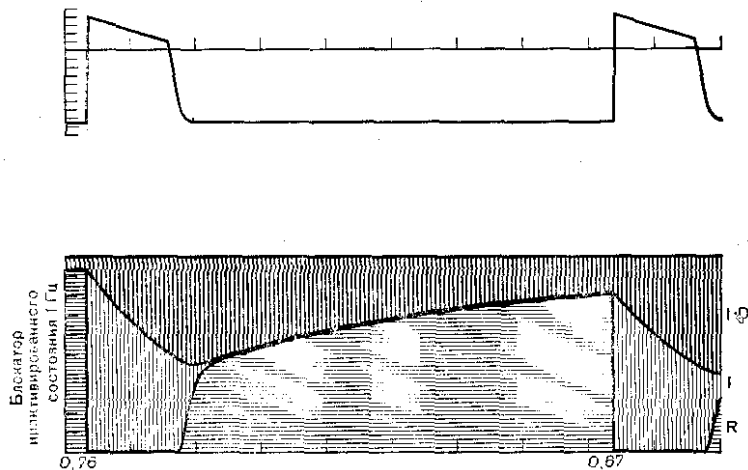


Рис. 17.7. Действие блокатора инактивированных каналов при частоте 1 Гц. Все параметры на этом рисунке идентичны таковым на рис. 17.5, б, за исключением того, что частота стимуляции снижена с 3,3 до 1 Гц, и метки по горизонтальной оси соответствуют 1,25 с. Поэтому в течение фазы плато первого потенциала действия блокирование достигает того же уровня, что и на рис. 17.5, б. При реполяризации освобождение каналов от блокатора происходит с той же скоростью, но вследствие большей величины межстимуляционного интервала освобождение продолжается дольше, и поэтому достигается более высокий уровень восстановления возбудимости. В результате этого скорость нарастания второго потенциала действия оказывается равной 0,67 с вместо 0,49 с на рис. 17.5, б.

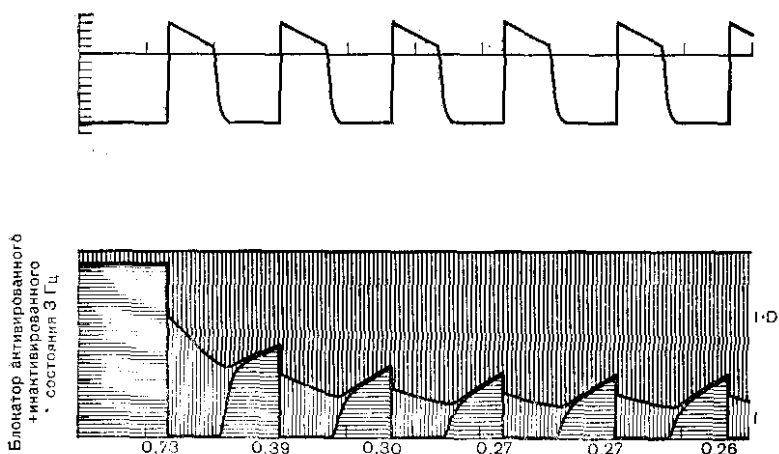


Рис. 17.8. Кумулятивный блок натриевых каналов препаратом, имеющим высокое сродство как к активированным, так и к инактивированным каналам. В верхней части рисунка приведена запись серии потенциалов действия с частотой следования 3,3 Гц (метки по горизонтали — 18 с). Обратите внимание на увеличение блока при каждой активации, а также в течение фазы плато (состояние инактивации). Так как низким сродством к препарату обладает только канал, находящийся в состоянии покоя, то восстановление возбудимости происходит только при отрицательном потенциале на мембране, т. е. когда он приближается к потенциалу покоя.

ховка тонкими линиями). Однако заблокированные инактивированные каналы (вертикальная штриховка толстыми линиями) находятся в состоянии как бы при потенциале -60 мВ (в результате сдвига зависимости от потенциала) и, следовательно, их реактивации не происходит, т. е. они не переходят в состояние R·D. Вместо этого наблюдается медленное освобождение этих каналов от вещества с постоянной времени, соответствующей реакции I←I·D. В результате $\dot{V}_{\text{макс}}$ второго потенциала действия (0,49) сильно уменьшается по сравнению с $\dot{V}_{\text{макс}}$ первого потенциала (0,76). Рассчитанный установившийся уровень $\dot{V}_{\text{макс}}$ в ритмическом ряду стимуляции в таких условиях равен 0,33. Обратите внимание, что восстановление проводимости каналов, т. е. освобождение их рецепторов от молекул препарата, происходит только в течение диастолического интервала. Следовательно, установившийся уровень блока под действием вещества, обладающего высоким средством к инактивированному состоянию, будет зависеть от отношения длительности потенциала действия к величине диастолического интервала. Однако блокирование каналов веществом, имеющим высокое средство к активированному каналу (рис. 17.5, а), снижается как во время фазы плато, так и в течение диастолы, поэтому на величину установившегося блока будет влиять частота возбуждений, но не длительность потенциала действия.

Действие препарата с наибольшим средством к рецептору канала, находящегося в состоянии покоя. Как показано на рис. 17.5, в, вещество с такими характеристиками свяжется со значительной долей каналов, находящихся в состоянии покоя (горизонтальная штриховка толстыми линиями). Однако вследствие наличия сдвига зависимости инактивации от потенциала большая часть этих каналов перейдет в инактивированное заблокированное состояние (I·D), поэтому на графике преобладают области, заштрихованные горизонтальными и вертикальными толстыми линиями. Соответственно $\dot{V}_{\text{макс}}$ первого после длительной паузы потенциала действия будет снижена в наибольшей степени, в то время как $\dot{V}_{\text{макс}}$ второго потенциала действия остается без изменений. Теоретически можно снизить число каналов, заблокированных таким препаратом, при стимуляции с очень высокой частотой (для укорочения диастолического интервала). Таким образом, препарат с высоким средством к каналам, находящимся в состоянии покоя, действует как сердечный яд, угнетающий электрогенез в нормальной клетке в покое, вместо того чтобы селективно угнетать электрическую активность в аномальных клетках. Такие препараты в этой главе рассматриваться не будут.

Зависимость блокирования каналов от потенциала

Ниже приводятся сравнительные данные для препарата, блокирующего канал, находящийся в состоянии инактивации (см. рис. 17.5, б). Аналогичное сравнение можно провести и для препарата, блокирующего активированный канал.

Значение сдвига зависимости инактивации от потенциала под

действием препарата. Гипотетические препараты, описанные ранее (см. рис. 17.5), вызывают сдвиг потенциала. Значение такого сдвига можно оценить, сравнивая рис. 17.6, а и рис. 17.6, в. Гипотетический препарат, модель действия которого показана на рис. 17.6, а, отличается от препарата, действие которого показано на рис. 17.5, б, только тем, что не вызывает сдвига зависимости от потенциала. Поэтому, как и ранее, каналы связывают препарат, находясь в инактивированном состоянии, и постепенно накапливаются в I·D-пуле. Однако в отличие от препарата, действие которого показано на рис. 17.5, б, каналы на рис. 17.6, а могут покидать I·D-пул во время диастолы двумя путями: в результате относительно быстрого восстановления из состояния инактивации, согласно кинетическому уравнению Ходжкина—Хаксли ($I \cdot D \rightarrow R \cdot D$), а также вследствие относительно более медленного освобождения каналов от вещества ($I \cdot D \rightarrow I$). Так как реакция $R \cdot D \rightarrow R$ осуществляется относительно быстро, то восстановление проводимости каналов в результате диссоциации препарата происходит за короткое время. Следовательно, в отсутствие сдвига потенциала даже короткого диастолического интервала оказывается достаточно для снятия блокировки со всех каналов и отсутствия какого-либо ее накопления в ритмическом ряду: $V_{\text{макс}}$ второго потенциала действия не отличается от $V_{\text{макс}}$ первого.

Значение потенциала покоя мембраны. Легко показать, что даже если препарат вызывает значительный сдвиг зависимости инактивации от потенциала (например, 25 мВ на рис. 17.5, б), но гиперполяризация достаточна по величине (например, от -85 мВ до -115 мВ (на рис. 17.6, б), то имеется возможность преодоления последствия сдвига на 25 мВ переводом каналов из состояния I·D в состояние покоя ($I \cdot D \rightarrow R \cdot D$), а затем происходит быстрое восстановление проводимости каналов ($R \cdot D \rightarrow R$). И наоборот, если потенциал покоя немного уменьшен (например до -75 мВ), то это заметно потенцирует кумулятивную блокаду, увеличивая число каналов, захватываемых в состоянии I·D. Этот эффект показан на рис. 17.6, в для того же гипотетического препарата, блокирующего каналы в инактивированном состоянии, действие которого показано на рис. 17.5, б. Обратите внимание, что $V_{\text{макс}}$ первого потенциала действия значительно более сильно ингибирована в деполяризованной ткани, а стимуляция в ритмическом ряду вызывает еще большую блокировку. Ожидаемая установившаяся величина $V_{\text{макс}}$ для деполяризованной клетки, показанной на рис. 17.6, в, равна 0,13 по сравнению с 0,33 для клетки показанной на рис. 17.5, б.

Зависящие от времени аспекты блокирования рецепторов

На рис. 17.5, а, б уже было показано, что приращение блокирования в ритмическом ряду потенциалов действия ограничивается степенью восстановления проводимости, происходящего между периодами, когда рецептор имеет максимальное сродство к

препарату. Поэтому установившийся уровень блока при низкой частоте возбуждений миокарда (все другие факторы не изменяются) будет меньше, чем при высокой частоте. На рис. 17.7 показаны два первых потенциала действия в серии потенциалов, возбуждающихся с частотой 1 Гц при действии того же самого препарата, блокирующего инактивированные каналы, действие которого отражено на рис. 17.7, б при частоте 3,3 Гц. Для 1 Гц полагаемый установившийся уровень $\dot{V}_{\text{макс}}$ равен 0,66 по сравнению с $\dot{V}_{\text{макс}}=0,33$, полагаемый для 3,3 Гц. Аналогичный анализ действия препаратов на ранние экстрвозбуждения показывает, что $\dot{V}_{\text{макс}}$ таких потенциалов действия угнетается в большей степени, чем $\dot{V}_{\text{макс}}$ предшествующего потенциала в ритмическом ряду, как при использовании препаратов, блокирующих активированные каналы, так и блокирующих каналы в состоянии инактивации. Чем раньше возникает экстрвозбуждение, тем меньше времени остается на восстановление возбудимости и поэтому входящий ток угнетается в большей степени.

При непрерывной стимуляции с постоянной частотой $\dot{V}_{\text{макс}}$ может приближаться к установившемуся значению либо быстро, либо медленно в зависимости от постоянных времени взаимодействия вещества с каналом. Этот вопрос более подробно обсуждался в одной из предыдущих публикаций [30]. Как было показано на рис. 17.8, гипотетический препарат, обладающий высоким средством к рецептору канала, находящегося как в состоянии активации, так и в состоянии инактивации, и при постоянных временах, приведенных в табл. 17.1, вызывает установившееся блокирование через 5—8 циклов.

Влияние формы потенциала действия на блокирование рецептора с модуляцией средства

Некоторые антиаритмические препараты (например, хинидин) одинаково эффективно угнетают $\dot{V}_{\text{макс}}$ в предсердных клетках, в проводящих сердечных миоцитах и в клетках желудочков, в то время как другие значительно слабее действуют на клетки предсердий (например, лидокаин) [64]. Гипотеза модуляции средства рецепторов дает механическое объяснение этих результатов, основанное на том, что длительность фазы плато потенциала действия предсердных клеток меньше таковой у проводящих сердечных миоцитов или рабочих кардиомиоцитах желудочков.

Из рис. 17.5, а видно, что изменение длительности потенциала действия на 50% незначительно влияет на угнетение $\dot{V}_{\text{макс}}$ второго потенциала действия в показанной серии (при неизменной частоте стимуляции), так как восстановление возбудимости каналов происходит с одной и той же скоростью, как в течение фазы плато, так и во время диастолы. Следовательно, если вещество имеет высокое средство только к активированному каналу, оно будет оказывать одно и то же действие независимо от длительности потенциала действия, т. е. один и тот же эффект будет на-

блюдаются как в клетках предсердий, так и в проводимых сердечных миоцитах или клетках желудочков.

Препарат с высоким сродством к инактивированному состоянию канала (см. рис. 17.5, б), наоборот, будет оказывать значительно большее влияние на клетки, потенциал действия которых имеет длинную фазу плато, чем на клетки с коротким плато, так как во время этой фазы такой препарат будет продолжать связываться с каналами и во время плато, а освобождение каналов от препарата будет происходить только во время диастолы.

В табл. 17.2 приведен предполагаемый установившийся уровень блокирования \dot{V}_{\max} двумя гипотетическими препаратами

Таблица 17.2. Связь между длительностью потенциала действия и угнетением установившегося уровня \dot{V}_{\max} , вызванным блокатором активированных каналов или блокатором инактивированных каналов

Препарат *	\dot{V}_{\max} при длительности ПД					
	20	50	100	150	200	300 мс **
Блокатор активированных каналов	0,71	0,71	0,70	0,70	0,69	0,58
Блокатор инактивированных каналов	0,64	0,56	0,45	0,35	0,26	0,08

* Кинетические параметры взяты из табл. 17.1. Частота следования потенциалов действия 3.3 Гц. Нормализованная величина \dot{V}_{\max} в отсутствие блокатора равна 0,82.

** Длительность потенциала действия измерялась на уровне 100% реполяризации.

(блокатором активированных каналов и блокатором инактивированных каналов) в зависимости от продолжительности потенциала действия. Обратите внимание, что в рассматриваемом диапазоне снижение \dot{V}_{\max} , вызываемое препаратом, блокирующим активированные каналы (от 0,71 до 0,58), значительно меньше такового при действии блокатора инактивированных каналов (от 0,64 до 0,08). Так как продолжительность плато потенциала действия предсердных клеток обычно составляет 50 мс или меньше, в то время как у проводящих сердечных миоцитов она равна более 200 мс, очевидно, что препарат, обладающий высоким сродством только к инактивированным каналам, будет оказывать значительно большее действие на последние.

ДЕЙСТВИЕ РЕАЛЬНЫХ АНТИАРИТМИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Применение препарата, блокирующего входящий натриевый ток, будет полезным в клинической практике только в том случае, если он имеет существенное сродство к каналам, находящимся в

состоянии активации или инактивации (или к обоим состояниям), но не к каналу в состоянии покоя.

Следовательно, любая имеющая смысл классификация антиаритмических препаратов — блокаторов натриевых каналов — должна основываться на некотором показателе их сродства к каналу, например, на константах диссоциации для каждого из трех состояний канала. Для получения таких данных необходимо использование экспериментальных методов, позволяющих управлять продолжительностью нахождения канала в каждом из этих трех состояний независимо от задания потенциала на мембране. Очевидно, что наилучшим методом, позволяющим достичь такого управления, является метод фиксации потенциала. Но вследствие технических трудностей фиксации потенциала в миокардиальных препаратах в настоящее время имеются лишь некоторые данные только для небольшого числа антиаритмических средств: хинидина [30, 56, 56, 62], лидокаина [30, 32, 56, 63, 65], прокаинамида [56, 65], амиодарона [66] и априндина [65]. Нет также полного набора данных и для блокаторов кальциевых каналов: они получены только для верапамила и его аналога Д-600 [38, 67, 68], дилтиазема [68, 69] и нифеидипина [70, 71]. Следовательно, приведенное ниже описание результатов моделирования носит предварительный характер.

Механизм модуляции сродства рецепторов для объяснения действия блокаторов натриевых каналов

Из всех исследованных нами препаратов, блокирующих натриевые каналы, по-видимому, наиболее четко выраженным средством к инактивированному состоянию имеет амиодарон. Это доказывается с помощью следующих данных: серия коротких ступенек потенциала до уровня фазы плато, поданная с высокой частотой, практически не вызывает блокирования натриевых каналов (рис. 17.9, а). Однако единственная ступенька потенциала до уровня плато, имеющая большую длительность, приводит к экспоненциальному развитию блокирования (рис. 17.9, б). При подаче ступенек потенциала до потенциалов в диапазоне фазы плато (от -20 мВ до $+40$ мВ) не было обнаружено никакой зависимости блокирования натриевых каналов амиодароном от потенциала [66].

Аналогичные исследования были проведены для лидокаина и ряда его аналогов [65]. Было изучено [32] действие лидокаина на проводящие сердечные миоциты кролика с помощью настоящего метода фиксации потенциала. В обоих исследованиях получены убедительные доказательства преимущественного блокирования лидокаином инактивированных каналов. Показано также, что высоким сродством к состоянию инактивации характеризуется действие априндина и ряда его аналогов [72]. Однако и лидокаин, и априндин, обладают, по-видимому, более высоким сродством к рецептору активированного канала, чем амиодарон. Хинидин, вероятно, также имеет некоторое сродство к инактивированному каналу, но оно недостаточно для объяснения всего наблюдаемого

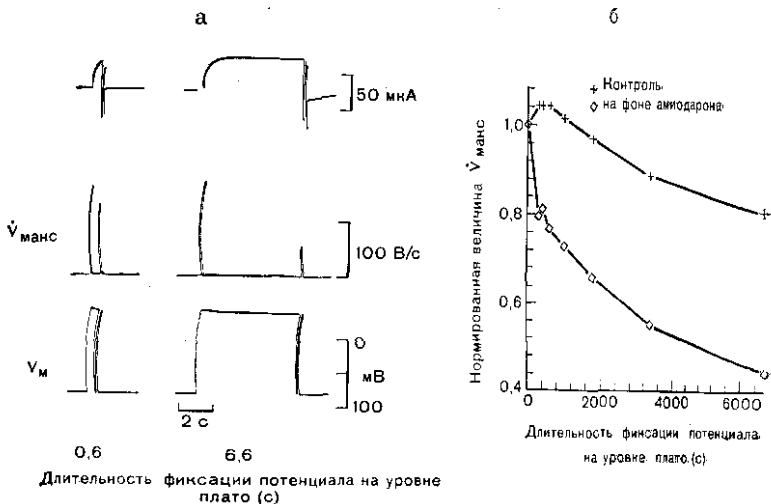


Рис. 17.9. Блокирование инактивированных каналов амиодароном ($8,8 \times 10^{-5}$ M) в зависимости от длительности деполяризующей ступеньки.

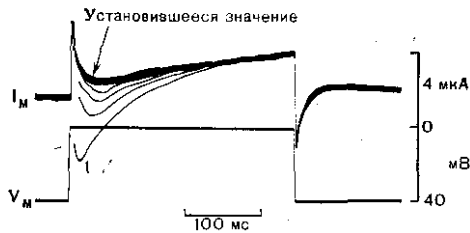
а — действие амиодарона. Показаны записи тока (вверху), \dot{V}_{\max} (в центре) и внутриклеточного потенциала (внизу), зарегистрированные во время воздействия тестирующей ступеньки тока, перед которой подавали кондиционирующую ступеньку до уровня +28 мВ и длительностью 600 мс (слева) или 6600 мс (справа). При применении короткой кондиционирующей ступеньки наблюдали умеренное угнетение \dot{V}_{\max} в ответ на действие тестирующей ступеньки, а при использовании длинной кондиционирующей ступеньки \dot{V}_{\max} угнеталась значительно сильнее; б — изменения \dot{V}_{\max} в этом эксперименте, нормированной на контрольные величины, в зависимости от длительности кондиционирующей ступеньки на фоне амиодарона и без него.

блока натриевых каналов в серии возбуждений [30, 62]. Было бы весьма заманчиво предположить, что «дополнительный» блок, развивающийся во время каждого потенциала действия, связан с блокированием активированного состояния канала. Таким образом, большинство используемых в настоящее время в клинике лекарственных препаратов оказывают смешанное действие: на активированные и на инактивированные каналы. На рис. 17.8 было показано действие такого препарата с высоким сродством как к активированному, так и инактивированному состоянию.

Механизм модуляции сродства рецепторов для объяснения действия органических блокаторов кальциевых каналов

Показано [67], что блокирование медленного входящего (кальциевого) тока верапамилом в значительной степени зависит от частоты возбуждения, а восстановление проводимости при освобождении каналов — от потенциала. Установлено [88], что D-600 также характеризуется аналогичным зависимым от возбуждения действием, и восстановление также зависит от потенциала. Полученные в этих исследованиях результаты действия дилтиазема также выявили зависимость блока от стимуляции (рис. 17.10);

Рис. 17.10. Влияние дилтиазема (4,4 мкМ) на медленный входящий ток (I_M) папиллярной мышцы хорька в условиях фиксации потенциала. Запись получена через 30 мин после начала действия вещества.



1 — амплитуда тока в ответ на действие первой ступеньки потенциала в последовательности ступенек, подаваемой после периода покоя, продолжительностью несколько минут. Частота 2 Гц. Наложены регистрации тока при первых 20 ступеньках. Обратите внимание на быстрое уменьшение амплитуды тока до установившегося значения (УЗ) в ритмическом ряду.

более того, его сродство к инактивированным каналам оказалось значительно выше, чем к открытым (активированным) каналам [68].

Нифедипин, очень эффективный блокатор кальциевых каналов, мало пригодный для клинических целей [73], по-видимому, имеет значительно меньшую зависимость блокирования от возбуждения [71], что говорит о его возможном высоком сродстве к каналу в состоянии покоя. Эти наблюдения были позже подтверждены при сравнении отрицательных инотропных эффектов верапамила и нифедипина. Отрицательное инотропное действие верапамила значительно зависело от частоты возбуждения, так что происходила реверсия обычной положительной связи силы сокращения с частотой стимуляции [74]. Этот эффект также зависел от потенциала [75]. Нифедипин, наоборот, оказывал отрицательное инотропное действие, которое относительно мало зависело от частоты стимуляции [76]. К сожалению, имеется мало данных относительно кинетики действия нифедипина на медленный входящий ток, полученных методом фиксации потенциала.

Нифедипин, очень эффективный блокатор кальциевых каналов, мало пригодный для клинических целей [73], по-видимому, имеет значительно меньшую зависимость блокирования от возбуждения [71], что говорит о его возможном высоком сродстве к каналу в состоянии покоя. Эти наблюдения были позже подтверждены при сравнении отрицательных инотропных эффектов верапамила и нифедипина. Отрицательное инотропное действие верапамила значительно зависело от частоты возбуждения, так что происходила реверсия обычной положительной связи силы сокращения с частотой стимуляции [74]. Этот эффект также зависел от потенциала [75]. Нифедипин, наоборот, оказывал отрицательное инотропное действие, которое относительно мало зависело от частоты стимуляции [76]. К сожалению, имеется мало данных относительно кинетики действия нифедипина на медленный входящий ток, полученных методом фиксации потенциала.

КОРРЕЛЯЦИЯ С КЛИНИЧЕСКИМИ ДАННЫМИ

Пока еще невозможно точно предвидеть, какой препарат наиболее эффективен при нарушении ритма сердца у данного больного, но уже можно определить, будет ли новое соединение полезным для лечения предсердных нарушений ритма, а также объяснить, почему изученные препараты более эффективны при одних типах нарушений ритма, чем при других.

Предсердная тахикардия

Потенциал действия обычной миокардиальной клетки предсердий характеризуется короткой фазой плато, которая еще более уменьшается при тахикардии. Следовательно, блокаторы инактивированных каналов будут вызывать относительно меньшее блокирование натриевых каналов в ткани предсердий. Если такой блокатор, например, лидокаин или фентоин инактивированных каналов, относительно быстро диссоциирует во время диастолы, то он будет малоэффективен при предсердной тахикардии. Если же

восстановление проводимости во время диастолы замедлено вследствие деполяризации (например, в случае интоксикации дигиталисом), то будет расти число каналов, заблокированных в состоянии инактивации, и можно ожидать, что эффективность препарата будет более высокой. Это позволяет объяснить клинические данные о невысокой эффективности лидокаина в случае предсердных аритмий, за исключением вызванных интоксикацией сердечными гликозидами [64]. Важно отметить, что амиодарон, который, по-видимому, взаимодействует исключительно с инактивированными каналами, тем не менее более благоприятен при терапии предсердных аритмий, чем лидокаин [77]. Это можно объяснить несколькими причинами. Амиодарон медленнее освобождается от канала во время диастолы. Более того, амиодарон увеличивает продолжительность потенциала действия, способствуя, таким образом, блокированию инактивированных каналов. Наконец, амиодарон оказывает дополнительное действие, включая блокирование входа кальция и антиадренергическое.

Эффективность хинидина повышается при увеличении числа потенциалов действия, возникающих в единицу времени [30], в то время как продолжительность потенциала действия относительно менее важна в определении доли заблокированных каналов. Постоянная времени восстановления проводимости вследствие диссоциации хинидина в фазе диастолы относительно низка, поэтому со временем число заблокированных каналов увеличивается, особенно при высокой частоте стимуляции; следовательно, хинидин будет эффективен при предсердных тахикардиях.

Нарушения ритма, связанные с АВ-узлом

Существует множество состояний миокарда, когда медленное проведение возбуждения по АВ-узлу принимает участие в развитии рециркуляторных аритмий. Так как основным входящим током в клетках АВ-узлов является кальциевый ток [78], то не удивительно, что при таких нарушениях ритма высокую эффективность имеют блокаторы входа кальция. Подобно большинству блокаторов натриевых каналов эти препараты обладают высоким сродством к деполяризованным (т. е. инактивированным) каналам. Восстановление их проводимости происходит медленнее в деполяризованных клетках и быстрее в клетках с более отрицательным потенциалом [38]. Следовательно, при рециркуляторных аритмиях, имеющих дополнительные пути проведения, такие препараты обычно блокируют проведение, определяемое кальциевым током, особенно, если оно осуществляется по деполяризованным клеткам. Поэтому более высока вероятность блокирования проведения по АВ-узлу, чем по дополнительному пути.

Желудочковые нарушения ритма

Клетки рабочего миокарда желудочков и проводящие сердечные миоциты имеют длинный потенциал действия, поэтому для таких клеток значительно большее значение имеет блокирование

инактивированных каналов, чем в ткани предсердий. Другой важной чертой нормальных клеток желудочков и не обладающих пейсмекерной активностью проводящих сердечных миоцитов является довольно отрицательная величина диастолического потенциала (от -85 до 90 мВ). Поэтому, хотя лидокаин блокирует значительную часть натриевых каналов за время фазы плато каждого потенциала действия, быстрое восстановление проводимости в фазе диастолы (при -90 мВ) приводит к тому, что к моменту развития следующего потенциала действия в ритмическом ряду большая часть каналов оказывается уже не заблокированной. Однако существует два исключения: а) сильно угнетается $V_{\text{макс}}$ ранних экстравозбуждений, возникающих раньше чем успевают распастыся комплексы препарата с рецептором канала; б) в деполяризованной вследствие заболевания ткани восстановление проводимости происходит значительно медленнее, если вообще происходит (сравните рис. 17.5, б и 17.6, в). Поэтому в деполяризованной ткани и особенно в случае ранних экстравозбуждений каналы будут в значительной степени заблокированы при концентрациях лидокаина, практически не влияющих на проведение нормального синусового возбуждения по здоровой ткани.

Другие клинические аспекты

Как было установлено в одной из ранних работ [30], комбинированное применение двух антиаритмических препаратов с различными кинетическими свойствами может оказаться более эффективным, чем использование любого из этих двух препаратов в отдельности, независимо от дозы. В результате клинической проверки этого утверждения было показано [81], что при нарушениях ритма, резистентных как к диэтиламиду, так и к мекситилу, вводимых по отдельности, аритмию удалось купировать в результате комбинированного применения этих двух препаратов, обладающих разными свойствами.

Другое предположение о взаимодействии препаратов основано на модели, учитывающей состояния канала. Если препарат А увеличивает длительность потенциала действия, а препарат Б является блокатором инактивированного канала, при любой частоте возбуждений препарат А будет увеличивать продолжительность развития блокирования инактивированных каналов и уменьшать время, в течение которого происходит восстановление проводимости. Например, амиодарон удлиняет потенциал действия и поэтому усиливает свое действие (см. выше), а также действие любого другого блокатора инактивированных каналов, например, лидокаина. И наоборот, препарат, укорачивающий потенциал действия (например, ацетилхолин в ткани предсердий), будет вероятнее всего угнетать действие блокатора инактивированных каналов. Аналогично этому, если некоторый препарат надежно и безопасно уменьшает длительность потенциала действия в проводящих сердечных миоцитах или клетках желудочков, то он может ока-

заться полезным для восстановления проводимости блокатора инактивированных каналов.

На данной стадии разработки гипотезы модуляции средства рецепторов было бы преждевременно широко использовать ее для отбора лекарственных препаратов с целью использования в клинике. Необходимо получить больше подтверждений относительно клеточной физиологии миокардиальной ткани, ответственной за возникновение аномального автоматизма. Особую ценность представляют данные о потенциале покоя клеток *in vivo*. К сожалению, этот показатель труднее всего определить у больных.

З а к л ю ч е н и е

Мы обсудили гипотезу модуляции средства рецептора в применении к блокаторам натриевых и кальциевых каналов и использовали ее для объяснения механизма действия лекарств различных типов, используемых при лечении аритмий. Модель позволяет сформулировать механизм селективного угнетения аномальной электрической активности при действии антиаритмических препаратов. Чем лучше будет понята зависимость действия антиаритмического препарата от потенциала и времени, тем более рациональным будет отбор препарата для лечения нарушения ритма определенного типа, и тем легче — разработка новых препаратов с оптимальными характеристиками. Наше обсуждение ограничивалось блокаторами входящих токов. Важные пути лечения некоторых типов аритмий могут быть связаны с другими факторами, например, с угнетением автоматизма, с изменением длительности потенциала действия и рефрактерного периода, а также с влиянием антиаритмических препаратов на вегетативную нервную систему.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Weidmann S.* Effects of calcium ions and local anaesthetics on electrical properties of Purkinje fibres. — *J. Physiol. (Lond.)*, vol. 129, p. 568—582.
2. *Hondeghem L., Grant A. O., Jensen R. A.* Antiarrhythmic drug action: selective depression of hypoxic cardiac cells. — *Amer. Heart J.*, 1974, vol. 87, p. 602—605.
3. *Grant A. O., Katzung B. G.* The effects of quinidine and verapamil on electrically-induced automaticity in the ventricular myocardium of guinea pig. — *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1976, vol. 196, p. 407—419.
4. *Fleckenstein A.* Specific inhibitors and promoters of calcium action in the excitation-contraction coupling of heart muscle and their role in the prevention or production of myocardial lesions. — In: *Calcium and the heart*/Ed. P. Harris, L. H. Opie. New York: Academic, 1971, p. 135—188.
5. *Grant A. O., Katzung B. G.* Ability of epinephrine, but not increased extracellular calcium, to reverse the effects of verapamil on ventricular automaticity *in vitro*. — *West Pharmacol. Soc.*, 1975, vol. 18, p. 34—36.
6. *Hondeghem L. M., Ayad M. J. K.* Nifedipine blocks the voltage dependent potentiation of norepinephrine in vascular smooth muscle. — *Proc. West Pharmacol. Soc.*, 1983, vol. 26, p. 231—233.
7. *Hille B.* Local anesthetics' hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. — *J. gen. Physiol.*, 1977, vol. 69, p. 497—515.
8. *Hondeghem L. M., Katzung B. G.* Time and voltage-dependent interaction of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, vol. 472, p. 373—398.

9. Attwell D., Cohen I. The voltage clamp of multicellular preparations. — *Progr. Biophys. mol. Biol.*, 1977, vol. 31, p. 201—245.
10. Beeler G. W., McGuigan J. A. Voltage clamping of multicellular myocardial preparations: capabilities and limitations of existing methods. — *Progr. Biophys. mol. Biol.*, 1978, vol. 34, p. 219—254.
11. Hondeghem L. M. Validity of V_{max} as a measure of the sodium current in cardiac and nervous tissues. — *Biophys. J.*, 1978, vol. 23, p. 147—152.
12. Walton M., Fozzard H. A. The relation of V_{max} to I_{Na} , G_{Na} and b_x in a model of the cardiac Purkinje fiber. — *Biophys. J.*, 1979, vol. 25, p. 407—420.
13. Ebihara L., Shigero N., Lieberman M., Johnson E. A. The initial inward current in spherical clusters of embryonic heart cells. — *J. gen. Physiol.*, 1980, vol. 75, p. 437—456.
14. Colatsky T. J. Voltage clamp measurements of sodium channel properties in rabbit cardiac Purkinje fibres. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1980, vol. 305, p. 215—234.
15. Brown A. M., Lee K. S., Powell T. Sodium current in single rat heart muscle cells. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1981, vol. 318, p. 479—500.
16. Spach M. S., Müller W. T. III, Geselowitz D. B. et al. The discontinuous nature of propagation in normal canine cardiac muscle: evidence for recurrent discontinuities of intracellular resistance that affect the membrane currents. — *Circulat. Res.*, 1981, vol. 48, p. 39—54.
17. Jensen R. A., Katzung B. G. Electrophysiological action of diphenylhydantoin on rabbit atrial dependence on stimulation frequency, potassium, and sodium. — *Circulat. Res.*, 1970, vol. 26, p. 17—27.
18. Singh B. N., Vaughan E. M. Effect of altering potassium concentration of the action of lidocaine and diphenylhydantoin on rabbit atrial and ventricular muscle. — *Circulat. Res.*, 1974, vol. 29, p. 286—295.
19. Hope R. R., Williams D. O., El-Sherif N. et al. The efficacy of antiarrhythmic agents during acute myocardial ischemia and the role of heart rate. — *Circulation*, 1974, vol. 50, p. 507—514.
20. Kupersmith J., Antman E. M., Hoffman B. F. In vivo electrophysiologic effects of lidocaine in canine acute myocardial infarction. — *Circulat. Res.*, 1975, vol. 36, p. 84—91.
21. Michelson E. L., Spear J. F., Moore E. N. Effects of procainamide on strength-interval relations in normal and chronically infarcted canine myocardium. — *Amer. J. Cardiol.*, 1981, vol. 47, p. 1223—1232.
22. Lamanna V., Antzelevitch C., Moe G. K. Effects of lidocaine on conduction through depolarized canine false tendons and on a model of reflected reentry. — *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1982, vol. 221, p. 353—361.
23. Wong S. S., Myerburg R. J., Ezrin A. M. et al. Electrophysiologic effects of encainide on acutely ischemic rabbit myocardial cells. — *Europ. J. Pharmacol.*, 1982, vol. 80, p. 323—329.
24. Okumura K., Horio Y., Tokunomi H. Effects of lidocaine on conduction in normal and acutely ischemic ventricular myocardium of dogs. — *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1982, vol. 256, p. 269—282.
25. Johnson E. A., McKinnon M. G. Differential effect of quinidine and pyridamine on the myocardial action potential at various rates of stimulation. — *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1957, vol. 120, p. 460—465.
26. Heistracher P. Mechanism of action of antifibrillatory drugs. — *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak.*, 1974, vol. 269, p. 199—212.
27. Strichartz G. The inhibition of sodium currents in myelinated nerve by quaternary derivatives of lidocaine. — *J. gen. Physiol.*, (Lond.), 1973, vol. 62, p. 37—57.
28. Courtney K. R. Mechanism of frequency-dependent inhibition of sodium currents in frog myelinated nerve by the lidocaine derivative GEA 968. — *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1975, vol. 195, p. 225—236.
29. Chen C.-M., Gettes L. S., Katzung B. G. Effect of lidocaine and quinidine on steady-state characteristics and recovery kinetics of $(dV/dt)_{max}$ in guinea pig ventricular myocardium. — *Circulat. Res.*, 1975, vol. 37, p. 2029.
30. Hondeghem L. M., Katzung B. G. Effect of quinidine and lidocaine on myocardial conduction. — *Circulation*, 1980, vol. 61, p. 1217—1224.
31. Hodgkin A. L., Huxley A. F. The dual effect of membrane potential on so-

- fedipine in mammalian ventricular myocardium. — *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1977, vol. 298, p. 267—272.
71. *Bayer R., Ehara T.* Comparative studies with calcium antagonists. — In: *The action of drugs on calcium metabolism*/Ed. P. A. Van Zwieten, E. Schonbaum. Stuttgart: Fischer-Verlag, 1978, p. 31—37.
 72. *Moyer J., Hondeghem L. M.* Characterisation of activation and inactivation block in a series of aprindine derivatives using voltage clamp technique. — *Fed. Proc.*, 1983, vol. 42, p. 634.
 73. *Kawai C., Konishi T., Matsuyama E., Okazaki H.* Comparative effects of three calcium antagonists, diltiazem, verapamil, and nifedipine, on the sinoatrial and atrioventricular nodes: experimental and clinical studies. — *Circulation*, 1981, vol. 63, p. 1035—1042.
 74. *Bayer R., Hennekes R., Kaufmann R., Mannhold R.* Inotropic and electrophysiological actions of verapamil and D 600 in mammalian myocardium. I. Patterns of inotropic effects of racemic compounds. — *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1975, vol. 290, p. 49—68.
 75. *Linden J., Brooker G.* The influence of resting membrane potential on the effect of verapamil on atria. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1980, vol. 12, p. 325—331.
 76. *Bayer R., Rodenkirchen R., Kaufmann R.* et al. The effect of nifedipine on contraction and monophasic action potential of isolated cat myocardium. — *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1977, vol. 301, p. 29—37.
 77. *Rowland E., Krikler D. M.* Electrophysiological assessment of amiodarone in treatment of resistant supraventricular arrhythmias. — *Brit. Heart J.*, 1980, vol. 44, p. 82—90.
 78. *Kokubun S., Nishimura M., Noma A., Irasawa H.* Membrane currents in the rabbit atrioventricular node cell. — *Pflügers Arch.*, 1982, vol. 393, p. 15—22.
 79. *Sami M., Harrison D. C., Kraemer H.* et al. Antiarrhythmic efficacy of encainide and quinidine: validation of a model of drug assessment. — *Amer. J. Cardiol.*, 1981, vol. 48, p. 147—156.
 80. *Mason J. W., Winkle R. A.* Electrode-catheter arrhythmia induction in the selection and assessment of antiarrhythmic drug therapy for recurrent ventricular tachycardia. — *Circulation*, 1978, vol. 58, p. 971—985.
 81. *Breithardt G., Seipel L., Abendroth R. R.* Comparison of antiarrhythmic efficacy of disopyramide and mexiletine against stimulus-induced ventricular tachycardia. — *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1981, vol. 3, p. 1026—1037.
 82. *Singh B. N., Vaughan W. E. M.* The effect of amiodarone, a new anti-anginal drug, on cardiac muscle. — *Brit. J. Pharmacol.*, 1970, vol. 39, p. 657—667.

Глава 18

КАЛЬЦИЙ И ПОВРЕЖДЕНИЕ КАРДИОМИОЦИТОВ

В. Г. НЕЙЛЕР, М. Дж. ДЕЙЛИ (W. G. NAYLER, M. J. DALY)

ВВЕДЕНИЕ

Поврежденные кардиомиоциты аккумулируют ионы Ca^{2+} . Неважно, по-видимому, что вызывает повреждение миокарда: является ли оно следствием реперфузии после продолжительного периода ишемии при нормальной температуре [1, 2] или же результатом длительной гипоксии [3], миокардиопатического поражения или восстановления концентрации ионов Ca^{2+} в перфузате после нескольких минут воздействия бескальциевого раствора [4—6]. Конечный результат будет один и тот же — клетки перегружаются ионами Ca^{2+} . Основная цель этой главы заключается в выяснении причины накопления ионов Ca^{2+} при повреждении кардиомиоцитов и механизмов поглощения ионов Ca^{2+} клетками. В заключении мы рассмотрим основные последствия перегрузки кардиомиоцитов ионами Ca^{2+} .

НАКОПЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ ПРИ ПОСТИШЕМИЧЕСКОЙ РЕПЕРФУЗИИ

Количество поступающих в кардиомиоциты ионов Ca^{2+}

Прирост тканевого содержания ионов Ca^{2+} при постишемической реперфузии был впервые описан авторами работы [4]. Прежде чем приступить к обсуждению причин этого явления, рассмотрим вопрос о количестве ионов Ca^{2+} , поглощаемых клетками, и выясним значение этого процесса для кардиомиоцитов. Предварительное представление об этом можно получить на основе результатов, показанных на рис. 18.1, на котором одной из переменных является величина прироста содержания ионов Ca^{2+} в ткани, и отчетливо видна линейная зависимость между этой величиной и восстановлением активной сократительной способности сердца при реперфузии. Эти результаты были получены в серии экспериментов на препаратах изолированного сердца кроликов в условиях ретроградной перфузии [7]. Сначала на 60 мин создавали тотальную ишемию миокарда при температуре ткани от 25 до 37 °C, а затем при 37 °C начинали реперфузию. Через 15 мин после начала реперфузии сердце помещали в раствор концентрированной азотной кислоты до полного растворения, и методом атом-

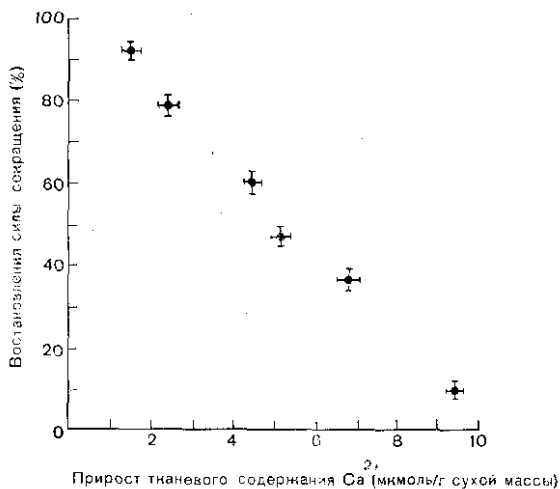


Рис. 18.1. Соотношение между приростом содержания Ca^{2+} в ткани во время постишемической реперфузии и восстановлением способности миокарда активно генерировать силу сокращения. Ишемия продолжалась в течение 60 мин, после чего сердце реперфузировали 15 мин при 15°C . Восстановление силы сокращения выражено в процентах к величине силы сокращения непосредственно перед началом тотальной ишемии. Каждый результат представлен в виде среднего \pm стандартное отклонение по крайней мере для 6 экспериментов.

ной абсорбционной спектрофотометрии измеряли содержание в нем кальция [8]. В течение всего эксперимента: и до начала ишемии, и в период тотальной ишемии, и в процессе реперфузии регистрировали силу сокращения сердца [3]. При построении графика зависимости относительной величины восстановления силы сокращения от прироста содержания кальция в ткани была получена прямолинейная зависимость, как показано на рис. 18.1, причем чем меньше ионов Ca^{2+} было накоплено в сердце, тем полнее восстанавливалась его сократительная способность. Можно получить некоторое представление о значении увеличения содержания кальция в диапазоне 2—10 $\mu\text{моль/г}$ сухой массы (см. рис. 18.1), если учитывать, что в цитозоле кардиомиоцитов ионы Ca^{2+} обычно содержатся в субмикромольных концентрациях. Даже полное количество кальция в нормальной сердечной мышце, включая его содержание во внутриклеточных запасниках (митохондриях и саркоплазматическом ретикулуме), составляет только 2—2,5 $\mu\text{моль/г}$ сухой массы. Следовательно, как было установлено более 10 лет назад [1], реперфузия после относительно короткого периода ишемии может вызывать более чем 5-кратное увеличение содержания кальция в ткани.

Опубликованные недавно данные о влиянии ишемии и пост-ишемической реперфузии на содержание кальция в препарате межжелудочковой перегородки сердца кролика [9] подтвердили, что при постишемической реперфузии имеется прямолинейная

зависимость между относительной величиной восстановления активной сократительной способности и повышением содержания кальция в ткани. При изучении опубликованных в литературе данных часто встречаются наблюдения, свидетельствующие об аккумуляции кальция клетками сердца млекопитающих при реперфузии после периода ишемии. Например, имеется сообщение [10] о 4-кратном увеличении содержания кальция в тканях сердца свиньи, которое реперфузировали после 2-часовой ишемии, создаваемой окклюзией левой передней нисходящей коронарной артерии. Данные, полученные из других источников, суммированы в табл. 18.1.

Таблица 18.1. Прирост содержания Ca^{2+} в миокарде, вызванный реперфузией

Препарат	Продолжительность (мин)		Прирост содержания Ca^{2+} (мкмоль/г сухой массы ткани)	Литературный источник
	ишемии	реперфузии		
Задняя папиллярная мышца левого желудочка собаки	40	20	3,8	[1]
Межжелудочковая перегородка кролика	60	30	$6,7 \pm 0,7$	[9]
Миокард левого желудочка кролика	60	15	$6,3 \pm 0,2$	[8]

Роль продолжительности и тяжести ишемии

Представленные в табл. 18.1 данные относятся только к эффектам реперфузии после длительного периода тотальной ишемии. В ранних работах [1, 11] отмечалось, что реперфузия после относительно коротких эпизодов ишемии не обязательно сопровождается увеличением содержания кальция. А что произойдет, если коронарный кровоток снижен лишь частично, например, при спазме коронарной артерии или при образовании и разрушении пристеночного тромба? На этот вопрос помогают ответить данные табл. 18.2, которые, например, показывают, что при восстановлении полного кровотока после 60 мин и более перфузии потоком, составляющим $\frac{1}{5}$ от нормальной величины, активная сократительная способность сердца не обязательно возвращается к контрольному уровню. Более того, такое восстановление потока может сопровождаться повышением содержания кальция в ткани. Таким образом, данные табл. 18.2 подтверждают, что при реперфузии ишемизированный миокард поглощает ионы Ca^{2+} и что между приростом содержания Ca^{2+} и степенью восстановления активной сократительной способности имеется положительная корреляция. Кроме того, приведенные в табл. 18.2 данные позволяют сделать

Т а б л и ц а 18.2. Восстановление силы сокращения и прирост тканевого содержания Ca^{2+} при реперфузии после ишемии разной глубины продолжительностью 30, 60 и 90 мин при 37°C

Продолжительность ишемии (мин)	30	60	90
Умеренное снижение скорости перфузии (3 мл/мин)			
Восстановление Ca^{2+} (%)	100	72	55
Прирост Ca^{2+} (мкмоль/г сухой массы)	0,6+0,2	0,9+0,2	1,1+0,2
Значительное снижение скорости перфузии (1 мл/мин)			
Восстановление Ca^{2+} (%)	80	39	22
Прирост Ca^{2+} (мкмоль/г сухой массы)	2,6+0,3	5,4+0,9	9,8+0,6
Глобальная ишемия (0 мл/мин)			
Восстановление Ca^{2+} (%)	36	18	0
Прирост Ca^{2+} (мкмоль/г сухой массы)	4,6+0,4	8,2+0,3	9,6+2,1

П р и м е ч а н и е. Восстановление силы сокращения выражено в процентах к силе сокращения непосредственно перед снижением потока перфузата в коронарных сосудах. При этом восстановление силы сокращения при реперфузии после 30 мин ишемии принято за 100%. Исходная скорость потока перфузата в коронарных сосудах составляет 15 мл/мин. Прирост содержания Ca^{2+} измеряли в микромолях на 1 г сухой массы. Эксперименты проводили на самцах белых новозеландских кроликов при температуре 37°C .

еще одно интересное наблюдение: величина прироста содержания Ca^{2+} и потеря сократительной способности приблизительно пропорциональны (а) продолжительности ишемического эпизода и степени снижения коронарного кровотока (б).

Скорость поглощения кальция

Первые предположения о величине скорости поглощения Ca^{2+} ишемическим миокардом при реперфузии основывались на результатах, полученных авторами работы [11]. Они проследили изменения скорости поглощения $^{45}\text{Ca}^{2+}$ при восстановлении коронарного кровотока после 40-минутной ишемии и обнаружили, что установившееся значение достигается не позднее чем через 10 мин. Эти данные были затем подтверждены другими авторами [9]. Полученные результаты позволяют с уверенностью утверждать, что поглощение Ca^{2+} является быстрым процессом. Тем не менее оно не происходит мгновенно, хотя и не исключено, что некоторые клетки, поврежденные значительно более других во время ишемии, при реперфузии сразу перегружаются Ca^{2+} , в то время как менее разрушенные клетки поглощают Ca^{2+} медленнее или, возможно, с некоторой задержкой.

Специфичность прироста содержания кальция, вызванного реперфузией

Согласно мнению авторов работы [12], теоретически нет оснований полагать, что накопление Ca^{2+} в кардиомиоцитах при пост-ишемической реперфузии является следствием только нарушения регуляции входа ионов Ca^{2+} в клетки. Определенную роль в этом случае может играть уменьшение выведения ионов Ca^{2+} из клеток. Однако последнее предположение, по-видимому, неверно, так как выведение ионов Ca^{2+} остается относительно неизменным к моменту, когда скорость входа ионов Ca^{2+} значительно возрастает, как будто поступление Ca^{2+} становится неуправляемым [2]. Количество аккумулированного кальция до некоторой степени зависит от продолжительности предшествующего периода ишемии. В табл. 18.3 в качестве примера показано, что межжелудочковая

Таблица 18.3. Влияние продолжительности ишемического эпизода на прирост содержания Ca^{2+} в ткани при реперфузии

Перфузия	Прирост Ca^{2+} после 30 мин реперфузии (мкмоль/г сухой массы)
30 мин ишемии	$4,0 \pm 0,2$
60 мин ишемии	$6,7 \pm 0,7$

Примечание. Данные получены на межжелудочковой перегородке кролика [9]. Ишемию препарата создавали при 28°C в течение указанного в таблице времени, а затем проводили реперфузию в течение 30 мин.

перегородка сердца кролика, реперфузированная после 30-минутной ишемии при 28°C , накапливает Ca^{2+} в количестве $4 \pm 0,2$ мкмоль/г сухой массы, в то время как аналогичные препараты, реперфузированные через 60 мин ишемии, накапливают Ca^{2+} в количестве $6,7 \pm 0,7$ мкмоль/г сухой массы [9]. Процесс поглощения, по-видимому, не является специфическим для ионов Ca^{2+} . Если при ишемической реперфузии в перфузат вместо ^{45}Ca [1] или ^{47}Ca [9] добавить ^{133}Ba или ^{85}Sr [12], то эти ионы накапливаются в ткани вместо кальция. В случае замены кальция барием реперфузия после 15-минутной ишемии при 37°C не изменяет характера поглощения ^{133}Ba ; реперфузия после 30-минутной ишемии увеличивает скорость поглощения ^{133}Ba на 33% [12], а после 60-минутной ишемии скорость его поглощения возрастает более чем вдвое. Если в качестве маркера использовать ^{85}Sr , то влияние ишемической реперфузии будет выражено значительно слабее [12]: скорость поглощения ^{85}Sr при восстановлении перфузии после 45-минутной ишемии не изменяется, и увеличение наблюдается лишь при продолжительности ишемического периода более 60—70 мин. Такое отсутствие специфичности относится не только к двухвалентным ионам. Заметные изменения наблюдаются в тканевом содержании других электролитов. Содержание

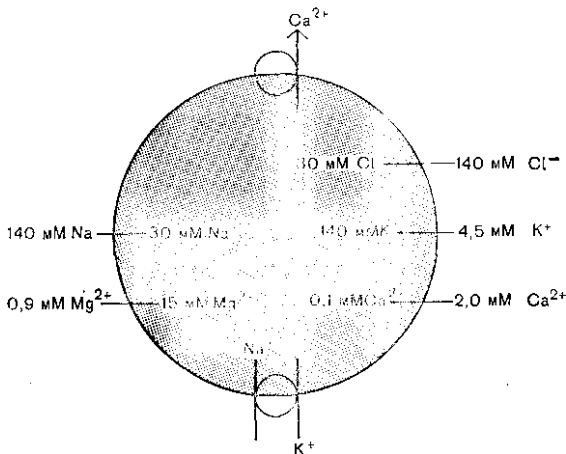


Рис. 18.2. Схема распределения ионов между миоплазмой кардиомиоцитов и внеклеточным пространством.

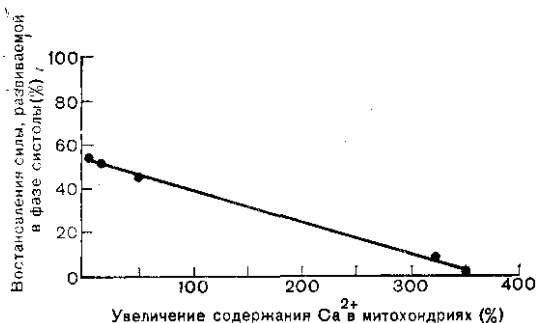


Рис. 18.3 Соотношение между содержанием Ca^{2+} в митохондриях, и восстановлением величины активной силы сокращения. Перед выделением митохондрий ткани сердца сначала помещали в условия тотальной ишемии при 37°C , а затем реперфузировали. Каждая точка отражает результаты отдельного эксперимента.

ионов Na^+ возрастает, а ионов K^+ — уменьшается; наблюдается также увеличение тканевого содержания H_2O и потеря ионов Mg^{2+} [1]. Если сравнить распределение этих ионов в нормальном миокарде млекопитающих (рис. 18.2), то можно сделать вывод, что восстановление перфузии после длительного периода ишемии просто облегчает движение ионов по их электрохимическим градиентам. Может быть именно поэтому не наблюдается увеличения выхода ионов Ca^{2+} ? Не потому ли это происходит, что существует внутрь направленная движущая сила для тонов Ca^{2+} через поврежденную неселективно проницаемую мембрану? Прежде чем рассмотреть эту возможность более подробно, необходимо выяснить, что происходит в клетке с ионами Ca^{2+} , поглощенными при реперфузии.

Локализация аккумулированного Ca^{2+}

Ионы Ca^{2+} , поглощаемые при реперфузии, преимущественно локализуются в митохондриях, где они откладываются в виде плотных розеткообразных частиц [8, 11]. Значение таких внутримитохондриальных отложений ионов Ca^{2+} нужно определить как можно точнее, не допуская недооценки их роли, но не преувеличивая ее важность. Как показано на рис. 18.3, если измерить и нанести на график относительную величину восстановления активной сократительной способности сердца при постишемической реперфузии как функцию относительного прироста содержа-

Таблица 18.4. Влияние Ca^{2+} на синтез АТФ в митохондриях ткани сердца

Ca^{2+} (мкМ)	Снижение активности синтеза АТФ (%)
5	0
12,5	58 ± 4
30	68 ± 6
50	72 ± 10

Примечание. Каждый результат представляет собой среднее значение \pm стандартное отклонение для 6 независимых экспериментов. Использовали митохондрии, выделенные из свежееизолированной ткани сердца у 6 кроликов. Концентрация Ca^{2+} — уровень новизированного Ca^{2+} , получаемый при использовании ЭГТА в качестве буфера. Митохондрии инкубировали при 25°C в присутствии указанного количества Ca^{2+} в течение 10 мин прежде чем оценивали [8] активность синтеза в них АТФ.

ния ионов Ca^{2+} в выделенных из сердца митохондриях, то и в этом случае получается линейная зависимость. Очевидно, что лучше восстанавливаются те ткани сердца, в митохондриях которых имеется меньший запас ионов Ca^{2+} . Не исключено, что в этом нет ничего необычного, так как митохондрии, подвергшиеся действию высокой концентрации ионов Ca^{2+} в хорошо оксигенированной среде, богатой субстратом и предшественниками АТФ, имеют более низкую активность синтеза АТФ, как показано в табл. 18.4. Одним из путей уменьшения скорости поглощения ионов Ca^{2+} митохондриями ткани сердца является снижение температуры. На рис. 18.4 показано, что в зависимости от концентрации ионов Ca^{2+} в инкубационной среде снижение температуры среды реакции с 37°C до 25°C может уменьшить скорость поглощения ионов Ca^{2+} митохондриями в 2 раза. Рассмотрение этого вопроса будет продолжено при обсуждении способов защиты миокарда от повреждений, вызванных постишемической реперфузией.

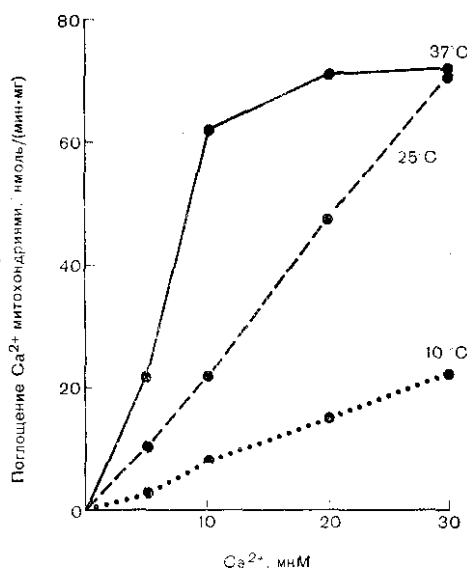


Рис. 18.4. Влияние температуры на скорость аккумуляции Ca^{2+} митохондриями, выделенными из ткани сердца млекопитающего.

Изменения концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле без прироста тканевого содержания кальция

До сих пор мы рассматривали вопрос о наблюдаемом при постишемической реперфузии увеличении тканевого содержания Ca^{2+} . Очевидно, что во время тотальной ишемии прирост тканевого содержания кальция может происходить

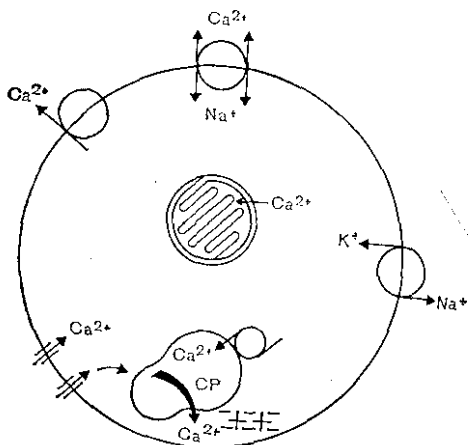
только за счет ионов Ca^{2+} , находящихся во внеклеточном пространстве. Если предположить, что внеклеточная жидкость содержит около 2,5 мкмоль ионов Ca^{2+} на 1 л, то за счет этого Ca^{2+} можно объяснить поглощение только 0,35 мкм Ca^{2+} на 1 г сырой массы ткани. Однако в этом случае может происходить перераспределение Ca^{2+} в ткани, так что концентрация его ионов в цитозоле может увеличиться без какого бы то ни было прироста тканевого содержания кальция. Ряд причин свидетельствует в пользу такого механизма. Например, вследствие снижения внутриклеточного уровня аденозинтрифосфата (АТФ) и креатинфосфата (КФ) происходит нарушение работы ионных насосов, поддерживающих внутриклеточный баланс ионов. Некоторые из этих насосов схематически показаны на рис. 18.5. К ним относятся:

1. Расположенная на сарколемме Ca^{2+} -активируемая АТФаза, удаляющая ионы Ca^{2+} из клетки против градиента концентрации [13]. При остановке этого насоса можно ожидать, что все входящие в клетку ионы Ca^{2+} независимо от пути поступления будут захвачены клеткой, если не заместятся в ней ионами Na^+ [14, 15].

2. Ca^{2+} -активируемая АТФаза саркоплазматического ретикулума. Функция этого насоса состоит в перемещении ионов Ca^{2+} в саркоплазматический ретикулум [16], поэтому прекращение его работы либо вследствие истощения источников энергии, либо по какой-то другой причине должно привести к повышению концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле.

3. Расположенная на сарколемме $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -активируемая оубаин-чувствительная АТФаза. Она удаляет из клетки ионы Na^+ и вводит в нее ионы K^+ против соответствующих градиентов концентрации, поэтому нарушение ее работы должно привести к

Рис. 18.5. Схема различных ионных насосов кардиомиоцитов, чувствительных к ионам Ca^{2+} . СР — саркоплазматический ретикулум.



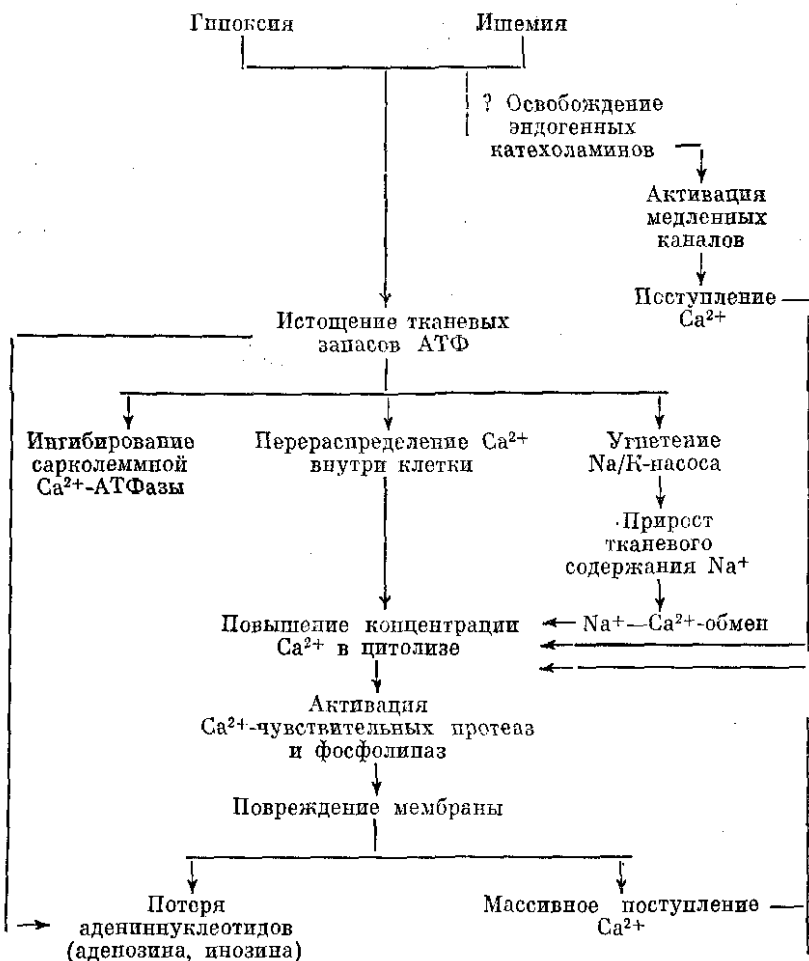
уменьшению тканевого содержания ионов K^+ и увеличению количества ионов Na^+ . Известно, что такое перераспределение ионов происходит при ишемии миокарда [1]. На первый взгляд увеличение концентрации ионов Na^+ в цитозоле не является существенным фактором. Однако

его возможное значение возрастает, если учесть, что повышение уровня ионов Na^+ в цитозоле может привести к подъему ионов Ca^{2+} в результате следующих наблюдений: а) ионы Na^+ вытесняют ионы Ca^{2+} из митохондрий [17]; б) ионы Ca^{2+} могут поступать из внеклеточного пространства в обмен на ионы Na^+ с помощью реакции $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена [14, 15].

Прирост содержания кальция и истощение запасов АТФ

Уже через несколько секунд после начала глубокой ишемии содержание макроэргических фосфатов (аденозинтрифосфата и креатинфосфата) начинает уменьшаться. Приблизительно через 1 мин содержание креатинфосфата может снизиться более чем на 80% [18]; через 15 мин исчезает 65% общего содержания АТФ в ткани и 55% всех адениннуклеотидов [19]. Через 40 мин ишемии запасы макроэргических фосфатов практически полностью истощаются [18], и ткань необратимо повреждается в такой степени, что уже не способна восстановиться при реперфузии [19, 20]. Согласно результатам работы [21], восстановление подачи кислорода не приведет к развитию клеточных аномалий, если уровень АТФ при ишемии не снижался ниже 5 мкмоль на 1 г сухой массы. И наоборот, если уровень АТФ в ткани падает приблизительно до 2 мкмоль/г сухой массы, реоксигенация или реперфузия ускоряют начавшийся процесс разрушения мембран. По-видимому, истощение запасов макроэргических фосфатов и перегрузка кардиомиоцитов ионами Ca^{2+} взаимосвязаны, однако такое истощение запасов предшествует началу увеличения тканевого содержания Ca^{2+} . Например, как показано в работах [1, 20, 21], реперфузия после относительно коротких периодов ишемии не сопровождается суммарным приростом содержания кальция, несмотря на истощение запасов АТФ и КФ. Однако после длительных периодов ишемии (более 40 мин) реперфузия практически всегда приводит к повышению тканевого содержания кальция, если не

Схема 18.1. Возможная последовательность событий, запускаемых гипоксией или ишемией



предпринять специальных защитных мер. В таком случае развитие процесса перегрузки клеток кальцием может быть представлено последовательностью событий, показанной на схеме 18.1. Таким образом, вскоре после начала эпизода гипоксии или ишемии тканевые запасы АТФ и КФ снижаются настолько, что концентрация ионов Ca^{2+} в цитозоле может возрасти без какого бы то ни было увеличения тканевого содержания кальция или же он будет очень небольшим. Такое повышение цитоплазматической концентрации ионов Ca^{2+} может быть связано с ингибированием Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума, Ca^{2+} -АТФазы сарколеммы и $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФазы в результате истощения запасов АТФ. Угнетение Na^+/K^+ -насоса объясняет раннее повышение тканевого содержания ионов Na^+ в этих условиях [1], что в свою оче-

редь может ускорить вход ионов Ca^{2+} в обмен на ионы Na^+ . Повышение концентрации ионов Na^+ способствует также освобождению ионов Ca^{2+} из митохондрий [17]. Все эти события приводят к повышению цитоплазматической концентрации ионов Ca^{2+} , после чего может развиваться вторая фаза ишемической реакции, включающая активацию Ca^{2+} -чувствительных протеаз и фосфолипаз [22, 23] и вызывающая, по-видимому, необратимые изменения структуры и целостности сарколеммного комплекса. При достижении этой стадии можно ожидать быстрого массивного входа ионов Ca^{2+} , похожего на описанный первоначально в работе [1], а также потерю внутриклеточных компонентов, включая адениновые основания, являющиеся предшественниками синтеза АТФ [24].

Следовательно, перегрузка ишемического миокарда ионами Ca^{2+} представляет собой сложное явление, обусловленное истощением запасов макроэргических фосфатов на ранней стадии ишемии. Первоначально повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме может сопровождаться увеличением общего содержания их в ткани. Некоторая часть Ca^{2+} может поступать в миоплазму в обмен на ионы Na^+ ; кроме того, Ca^{2+} может выходить из митохондрий, а также освобождаться из саркоплазматического ретикулума в ответ на быстрое поглощение H^+ [25]. Поступивший Ca^{2+} будет оставаться в цитозоле, так как вследствие истощения клеточных запасов субстратов нарушается работа различных АТФаз, ответственных за поддержание низкой миоплазматической концентрации Ca^{2+} . При достижении некоторого критического уровня концентрации Ca^{2+} в цитозоле можно ожидать практически мгновенного разрушения сарколеммы и других липидобелковых мембран в результате активации эндогенных Ca^{2+} -активируемых фосфолипаз и протеаз. При достижении этой стадии уже невозможно предотвратить поступление Ca^{2+} из внеклеточного пространства внутрь клеток. Поэтому при реперфузии раствором, содержащим ионы Ca^{2+} , мы можем ожидать дальнейшего развития повреждений, вызванных ишемией.

Постишемическая реперфузия и работа внутриклеточных систем

Сарколемма. Относительно мало известно о прямом влиянии ишемии и постишемической реперфузии на биохимические процессы, происходящие в сарколемме. Ее пассивная проницаемость для ионов Ca^{2+} не изменяется при продолжительности ишемии, составляющей около 1 ч [26]. Однако через 3 ч и более пассивная проницаемость ее для ионов Ca^{2+} увеличивается [26] по крайней мере в препаратах некоторых видов животных.

В отличие от очень продолжительных эпизодов ишемии, необходимых для усиления пассивной проницаемости сарколеммы для ионов Ca^{2+} , уже в самом начале ишемического эпизода, в первые 10—20 мин, наблюдается повышение активности $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-АТФ}$.

азы [26]. Оно не сопровождается изменениями липидного состава плазмалеммы, т. е. не зависит от последнего. Значит этот эффект вероятнее всего связан либо с некоторым еще не распознанным повреждением сарколеммы, либо с появлением специального ингибитора, который не исчезает в процессе выделения изолированных везикул сарколеммы. Причина, определяющая такое быстрое нарушение работы насоса, не имеет большого значения, если оно происходит одновременно с истощением субстрата, также вызывающим угнетение активности $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATФазы}$, которое хорошо согласуется с наблюдением о возрастании в ткани в самом начале ишемии уровня Na^+ и снижении уровня K^+ .

$(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATФаза}$ является не единственным ферментом сарколеммы, на работу которого влияет ишемия. Например, недавно было описано [26] уменьшение активности аденилатциклазы. Примерно в это же время происходит замедление $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена [26]. Следовательно, существуют по крайней мере три системы: $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен, аденилатциклаза и $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATФаза}$, работы которых замедляются уже на ранней стадии ишемии, когда пассивная проницаемость сарколеммы для ионов Ca^{2+} еще не изменяется.

Миофибриллы. Миофибриллы очень устойчивы к влиянию ишемии [27], но не исключено, что и в них происходят какие-либо еще не распознанные изменения.

Саркоплазматический ретикулум. Кроме угнетения Ca^{2+} -аккумулирующей способности саркоплазматического ретикулума, вследствие истощения внутриклеточных запасов АТФ, ишемия и постишемическая реперфузия непосредственно влияют на его функции, замедляя скорость освобождения Ca^{2+} [28]. Однако и в этом случае такой эффект наблюдается только при продолжительной ишемии.

Митохондрии. В настоящее время проведено большое число исследований, показавших, что в ответ на ишемию снижается способность миокардиальных митохондрий синтезировать АТФ [3, 10], усугубляющаяся при реперфузии. Угнетение синтеза АТФ происходит с той же скоростью, что и повышение содержания Ca^{2+} в митохондриях [2, 8, 10]. Эти два явления, по-видимому, связаны друг с другом, так как поддержание нормального содержания Ca^{2+} в митохондриях зависит от поступления АТФ, но если поместить митохондрии в среду с высокой концентрацией Ca^{2+} , то рефосфорилирование АДФ происходит медленнее [8].

В настоящее время неизвестно, почему в различных органеллах происходят такие изменения в ответ на ишемию или ишемическую реперфузию, но довольно заманчиво было бы предположить, что все они отражают некоторые фундаментальные изменения в организации фосфолипидных и протеолипидных мембран, обусловленные нарушением гомеостаза ионов на ранней стадии ишемии, который сопровождается повышением концентрации Ca^{2+} в цитозоле.

Прежде чем приступить к описанию возможных путей поступления Ca^{2+} в поврежденные кардиомиоциты, следует рассмотреть

вопрос о повышении содержания Ca^{2+} в клетках, которое происходит в различных условиях, включая Ca^{2+} -парадокс и постгипоксическую оксигенацию.

ПОСТУПЛЕНИЕ Ca^{2+} ПРИ КАЛЬЦИЕВОМ ПАРАДОКСЕ

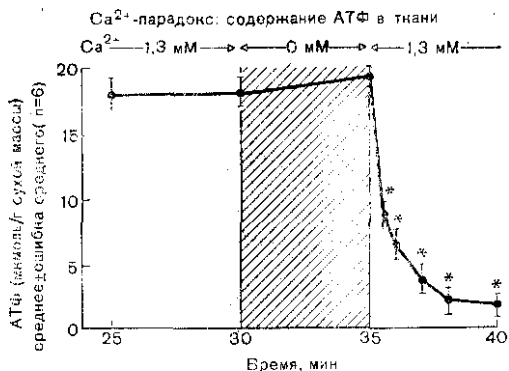
Определение

При перфузии изолированного сердца млекопитающего раствором, не содержащим ионов Ca^{2+} , механическая активность миокарда быстро исчезает [6], а электрическая сохраняется [29]. Если после нескольких минут перфузии сердца взрослого животного бескальциевым раствором в раствор добавить ионы Ca^{2+} , то развивается последовательность событий, которая известна как «кальциевый парадокс» [6]. Он характеризуется быстрым массивным входом Ca^{2+} в клетки [4, 5], истощением запасов макроэргических фосфатов [31], нарушением работы саркоплазматического ретикулума [32] и выходом из клеток во внеклеточное пространство некоторых внутриклеточных компонентов, включая креатинкиназу и миоглобин. Хотя существование Ca^{2+} -парадокса хорошо установлено, его патофизиология остается неясной. Основная и все еще не решенная проблема связана с путями поступления Ca^{2+} в клетки в этом случае [33]. Некоторые исследователи предполагают, что основным путем входа Ca^{2+} являются медленные каналы [33]; другие — что поступление Ca^{2+} по медленным каналам не участвует в этом процессе [5].

Факторы, влияющие на величину прироста содержания Ca^{2+} во время кальциевого парадокса

Целесообразно повторить, что Ca^{2+} -парадокс представляет собой необратимое явление, вызываемое введением ионов Ca^{2+} в перфузионный раствор после относительно короткого периода бескальциевой перфузии. С самого начала необходимо усвоить, что описанные выше условия, вызывающие массивный вход Ca^{2+} при постишемической реперфузии, совершенно отличаются от условий, возникающих при кальциевом парадоксе. В случае реперфузии ишемического миокарда уменьшение запасов макроэргических фосфатов предшествует приросту содержания Ca^{2+} , в то время как при Ca^{2+} -парадоксе клеточные запасы АТФ и КФ сохраняются или даже увеличиваются до тех пор, пока не начинается переполнение клеток ионами Ca^{2+} [2]. Следовательно, при Ca^{2+} -парадоксе истощение клеточных запасов макроэргических фосфатов начинается после и в результате повышения содержания Ca^{2+} в ткани (рис. 18.6), в то время как при реперфузии сердца после ишемии истощение макроэргических фосфатов предшествует повышению входа Ca^{2+} и может косвенно запускать его.

Некоторое представление о величине прироста содержания Ca^{2+} во время парадокса можно получить на основании данных,



* $p < 0,001$

Рис. 18.6. Уровень АТФ в ткани сердца кролика, которую в течение 5 мин перфузировали бескальциевым раствором при 37°C, а затем концентрацию Ca²⁺ восстанавливали до исходного уровня. Обратите внимание, что тканевые запасы АТФ начинают уменьшаться лишь после восстановления концентрации Ca²⁺ в растворе.

суммированных в табл. 18.5. Очевидно, что прирост содержания Ca²⁺ при парадоксе превышает наблюдаемый при реперфузии ишемического миокарда (сравните с данными табл. 18.3).

Увеличение содержания Ca²⁺, происходящее во время кальциевого парадокса, сопровождается (см. табл. 18.5) значительным повышением уровня Na⁺ (см. табл. 18.5) и потерей K⁺ [4]. Следовательно, нельзя считать, что кальциевый парадокс может быть связан с высокоспецифическими изменениями селективной ионной проницаемости мембраны, окружающей миокардиальные клетки. Вероятнее всего, ионы различных видов просто перемещаются через мембрану по направлению соответствующих ионных градиентов. Однако в этом случае вполне уместно задать вопрос, насколько измерения содержания катионов, производимые через 5 или 10 мин после начала переполнения клеток ионами Ca²⁺, отражают изменения, происходящие в течение первых нескольких секунд? Ниже мы продолжим обсуждение этого вопроса.

К факторам, влияющим на количество Ca²⁺, поглощаемого клетками в описанных выше условиях, относятся продолжительность перфузии бескальциевым раствором (см. табл. 18.5), темпе-

Таблица 18.5. Содержание Ca²⁺ и Na⁺ в миокарде во время развития кальциевого парадокса

Продолжительность перфузии бескальциевым раствором (мин)	Содержание в ткани (мкмоль/г сухой массы)	
	Ca ²⁺	Na ⁺
0 (контроль)	3,7±0,13	44,5±2,21
1	4,0±0,22	45,7±4,37
5	17,6±0,94	132,9±7,22
10	19,3±0,55	129,9±5,22

Примечание. В экспериментах использовали изолированные ткани сердца крыс [4]. За исключением бескальциевого раствора, обычный перфузионный раствор содержал 1,25 мМ Ca²⁺. Эксперименты проводили при 37°C.

Таблица 18.6. Влияние концентрации Ca^{2+} в растворе после перфузии бескальциевой средой на прирост содержания Ca^{2+} в ткани во время кальциевого парадокса (мкмоль/г сухой массы)

Продолжительность перфузии бескальциевым раствором (мин)			
0	2	5	10
2,7±0,27	0,1 мМ Ca^{2+} в восстанавливающем растворе	7,0±0,63	7,3±1,23
	5,1±0,55		
2,5±0,11	2,5 мМ Ca^{2+} в восстанавливающем растворе	22,7±0,35	23,2±1,09
	17,2±1,18		

Примечание. Результаты получены на изолированной ткани сердца крыс [4], перфузируемой при 37°C. Данные для 0 мин перфузии бескальциевым раствором являются контролем.

ратура бескальциевого перфузионного раствора [34], содержание Na^+ в перфузионном растворе [4] и наличие в нем других двухвалентных катионов, в частности Co^{2+} или Mn^{2+} [35]. Оказалось, что ни Mg^{2+} [4], ни верапамил [5] не влияют на величину перегрузки клеток ионами Ca^{2+} , образующейся в этих условиях. Однако (табл. 18.6) содержание Ca^{2+} в перфузате, заменяющем бескальциевый раствор, существенно влияет на прирост содержания Ca^{2+} при кальциевом парадоксе. Повышение содержания Ca^{2+} происходит быстрее при более высокой концентрации Ca^{2+} в перфузионном растворе.

Общепризнано, что наличия Ca^{2+} более 0,05 ммоль/л в бескальциевом перфузионном растворе достаточно для защиты миокарда от возникновения парадокса. Если перфузия осуществляется буфером, содержащим меньшее количество Ca^{2+} , то при этом наверняка возникнет кальциевый парадокс, если не будут приняты меры для защиты миокарда. До рассмотрения вопроса о путях и причинах такой значительной перегрузки кардиомиоцитов ионами Ca^{2+} целесообразно суммировать все факторы, которые, как было показано, ослабляют проявление парадокса. К сожалению, во многих экспериментах в качестве маркера возникновения парадокса использовали выход из клеток определенных белков или ферментов, а так как прирост содержания Ca^{2+} в ткани развивается не обязательно параллельно выходу фермента (или белка), то нельзя быть уверенным в том, что ослабление проявлений парадокса, описанное в работах, посвященных этому вопросу, всегда сопровождалось снижением прироста Ca^{2+} в ткани. К факторам, которые, по-видимому, ослабляют проявление парадокса, относятся: небольшая продолжительность перфузии бескальциевым раствором (менее 1 мин) [4]; замена части ионов Na^+ в растворе, используемом вместо бескальциевого, ионами Li [4]; ацидоз [36]; охлаждение перфузата [34] и добавление ионов Co^{2+} или Mn^{2+} , при условии их введения до начала перфузии бескальциевым раствором [35]. К факторам, приводящим к усилению проявле-

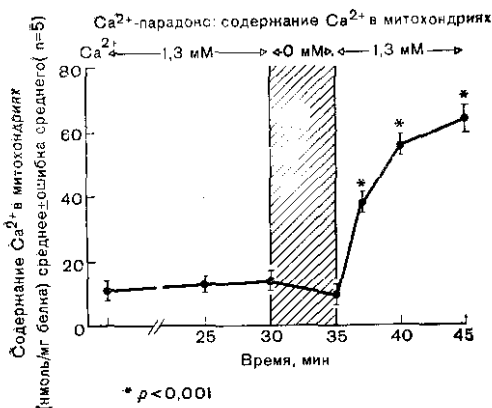
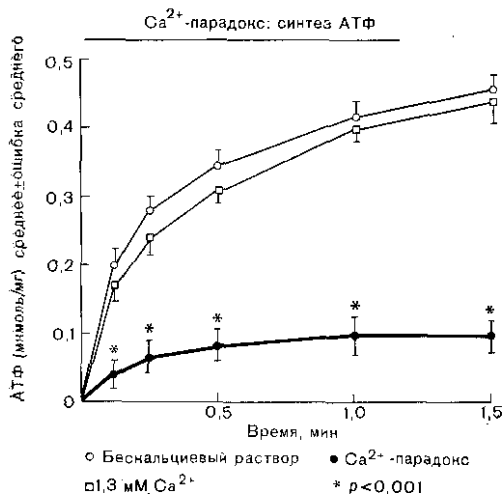


Рис. 18.7. Содержание Ca^{2+} в митохондриях, выделенных из тканей сердца, которые в течение 5 мин перфузировали бескальциевым раствором, а затем раствором, содержащим Ca^{2+} . Митохондрии выделяли в среде без ЭГТА [8], чтобы содержание Ca^{2+} в них не изменилось при выделении. $p < 0,001$; каждая точка отражает среднее значение \pm стандартную ошибку среднего значения для 6 экспериментов.

ний парадокса, относятся увеличение продолжительности перфузии бескальциевым раствором и повышение концентрации Ca^{2+} в перфузате.

Внутриклеточная локализация поглощенного Ca^{2+}

Установив, что кальциевый парадокс приводит к перегрузке кардиомиоцитов ионами Ca^{2+} , будет уместно снова поставить вопрос о месте накопления их внутри клетки. Насколько известно в настоящее время Ca^{2+} преимущественно накапливается в митохондриях, так что они перегружаются ионами Ca^{2+} (рис. 18.7) точно так же, как описано в случае реперфузии ишемического миокарда. По мере повышения содержания Ca^{2+} внутри митохондрий снижается их способность синтезировать АТФ (рис. 18.8). Поэтому миокард снова оказывается в условиях угнетения энергетического метаболизма, очень напоминающих условия, в которых оказывается миокард при реперфузии после ишемии. Различия



между этими двумя условиями состоит в том, что в случае парадокса: а) уменьшение запасов АТФ в ткани непосредственно связано с массивным поступлением Ca^{2+} в отличие от наблюдаемого при пост-ишемической реперфузии; б) массивное поступление

Рис. 18.8. То же, что и на рис. 18.7, но в митохондриях оценивали синтез АТФ.

$p < 0,001$; каждая точка означает среднее значение \pm стандартную ошибку среднего значения для 6 экспериментов.

Ca^{2+} происходит, несмотря на нормальную концентрацию АТФ и КФ в ткани, но этого нет при реперфузии; в) ультраструктура сарколеммы и ее оболочки оказываются поврежденными до начала массивного поступления Ca^{2+} , что не обязательно при пост-ишемической реперфузии.

Изменения структуры клеточной поверхности, вызванные чрезмерным накоплением Ca^{2+} после короткого периода перфузии бескальциевым раствором

Поверхность кардиомиоцитов имеет сложную ультраструктуру. Кроме плазмолеммы, обладающей ферментативной активностью, существует также электронно-плотный слой, богатый углеводами, называемый «гликокаликс», или базальное покрытие [37]. Его можно разделить на внутреннюю поверхностную оболочку и внешний слой [38]. Плазмолемма, внутренняя поверхностная оболочка и внешний слой в нормальных условиях неразрывно соединены друг с другом и все вместе создают внешнюю границу клетки. Однако при перфузии бескальциевым раствором компоненты гликокаликса разъединяются. Внутренняя поверхностная оболочка остается прикрепленной к плазмолемме, в то время как между внутренней поверхностной оболочкой и внешним слоем образуются заполненные жидкостью щели [38]. Если на фоне таких изменений вновь начать перфузию раствором, содержащим Ca^{2+} , то возникают необратимые повреждения, сопровождающиеся массивным поступлением Ca^{2+} в клетки [4, 6]. Некоторые исследователи полагают, что такое нарушение структуры клеточной поверхности обуславливает легкую проницаемость расположенной в самом низу плазмолеммы для ионов Ca^{2+} [38]. Другие считают, что путь поступления Ca^{2+} в клетки значительно более сложен [39]. Не следует также забывать, что нарушение структуры гликокаликса не является единственным изменением строения клеточной поверхности. Например, обычно плотно прилегающие друг к другу мембраны соседних клеток в зоне вставочного диска далеко расходятся в стороны [40]. Возникает естественный вопрос, не может ли часть Ca^{2+} , поступающего внутрь клеток при кальциевом парадоксе, проникать через мембрану таких видоизмененных вставочных дисков.

Последствия перегрузки кардиомиоцитов ионами Ca^{2+} , связанные с кальциевым парадоксом

Установив, что во время кальциевого парадокса происходит перегрузка клеток ионами Ca^{2+} , необходимо рассмотреть последствия такой перегрузки. К ним относятся нарушение работы митохондрий (рис. 18.8), активация Ca^{2+} -зависимых фосфатаз, фосфолипаз и АТФаз, ингибирование $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-АТФазы}$ (происходящее при увеличении концентрации Ca^{2+} выше 0,1 ммоль/л) и

активация миофибриллярного аппарата, приводящая к развитию контрактуры и чрезмерному расходу АТФ. Возможно, что быстрое развитие контрактуры обуславливает по крайней мере частично дальнейшее разрушение клеточной мембраны и вставочных дисков, что в свою очередь приводит к усилению перегрузки кардиомиоцитов ионами Ca^{2+} . Все это заканчивается полным истощением запасов АТФ, пересокращением кардиомиоцитов, которые повреждаются до такой степени, что значительная часть их внутриклеточного содержимого выходит во внеклеточное пространство. В таких условиях, как и следует ожидать, в значительной степени угнетается даже Ca^{2+} -аккумулирующая способность саркоплазматического ретикулула [32].

ПРИРОСТ СОДЕРЖАНИЯ Ca^{2+} В ТКАНИ ПРИ ПОСТГИПОКСИЧЕСКОЙ РЕОКСИГЕНАЦИИ

Изменение содержания Ca^{2+} во времени

В этой главе выше было описано увеличение содержания Ca^{2+} в ткани, происходящее при реперфузии ишемического миокарда. Логично было бы задать вопрос, происходит ли аналогичный прирост содержания Ca^{2+} при гипоксии миокарда и последующей реоксигенации.

Результаты проведенных недавно исследований показали, что в миокарде действительно происходит накопление Ca^{2+} во время продолжительной гипоксии в отсутствие субстратов [41]. Однако повышение содержания Ca^{2+} при этом невелико по сравнению с наблюдаемым при реоксигенации гипоксического миокарда. Этот процесс происходит без сопутствующего повышения скорости входа Ca^{2+} [41]. Он начинается сразу при реоксигенации и, следовательно, даже предшествует развитию контрактуры. Количество Ca^{2+} , поступающего при этом в кардиомиоциты, составляет около 6—8 мкм/г сухой массы, т. е. приближается к величине, наблюдаемой при постишемической реперфузии.

Последствия повышения содержания Ca^{2+}

Последствия повышения содержания Ca^{2+} близки к возникающим при реперфузии ишемического миокарда. К ним относятся нарушение целостности сарколеммы, развитие контрактуры, перегрузка митохондрий ионами Ca^{2+} и гибель клеток.

Почему повышение входа Ca^{2+} происходит только во время реоксигенации? На этот вопрос нельзя ответить однозначно, одним из возможных объяснений может быть возобновление синтеза АТФ в митохондриях. Как только в клетке снова появляется АТФ, миофибриллы укорачиваются, что может механически разрушать мембрану, которая уже повреждена или стала хрупкой во время предшествовавшей гипоксии (см. схему 18.1).

ПУТИ ПОСТУПЛЕНИЯ Ca^{2+}

Необходимо рассмотреть вопрос о том, как ионы Ca^{2+} поступают в поврежденные миоциты. Для нормальных миоцитов в нормальных условиях имеют место по крайней мере четыре различных пути поступления Ca^{2+} . К ним относятся: а) обмен Ca^{2+} на Na^+ [14]; б) пассивная диффузия; в) обмен на ионы K^+ ; г) через потенциалозависимые медленные каналы [42].

Следовательно, естественно возникает вопрос, происходит ли массивное поступление Ca^{2+} во время Ca^{2+} -парадокса, постишемической реперфузии и реоксигенации по одному или нескольким из этих путей, или же в этом случае принимает участие некоторый иной механизм поступления Ca^{2+} в кардиомиоциты, активируемый только в аномальных условиях. На первый взгляд кажется удивительным, что ответ на такой фундаментальный вопрос все еще нельзя получить. Это можно объяснить двумя причинами: во-первых, многие из соединений, предложенных для блокирования одного из перечисленных путей поступления Ca^{2+} в кардиомиоциты, например, ингибиторы медленных каналов [33], имеют также и другие пути действия на миокард [43], кроме хорошо установленного влияния на медленные кальциевые каналы. Например, эти вещества способствуют также сохранению энергии в клетках [8], вследствие чего невозможно определить, связана ли их эффективность как блокаторов входа Ca^{2+} в таких условиях с их прямым ингибирующим действием на медленные каналы, или же она обусловлена улучшением поступления энергии в виде АТФ к системе, обеспечивающей гомеостаз Ca^{2+} , или же связана с другим, возможно еще не выясненным способом влияния. Такие же трудности возникают при объяснении защитного действия гипотермии [34] или ацидоза [36], так как оба этих фактора изменяют несколько параметров работы клетки, включая действие на медленные каналы, Na^+ — Ca^{2+} -обмен и производство энергии.

Поступление Ca^{2+} при постишемической реперфузии

Прирост содержания Ca^{2+} , происходящий при постишемической реперфузии, по-видимому, является конечным результатом длинной цепи событий, исходно запускаемой нарушением способности кардиомиоцитов вырабатывать достаточное количество энергии в виде АТФ для поддержания низкой концентрации Ca^{2+} в цитозоле. Такая последовательность событий может быть близка к показанной на схеме 8. На ранней стадии реперфузии некоторое количество Ca^{2+} поступает в кардиомиоциты в обмен на ионы Na^+ , кроме того, часть Ca^{2+} может поступать по медленным каналам, активируемым при освобождении катехоламинов из нервных окончаний, и частично — путем пассивной диффузии. Однако на более поздней стадии (см. схему 18.1) значительное увеличение тканевого содержания Ca^{2+} вероятнее всего обусловлено пропихиванием Ca^{2+} через поврежденную сарколемму. В этих условиях вход Ca^{2+} может быть не связан с увеличением его поступления

по медленным каналам. Этот вывод подтверждается наблюдениями [9] о том, что добавление блокаторов медленных каналов на поздней стадии не предотвращает повышения внутриклеточного содержания Ca^{2+} во время постишемической реперфузии. И наоборот, использование этих соединений в профилактических целях до начала реперфузии снижает величину прироста содержания Ca^{2+} или даже предотвращает его, вероятно, вследствие их способности препятствовать чрезмерному расходу энергии [8], что позволяет сохранять достаточное количество АТФ для поддержания внутриклеточного гомеостаза. Как только поступление Ca^{2+} в клетки превысит нормальный уровень, можно ожидать дальнейшее развитие изменений в результате механического разрушения сарколеммы, сопровождающегося быстрым развитием контрактуры. Следовательно, при постишемической реперфузии можно наблюдать по крайней мере 3 стадии кальциевой перегрузки: а) повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле, происходящее в начале реперфузии, которое обусловлено изменением распределения Ca^{2+} в ткани и поглощением его в обмен на Na^+ ; б) предположительное поступление Ca^{2+} через сарколемму, утечка которой возрастает или образуются «дырки» [18]; в) происходящее при развитии контрактуры механическое разрушение клеточной поверхности, включая вставочные диски.

Поступление Ca^{2+} при кальциевом парадоксе

Поступление Ca^{2+} при кальциевом парадоксе представляет собой более сложное явление. Известно, что перфузия миокарда бескальциевым раствором вызывает расхождение слоев, составляющих гликокаликс, образующий самый внешний слой комплекса клеточной поверхности. Гликокаликс можно разделить на два слоя: внешний и внутренний, и при перфузии бескальциевым раствором эти два слоя могут отделиться друг от друга. В этом случае внутреннее покрытие (или оболочка внутренней поверхности) остается прикрепленной к сарколемме и отделяется от внешнего покрытия (или внешнего слоя) заполненными жидкостью щелями. Некоторые исследователи [38] считают, что такое нарушение структуры клеточной поверхности приводит к легкой проницаемости расположенной под ней сарколеммы для ионов Ca^{2+} .

Дезорганизация гликокаликса является не единственным изменением строения клеточной поверхности. Вставочные диски оказываются разделенными относительно широкими щелями вместо того, чтобы образовывать плотное прикрепление [40]. Какой бы не была причина, вызывающая такое разрушение вставочных дисков, она может одновременно способствовать более легкому проникновению через них ионов Ca^{2+} .

В случае развития парадокса возникает дополнительная проблема, заключающаяся в том, что увеличение содержания Ca^{2+} не может быть первопричиной парадокса. Например, в недавних исследованиях было показано, что перфузия миокарда бескальциевым раствором, содержащим хелаторы Ca^{2+} , изменяет работу

медленных каналов, делая их проницаемым для ионов Na^+ [44]. Это будет способствовать небольшому повышению концентрации ионов Na^+ в цитозоле, которое может оказаться достаточным для активации $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена, приводящего к повышению тканевого содержания Ca^{2+} . Следовательно, совсем не обязательно предполагать, что основным [39] или единственным путем поступления Ca^{2+} в клетки при развитии парадокса являются медленные каналы. Нет также никаких оснований считать, что такой прирост содержания Ca^{2+} зависит от истощения запасов макроэргических фосфатов. Очевидно, что повышение содержания Ca^{2+} в ткани в таких условиях обусловлено достаточно сложными причинами.

Поступление Ca^{2+} при постипоксической реоксигенации

Объясняя развитие массивного поглощения ионов Ca^{2+} кардиомиоцитами, происходящего при постипоксической реоксигенации, очень трудно не сделать заключения, что часть Ca^{2+} поступает путем диффузии через механически поврежденную мембрану [45]. Однако некоторые исследователи утверждают, что повышенный вход Ca^{2+} отражает специфические изменения селективной проницаемости сарколеммы [41]. Независимо от справедливости этого мнения против повышенного поступления Ca^{2+} исключительно по медленным каналам свидетельствует тот факт, что Ca^{2+} -антагонисты, добавленные в перфузат при начале реоксигенации, не предотвращают увеличения содержания Ca^{2+} , хотя при добавлении их в перфузат до начала гипоксии они способствуют этому [46].

ПОСЛЕДСТВИЯ КАЛЬЦИЕВОЙ ПЕРЕГРУЗКИ И ЗАЩИТНЫЕ МЕРОПРИЯТИЯ

Из приведенного выше обсуждения очевидно, что может иметь место множество путей поступления Ca^{2+} в поврежденные кардиомиоциты. Кроме того, можно создать условия, при которых повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле не сопровождается таковым в ткани, а вызвано перераспределением Ca^{2+} внутри клеток. Независимо от причины последствия массивного поступления Ca^{2+} будут одни и те же: а) уменьшение внутриклеточных запасов АТФ вследствие чрезмерной активации Ca^{2+} -зависимых АТФаз; б) разрушение ткани в результате чрезмерной активации фосфолипаз и протеаз, а также, возможно, вследствие внутренних напряжений, обусловленных внезапным развитием контрактуры; в) нарушение функции митохондрий в результате легкости поглощения ими Ca^{2+} , что сопровождается угнетением окислительного фосфорилирования [8]; г) уменьшение содержания адениннуклеотидов вследствие выхода их из клеток во внеклеточное пространство.

Перечисленных факторов вполне достаточно, чтобы вызвать гибель клеток и некроз ткани. Каков же в таком случае механизм

действия защитных мероприятий. Наиболее вероятное объяснение механизма кардиопротекции заключается в том, что применение таких мер на ранней стадии развития неблагоприятных условий позволяет сохранить достаточное количество АТФ для поддержания на необходимом уровне гомеостаза не только Ca^{2+} , но и Na^{+} .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shen R. C., Jennings R. B.* Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. — *Amer. J. Pathol.*, 1972, vol. 67, p. 417—440.
2. *Nayler W. G.* The role of calcium in the ischemic myocardium. — *Amer. J. Pathol.*, 1981, vol. 102, p. 126—134.
3. *Nayler W. G., Ferrari R., Poole-Wilson P. A., Yopez C. E.* A protective effect of a mild acidosis on hypoxic heart muscle. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1979, vol. 11, p. 1053—1071.
4. *Atto L. E., Dhalla N. S.* Myocardial cation contents during induction of calcium paradox. — *Amer. J. Physiol.*, 1979, vol. 237, p. H713—H719.
5. *Nayler W. G., Grinwald P. M.* Dissociation of Ca^{2+} accumulation from protein release in calcium paradox: effect of barium. — *Amer. J. Physiol.*, 1982, vol. 242, p. H203—H210.
6. *Zimmerman A. N. E., Daems W., Hulsmann W. C. et al.* Morphological changes of heart muscle caused by successive perfusion with calcium-free and calcium containing solutions (calcium paradox). — *Cardiovasc. Res.*, 1967, vol. 1, p. 201—209.
7. *Nayler W. G.* Protection of the myocardium against post ischemic reperfusion damage: the combined effect of hypothermia and nifedipine. — *H. thorac.-cardiovasc. Surg.*, 1982 (in press).
8. *Nayler W. G., Ferrari R., Williams A.* Protective effect of pretreatment with verapamil, nifedipine and propranolol on mitochondrial function in the ischemic and reperfused myocardium. — *Amer. J. Cardiol.*, 1980, vol. 46, p. 242—248.
9. *Bourdillon P. D., Poole-Wilson P. A.* The effects of verapamil, quiescence, and cardioplegia on calcium exchange and mechanical function in ischemic rabbit myocardium. — *Circulat. Res.*, 1982, vol. 50, p. 360—368.
10. *Peng C. F., Kane J. J., Murphy M. L., Straub K. D.* Abnormal mitochondrial oxidative phosphorylation of ischemic myocardium reversed by Ca^{2+} -chelating agents. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1977, vol. 9, p. 897—908.
11. *Shen A. C., Jennings R. B.* Kinetics of calcium accumulation in acute myocardial ischemic injury. — *Amer. J. Pathol.*, 1972, vol. 67, p. 441—452.
12. *Shine K. I., Douglas A. M., Ricchiuri N. V.* Calcium, strontium, and barium movements during ischemia and reperfusion in rabbit ventricle: implications for myocardial preservation. — *Circulat. Res.*, 1978, vol. 43, p. 712—720.
13. *Carajoli E., Carajoli E.* The Ca^{2+} -pumping ATPase of heart sarcolemma: characterization, calmodulin dependence, and partial purification. — *J. Biol. Chem.*, 1981, vol. 256, p. 3263—3270.
14. *Reuter H.* Exchange of calcium ions in the mammalian myocardium: Mechanisms and physiological significance. — *Circulat. Res.*, 1974, vol. 34, p. 599—605.
15. *Langer G. A.* Sodium-calcium exchange in the heart. — *Ann. Rev. Physiol.*, 1982, vol. 44, p. 435—449.
16. *Tada M., Yamamoto T., Tonomura Y.* Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum. — *Physiol. Rev.*, 1978, vol. 58, p. 1—79.
17. *Carajoli E., Tiozzo R., Lugli G. et al.* The release of calcium from heart mitochondria by sodium. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1974, vol. 6, p. 361—371.
18. *Jennings R. B., Hawkins H. K., Lowe J. E. et al.* Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog. — *Amer. J. Pathol.*, 1978, vol. 92, p. 187—214.

19. *Jennings R. B., Remer K. A., Hill M. L., Mayer S. E.* Total ischemia in dog hearts, in vivo. 1. Comparison of high energy phosphate production, utilization, and depletions, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vivo vs. severe ischemia in vivo. — *Circulat. Res.*, 1981, vol. 49, p. 892—900.
20. *Jennings R. B., Reimer K. A.* Lethal myocardial ischemic injury. — *Amer. J. Pathol.*, 1981, vol. 102, p. 241—255.
21. *Reimer K. A., Jennings R. B., Hill M. L.* Total ischemia in dog hearts, in vitro. 2. High energy phosphate depletion and associated defects in energy metabolism, cell volume regulation, and sarcolemmal integrity. — *Circulat. Res.*, 1981, vol. 49, p. 901—911.
22. *Beckman J. K., Owens K., Knauer T. E., Weglicki W. B.* Hydrolysis of sarcolemma by lysosomal lipases and inhibition by chlorpromazine. — *Amer. J. Physiol.*, 1982, vol. 242, p. H652—H656.
23. *Chien K. R., Reeves J. P., Buja L. M.* et al. Phospholipid alterations in canine ischemic myocardium: temporal and topographical correlations with Tc-99m-PPi accumulation and an in vitro sarcolemmal Ca^{2+} permeability defect. — *Circulat. Res.*, 1981, vol. 48, p. 711—719.
24. *La Noue K. F., Watts J. A., Koch C. D.* Adenine nucleotide transport during cardiac ischemia. — *Amer. J. Physiol.*, 1981, vol. 241, p. H663—H671.
25. *Dunnnett J., Nayler W. G.* Effect of pH on calcium accumulation and release of isolated fragments of cardiac and skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. — *Biochim. biophys. Acta*, 1979, vol. 198, p. 434—438.
26. *Bersohn M. M., Philipson K. D., Fukushima J. Y.* Sodium-calcium exchange and sarcolemmal enzymes in ischemic rabbit hearts. — *Amer. J. Physiol.*, 1982, vol. 242, p. C288—C295.
27. *Katz A. M., Tada M.* The "stone heart" a challenge to the biochemist. — *Amer. J. Cardiol.*, 1972, vol. 29, p. 578—580.
28. *Feher J. J., Briggs F. N., Hess M. L.* Characterization of cardiac sarcoplasmic reticulum from ischemic myocardium: comparison of isolated sarcoplasmic reticulum with infractionated homogenates. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1980, vol. 12, p. 427—432.
29. *Locke F. S., Rosenheim O.* Contributions to the physiology of the isolated heart: the consumption of dextrose by mammalian cardiac muscle. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1907, vol. 36, p. 205—220.
30. *Chizzonite R. A., Zak R.* Calcium-induced cell death: susceptibility of cardiac myocytes is age-dependent. — *Science*, 1981, vol. 213, p. 1508—1510.
31. *Boink A. B. T. J., Ruigrok T. J., Zimmerman A. N. E.* Changes in high energy phosphate compounds of isolated rat hearts during Ca^{2+} with calcium. — *J. molec. Cell. Cardiol.*, 1976, vol. 8, p. 973—979.
32. *Alto L. E., Dhalla N. S.* Role of changes in microsomal calcium uptake in the effects of reperfusion of Ca^{2+} -deprived rat hearts. — *Circulat. Res.*, 1981, vol. 48, p. 17—24.
33. *Hearse D. J., Baker J. E., Humphrey S. M.* Verapamil and the calcium paradox. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1980, vol. 12, p. 733—740.
34. *Holland C. E. Jr., Olsson R. E.* Prevention by hyperthermia of paradoxical calcium necrosis in cardiac muscle. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1975, vol. 7, p. 917—928.
35. *Nayler W. G.* Cobalt, manganese and the calcium paradox. — *J. molec. cell. Cardiol. (Suppl. 2)*, 1982, vol. 14, p. 11.
36. *Bielecki K.* The influence of changes in pH of the perfusion fluid on the occurrence of the calcium paradox in the isolated rat heart. — *Cardiovasc. Res.*, 1969, vol. 3, p. 268—271.
37. *Muir A. R.* A calcium-induced contracture of cardiac muscle cells. — *J. Anat.*, 1968, vol. 102, p. 148—149.
38. *Crevey B. J., Langer G. A., Frank J. S.* Role of Ca^{2+} in the maintenance of rabbit myocardial cell membrane structural and functional integrity. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1981, vol. 10, p. 1081—1100.
39. *Grinwald P. M., Naylar W. G.* Calcium entry in the calcium paradox. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1981, vol. 3, p. 867—880.
40. *Winegrad S., Robinson T. F.* Force generation among cells in the relaxing heart. — *Europ. J. Cardiol. (Suppl.)*, 1978, vol. 7, p. 63—70.

41. *Harding D. P., Poole-Wilson P. A.* Calcium Exchange in rabbit myocardium during and after hypoxia: effect of temperature and substrate. — *Cardiovasc. Res.*, 1980, vol. 14, p. 435—445.
42. *New W., Trautwein W.* The ionic nature of slow inward current and its relation to a contraction. — *Pflügers. Arch.*, 1972, vol. 334, p. 24—38.
43. *Naylor W. G., Thompson J. E., Jarrott B.* The interaction of calcium antagonists (slow channel inhibitors) with myocardial alpha adrenoreceptors. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1982, vol. 14, p. 13—20.
44. *Krishtal O. A., Pidoplichko V. I., Shaknavalov Yu. A.* Conductance of the calcium channel in the membrane of snail neurones. — *J. Physiol.*, 1981, vol. 310, p. 410—434.
45. *Ganote C. E., Kaltenbach J. P.* Oxygen-induced enzyme release: early events and a proposed mechanism. — *J. molec. cell. Cardiol.*, 1979, vol. 11, p. 389—406.
46. *Naylor W. G., Fassold E., Yopez C.* Pharmacological protection of mitochondrial function in hypoxic heart muscle: effect of verapamil, propranolol and methylpridesolone. — *Cardiovasc. Res.*, 1978, vol. 12, p. 152—161.

Глава 19

СВЯЗЬ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ И ЗАЖИВЛЕНИЕ МИОКАРДА

В. К. ДЕ МЕЛЛО (W. C. De MELLO)

ВВЕДЕНИЕ

Внутриклеточная среда миокардиальных волокон, как и в других тканях, отделяется от внеклеточной жидкости с помощью изолирующего поверхностного слоя, обладающего высоким сопротивлением.

При повреждении клеточной мембраны возникает разность потенциалов между поврежденными и неповрежденными клетками (потенциал повреждения). В 1877 г. Engelmann показал, что вскоре после момента повреждения потенциал повреждения исчезает (рис. 19.1). Это интересное явление (заживление) можно объяснить тем, что клетки вблизи места повреждения деполяризуются и ток повреждения исчезает. Однако это неверно, так как потенциал повреждения может восстановиться вследствие повреждения клеток, окружающих первоначальную зону повреждения [1].

Во многих типах клеток повреждение клеточной поверхностной мембраны немедленно приводит к выходу протоплазмы из клетки через разрушенный участок. «Процесс заживления», позволяющий избежать потери большого количества внутриклеточного вещества, связан с образованием новой мембраны в поврежденной области. Он был описан у простейших, в икре рыб и в скелетной мышце [2].

Если волокно скелетной мышцы поместить в бескальциевой раствор Рингера, то не образуется пленка, закрывающая место повреждения, и разрушение мышцы начинает неуклонно распространяться. Таким образом, образование мембраны в месте повреждения существенно зависит от присутствия ионов Ca^{2+} [2]. Образование такой мембраны связывают с некоторой химической реакцией (реакция поверхностной преципитации), в которой участвует вещество, называемое «овотромбин», синтезируемое в клетке из предшественников в присутствии Ca^{2+} [2].

Происходит ли заживление миокарда вследствие образования новой мембраны в месте повреждения? Для того чтобы ответить на этот вопрос, необходимо выяснить, обеспечивает ли реакция поверхностной преципитации достаточную электрическую изоляцию. Известно, что процесс заживления в том виде, в котором он описан для миокарда, не наблюдается в скелетной мышце, где токи повреждения распространяются вдоль волокна, деполяризуя

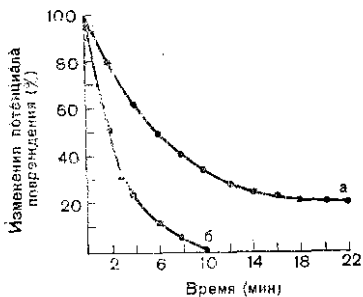


Рис. 19.1. Заживление миокарда желудочка сердца жабы, помещенного в нормальный раствор Рингера (б). Кривая (а) показывает влияние бескальциевого раствора на процесс заживления. По [18].

за несколько секунд [4]. Некоторые наблюдения позволяют предположить, что в этом процессе принимают участие липиды мембраны. Известно, что ионы Ca^{2+} сшивают фосфолипидные пленки [5], а фосфолипиды С нарушают процесс заживления при высокой концентрации Ca^{2+} в растворе [4].

Так как образование новой мембраны в поврежденной области не создает достаточно эффективного ионного барьера в нормальных условиях, то разумно сделать вывод, что заживление миокарда нельзя объяснить реакцией поверхностной преципитации. Другое возможное объяснение заключается в том, что между поврежденными и неповрежденными клетками возникает высокий омный барьер.

В миокарде желудочка сердца лягушки деполяризация, вызванная повреждением, быстро исчезает независимо от размера препарата. Этот результат позволил Rotschuch [3] выдвинуть гипотезу, что миокард состоит из маленьких функциональных единиц («Mikroelementen»), разделенных поляризованными ионными барьерами.

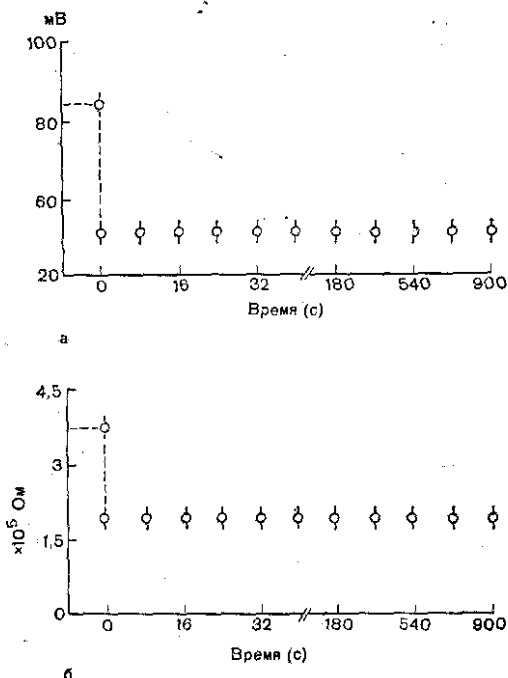
Последующие исследования Weidmann [6] показали, что волокна Пуркиньи имеют низкое продольное сопротивление (105 Ом·см), а постоянная длины (1,9 мм) превышает длину одиночной клетки (около 125 мкм). Этот результат позволяет с уверенностью отвергнуть возможность разделения миокардиальных клеток постоянными барьерами для ионов.

В действительности же доказано, что между миокардиальными клетками имеется электрическое сопряжение [6—9]. Если один конец пучка миокардиальных волокон желудочка поместить в раствор, содержащий радиоактивный K^+ , а другой непрерывно перфузировать нерадиоактивным раствором Тироде, то постоянный уровень тканевого содержания $^{42}\text{K}^+$ достигается приблизительно за 6 ч [10]. К концу этого периода значительное количество $^{42}\text{K}^+$ обнаруживается и в половине мышцы, помещенной в обычный

его целиком [3]. В изолированном волокне портняжной мышцы небольшое повреждение, вызванное проколом клеточной мембраны микроэлектродом, приводит к необратимой деполяризации волокна (рис. 19.2) [4].

Таким образом, в нормальных условиях восстановление мембраны в области повреждения еще недостаточно для обеспечения электрической изоляции. В связи с этим интересно отметить, что если скелетную мышцу поместить в изотонический раствор хлорида кальция, то деполяризация мышечного волокна, вызванная небольшим повреждением, полностью исчезает

Рис. 19.2. Отсутствие заживления волокон скелетной мышцы лягушки, помещенных в нормальный раствор Рингера. Наблюдается необратимое падение потенциала покоя (а) и входного сопротивления (б), вызванные проколом клеточной мембраны с помощью микроэлектрода (около 4 мкм в диаметре). Каждая кривая получена путем усреднения данных, полученных на 25 волокнах. Вертикальная пунктирная линия отмечает момент повреждения. Вертикальные линии в каждой точке соответствуют стандартной ошибке среднего значения. По [4].



раствор Тироде. Экспоненциальный спад радиоактивности вдоль длины мышцы характеризуется постоянной длиной 1,55 мм, что явно указывает на отсутствие препятствий перемещению $^{42}\text{K}^+$ в продольном направлении в местах межклеточных контактов [10]. Количественный анализ этих результатов позволил сделать вывод, что проницаемость межклеточных контактов приблизительно в 5000 раз выше, чем обычной мембраны вне зоны контактов.

Межклеточные каналы проницаемы также и для других молекул. Имеются данные о диффузии между клетками красителя Procion Yellow (молекулярная масса 697) [11], ионов тетраэтиламмония (молекулярная масса 130) [12], ^{14}C -цАМФ (молекулярная масса 328) [13] и флюоресцеина (молекулярная масса 330) [14, 15].

Недавно в качестве флюоресцентного зонда Stewart [16] предложил новое соединение: Lucifer Yellow (молекулярная масса 473), которое оказалось исключительно полезным для изучения межклеточных взаимодействий. Краситель Lucifer Yellow является sui generis: он не диффундирует через мембрану вне зоны контактов, но проходит через межклеточные контакты в ряде тканей [16, 17]. Проведенные в нашей лаборатории исследования показали, что этот краситель диффундирует вдоль трабекулы сердца собаки, если его ввести внутрь клетки при помощи метода «рассечения конца» [11]. Как показано на рис. 19.3, присутствие красителя через $1\frac{1}{2}$ ч после его введения внутрь клеток может быть обнаружено спектрофлуорометрическими методами на расстоянии 4 мм от резиновой мембраны, разделяющей отсеки.

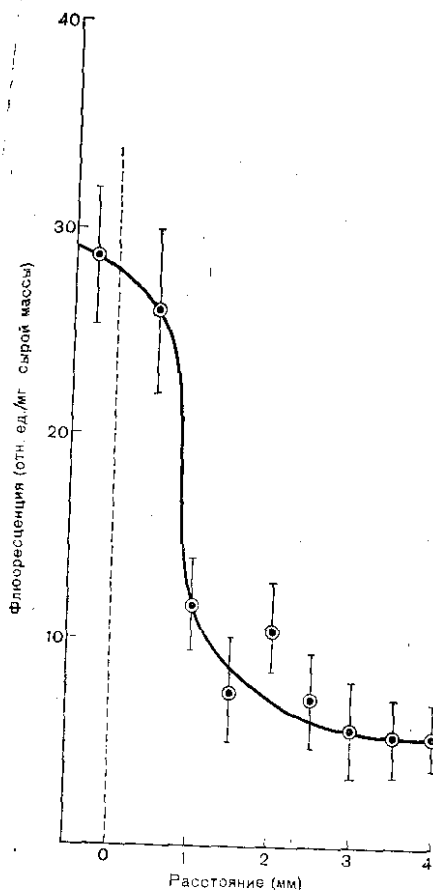


Рис. 19.3. Диффузия Lucifer Yellow в продольном направлении вдоль оси трабекулы ткани сердца собаки, помещенной в нормальный раствор Тироде. Продолжительность периода диффузии — 90 мин. Вертикальная пунктирная линия разделяет область инъекции красителя (слева) от свободной области (справа). Усреднение по 20 препаратам. Вертикальные линии в каждой экспериментальной точке соответствуют стандартному отклонению. [De Mello, Castillo, неопубликованные данные.]

Ответ на вопрос, обусловлено ли движение красителя в продольном направлении межклеточной диффузией, можно получить, проведя исследования его отмывания. На рис. 19.4 показано, что кривая отмывания для Lucifer Yellow состоит из быстрого компонента ($t_{1/2} = 1,8$ мин), который соответствует выходу Lucifer Yellow из межклеточного пространства, и более медленного компонента, коррелирующего с выходом красителя через поверхност-

ную мембрану клеток. Время полувыведения для второго компонента исключительно велико ($t_{1/2} = 2 \times 10^3$ мин), что подтверждает существование низкой проницаемости поверхностной мембраны клеток для Lucifer Yellow. Полученные данные означают, что краситель диффундирует вдоль миокардиальных волокон через межклеточные каналы.

Так как миокардиальные клетки соединены каналами с низким сопротивлением, можно предположить, что в результате повреждения проводимость контактов значительно уменьшается, что приводит к угнетению токов повреждения из поврежденных клеток в неповрежденные [18]. Вместе с тем известно, что значительную роль в процессе заживления играют ионы Ca^{2+} [18—20]. Эти наблюдения позволили выдвинуть гипотезу о том, что проводимость контактов может изменяться при изменении внутриклеточной концентрации свободных ионов Ca^{2+} [20]. Для проверки этой гипотезы я вводил ионофоретически ионы Ca^{2+} внутрь миокардиальной клетки и изучал возможные изменения сопротивления межклеточных контактов. Обнаруживалось, что при инъек-

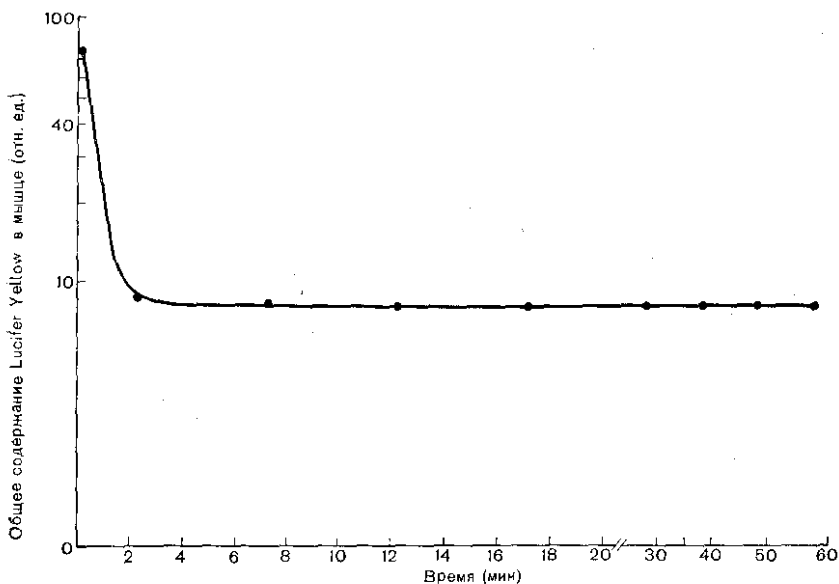


Рис. 19.4. Выход Lucifer Yellow из трабекулы сердца собаки. На кривой вымывания виден первый быстрый компонент ($t_{1/2} = 1,8$ мин) и исключительно медленный второй компонент ($t_{1/2} = 2 \times 10^3$ мин). Температура 37°C . [De Mello, Castillo, неопубликованные данные.]

при Ca^{2+} межклеточное сопряжение постепенно ухудшается, и полное разобщение клеток достигается приблизительно через 600 с [9, 20] (рис. 19.5). Одновременно с ухудшением связи между клетками заметно увеличивается входное сопротивление (V_0/I_0) той клетки, в которую введены ионы Ca^{2+} (см. рис. 19.5). Оба эффекта Ca^{2+} являются полностью обратимыми. Авторы и работы [21] при помощи акворина показали, что при инъекции ионов Ca^{2+} в клетки слюнных желез *Chironomus* быстрое ухудшение электрического сопряжения начинается в момент, когда акворин начинает люминесцировать во всей клетке, вплоть до области межклеточных контактов.

Эти данные указывают на то, что процесс заживления, вероятно, обусловлен значительным повышением электрического сопротивления межклеточных контактов, расположенных между нормальными и поврежденными клетками, и связан с повышением внутриклеточной концентрации свободных ионов Ca^{2+} .

Механизм влияния ионов Ca^{2+} на сопротивление контактов неизвестен. Заслуживают внимания две гипотезы: 1. Ионы Ca^{2+} связываются с отрицательными полярными группами фосфолипидов мембраны нексусов и блокируют проницаемость гидрофильных каналов. Фосфолипиды и белки являются нормальными компонентами мембраны нексусов [22]. 2. Ca^{2+} активирует некоторую реакцию, катализируемую ферментом, которая приводит к закрыванию межклеточных каналов вследствие конформационного изменения

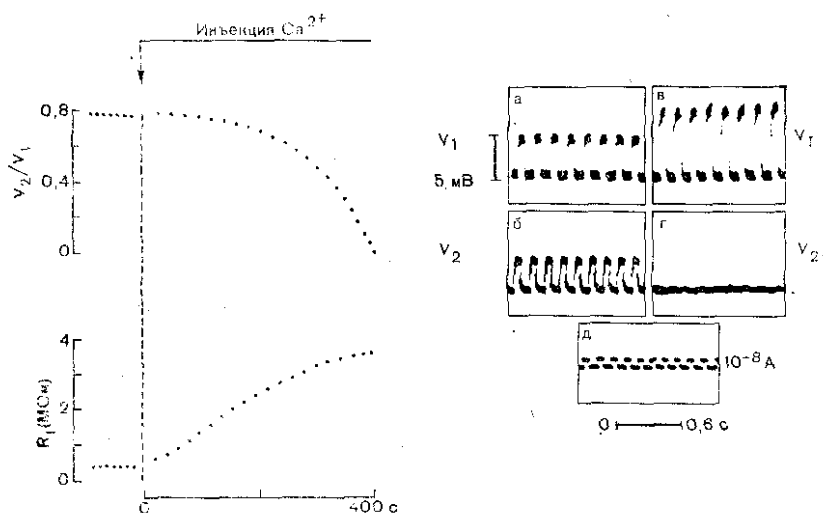


Рис. 19.5. Влияние внутриклеточного введения Ca^{2+} на электрическое сопряжение между проводящими кардиомиоцитами.

Слева: типичное влияние инъекции Ca^{2+} на коэффициент сопряжения $(V_2/V_1)_0$ и входное сопротивление (r_1) (усреднено по 6 экспериментам); справа: а, б — V_1 и V_2 в контроле, в, г — записи, полученные через 410 с после введения Ca^{2+} , на которых видно разобщение клеток. [De Mello, неопубликованные данные.]

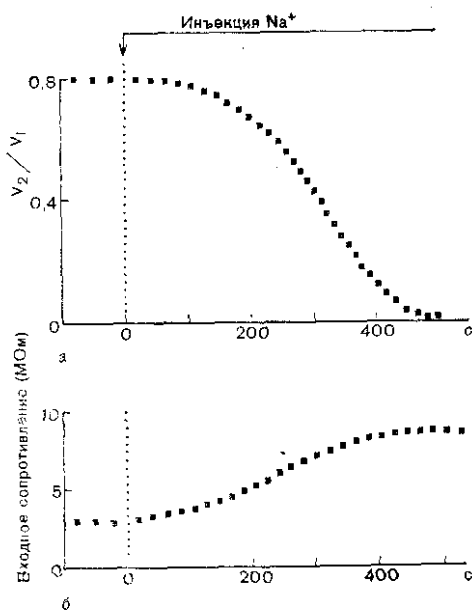
белков, входящих в состав нексуса. Так как внутриклеточная инъекция La^{3+} вызывает быстрое разобщение клеток [23], разумно предположить, что проницаемость каналов определяется связыванием катионов с отрицательными группами в области нексуса.

ВЛИЯНИЕ $Na^+—Ca^{2+}$ -ОБМЕНА НА СОПРЯЖЕНИЕ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ

В миокарде, как и в нервной ткани, выведение Ca^{2+} из клеток зависит от энергии в виде градиента концентрации Na^+ относительно мембраны [24, 25]. Na^+/K^+ -насос создает электрохимический градиент ионов Na , который используется в качестве источника энергии для выведения Ca^{2+} из клетки. Направление $Na^+—Ca^+$ -обмена может измениться на противоположное при увеличении внутриклеточной концентрации ионов Na^+ , в результате чего повысится поступление Ca^{2+} в клетки [26].

Если повышение $[Na^+]_i$ приводит к реверсии $Na^+—Ca^+$ -обмена, то возникает справедливый вопрос: может ли внутриклеточное введение ионов Na^+ ухудшать сопряжение между клетками? На этот вопрос был получен утвердительный ответ. При ионофоретическом введении Na^+ в миокардиальную клетку возрастает продольное межклеточное сопротивление и происходит разобщение клеток [27, 28] (рис. 19.6). Угнетение электрического сопря-

Рис. 19.6. Типичный эффект внутриклеточного введения Na^+ на электрическое сопряжение (V_2/V_1) (а) и входное сопротивление (б) проводящего кардиомиоцита собаки. По [28].



жения, вызываемое высокой внутриклеточной концентрацией Na^+ , зависит от внеклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . При низкой величине $[\text{Ca}^{2+}]_o$ влияние инъекции Na^+ на связь между клетками очень незначительно [28], подтверждая предположение, что подавление электрического сопряжения достигается путем активации $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена, что в результате приводит к повышению внутриклеточной концентрации свободных ионов Ca^{2+} .

ЗАТРАТЫ НА ПОДДЕРЖАНИЕ СВЯЗИ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ

Так как повышение $[\text{Na}^+]_i$ ухудшает и даже устраняет электрическое сопряжение между миокардиальными клетками, кажется разумным, что угнетение Na^+/K^+ -насоса также способно влиять на связь между клетками. И действительно, воздействие оубаина в определенных концентрациях на миокардиальные волокна приводит к значительному увеличению продольного межклеточного сопротивления и в конце концов вызывает разобщение клеток [28, 29]. Влияние гликозидов на сопряжение между клетками преимущественно опосредовано повышением $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Поэтому время, необходимое для разобщения клеток при действии оубаина, зависит от внеклеточной концентрации ионов Ca^{2+} [29].

Активация Na^+/K^+ -насоса норадреналином в волокнах Пуркинье частично деполяризованных вследствие повреждения при выделении их из сердца, вызывает повышение абсолютной величины потенциала покоя и улучшение электрического сопряжения между миокардиальными клетками [30].

Эти наблюдения позволяют сделать вывод, что механизм выведения ионов Na^+ из клеток оказывает значительное влияние на передачу электрических и химических сигналов между клетками. Изменение проницаемости контактов вследствие изменения $[\text{Na}^+]_i$ является результатом повышения или понижения $[\text{Ca}^{2+}]_i$, что в свою очередь связано со скоростью $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена.

Скорость транспорта Na^+ через обычную мембрану вне области контакта имеет значение также для поддержания высокой скорости проведения.

Известно, что скорость проведения (θ) пропорциональна $1/\sqrt{a g_1}$, где a — диаметр волокна; g_1 — продольное внутриклеточное сопротивление. В отличие от предыдущих наблюдений в данном случае продольное внутриклеточное сопротивление рассматривается в качестве переменного параметра, который, кроме всего, зависит от $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [9, 31]. Следовательно, повышение g_1 приводит к уменьшению скорости проведения в миокардиальных волокнах.

Однако поддержание высокой проницаемости контактов требует определенных затрат. Клетка должна расходовать энергию на введение ионов Na^+ и поддержание низкой внутриклеточной концентрации свободных ионов Ca^{2+} . Все энергозависимые процессы в миокардиальных клетках используют энергию АТФ, синтезируемого в митохондриях в результате окислительного фосфорилирования, а также образующегося при гликолизе. Угнетение энергетического метаболизма снижает скорость работы систем активного транспорта ионов вследствие уменьшения скорости ресинтеза АТФ. Например, 2,4-динитрофенол, разобщающий окислительное фосфорилирование, повышает продольное внутриклеточное сопротивление миокардиальных волокон, ухудшает межклеточное сопряжение и угнетает диффузию флуоресцеина между клетками [15]. Такое действие динитрофенола связано с повышением $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [15], так как внутриклеточная инъекция ЭДТА на фоне действия динитрофенола позволяет частично восстановить электрическое сопряжение. Хотя эти исследования показывают, что проницаемость контактов может изменяться градуально, пока еще не ясно, происходит ли изменение числа активных межклеточных каналов при изменении $[\text{Ca}^{2+}]_i$, или же в этом процессе принимают участие все каналы одновременно.

ВЛИЯЕТ ЛИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ pH_i НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ КОНТАКТОВ?

В 1977 г. Turin, Warner [32] показали, что при насыщении среды, в которой содержатся эмбриональные клетки Xenopus, углекислым газом (100% CO_2), не только приводит к снижению pH_i , но вызывает также деполяризацию клеток и их разобщение.

Позднее было показано, что внутриклеточное введение ионов H^+ в миокардиальные клетки увеличивает продольное внутриклеточное сопротивление, и вызывает разобщение клеток [33, 34]. Сообщалось об аналогичном повышении g_1 в волокнах Пуркинье сердца овцы при насыщении перфузата углекислым газом (100% CO_2) [35].

Однако остается невыясненным вопрос, обусловлено ли действие пониженного pH_i на электрическое сопряжение повышением $[\text{Ca}^{2+}]_i$. В клетках слюнных желез *Spigonomus* [36] или в мышце рачков [37] изменения pH_i , связанные с повышением P_{CO_2} , про-

исходят одновременно с увеличением $[Ca^{2+}]_i$. Воздействие раствора с высоким P_{CO_2} на волокна Пуркинье сердца овцы приводит к снижению pH_i , но $[Ca^{2+}]_i$ также уменьшается [38]. Заживление миокарда, связанное с резким повышением сопротивления контактов [20], можно осуществить в растворе, не содержащем Ca^{2+} , но с pH_o 5,0 [De Mello, неопубликованные данные].

Приведенные выше наблюдения позволяют предположить, что ионы H^+ непосредственно влияют на сопротивление межклеточных контактов миокардиальных волокон. В эмбриональных клетках *Fundulus* закисление цитозола вызывает разобщение клеток: этот эффект обусловлен прямым взаимодействием протонов с молекулами межклеточного контакта [39].

Так как буферная емкость миокардиальных клеток очень велика [40], то неясно, играет ли pH_i какую-либо значительную роль в регуляции сопротивления контактов в физиологических условиях. Однако при ишемии миокарда, когда снижается и pH_i , и pH_o , легко показать, что ионы H^+ имеют определенное значение для процесса заживления, позволяя предотвратить распространение токов повреждения и утечку метаболитов между поврежденными и нормальными клетками [31].

цАМФ И МЕЖКЛЕТОЧНОЕ СОПРЯЖЕНИЕ

Существует тесная взаимосвязь между ионами Ca^{2+} и циклическими нуклеотидами в процессе модуляции функции клеток при действии гормонов [41]. Имеются данные о том, что Ca^{2+} в некоторых случаях играет важную роль в качестве вторичного мессенджера. По-видимому, внутриклеточная концентрация свободных ионов Ca^{2+} принимает участие в регуляции концентрации цАМФ. Например, являясь активатором гуанилатциклазы [41], ионы Ca^{2+} уменьшают внутриклеточную концентрацию цАМФ частично вследствие инактивации аденилатциклазы [42].

Эти данные позволяют поставить еще один важный вопрос: принимают ли циклические нуклеотиды участие в регуляции проницаемости нексусов? В слюнных железах *Drosophila* цАМФ улучшает сопряжение между клетками [43].

Недавно были проведены исследования воздействия на миокардиальные волокна желудочка сердца крысы теофиллина (0,4 мМ), являющегося ингибитором фосфодиэстеразы. Результаты свидетельствуют об увеличении скорости распространения электрической активности и скорости проведения [44]. Так как это соединение не влияет на постоянную времени клеточной мембраны, то, по-видимому, можно сделать вывод, что увеличение постоянной длины (на 59%) не связано с изменением сопротивления неспецифической мембраны вне области контактов. Расчеты продольного внутриклеточного сопротивления (r_i) на основе скорости проведения (θ) и постоянной времени подножия потенциала действия ($\tau_{tot} = 1/[\theta^2 \cdot r_i C_m]$) показали, что в этих условиях r_i уменьшается [44].

На основании предположения, что теофиллин не влияет на сопротивление миоплазмы, приведенные выше данные указывают, что это соединение улучшает межклеточное сопряжение путем снижения сопротивления контактов.

Влияние теофиллина на электрическое сопряжение, по-видимому, связано с повышением внутриклеточной концентрации цАМФ. Например, если миокардиальные волокна подвергнут действию дибутирил-цАМФ (5×10^{-5} М), то скорость проведения возрастает, а τ_1 уменьшается [Estate, De Mello, неопубликованные данные]. Известно, что цАМФ активирует протеинкиназу, которая в присутствии АТФ катализирует фосфорилирование различных белков [45]. Следовательно, фосфорилирование белков нексуса может вызывать конформационные изменения их структуры, что способно привести к увеличению диаметра межклеточных каналов.

Возможность взаимодействия между Ca^{2+} и циклическими нуклеотидами в процессе регуляции проницаемости контактов, по-видимому, представляет новый аспект в исследовании связи между клетками.

Например, Ham и сопр. [46] обнаружили, что повышенное содержание Ca^{2+} в перфузате вызывает уменьшение содержания цАМФ в перфузируемых сердцах крыс. И наоборот, в экспериментах на папиллярной мышце эти авторы наблюдали увеличение концентрации цАМФ при перфузии бескальциевым раствором [47].

Так как значительное повышение концентрации цАМФ вызывает усиление проницаемости неспецифической сарколеммы вне области контактов для ионов Ca^{2+} [48, 49], то разумно предположить, что влияние цАМФ на межклеточное сопряжение зависит от концентрации этого нуклеотида. Небольшое увеличение содержания цАМФ может приводить к уменьшению τ_1 вследствие фосфорилирования белков нексуса, в то время как значительное повышение концентрации этого нуклеотида может вызывать ухудшение связи между клетками в результате повышения внутриклеточной концентрации свободных ионов Ca^{2+} . Это предположение подтверждается тем, что теофиллин в низкой концентрации (0,4 мМ) улучшает межклеточное сопряжение [44], а в высокой концентрации (4 мМ) — ухудшает его [50].

РОЛЬ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ СВЯЗЕЙ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

В основе структурной организации миокарда лежат изолированные функциональные единицы, связанные между собой низкоомными межклеточными каналами. Такая морфологическая структура позволяет электрическому возбуждению проходить по миокардиальным волокнам без задержки, поэтому все клетки сердца возбуждаются синхронно. В отличие от скелетной мышцы, в

которой продольное внутриклеточное сопротивление обусловлено исключительно сопротивлением миоплазмы, в сердце важным фактором, влияющим на распространение электрического возбуждения, является сопротивление межклеточных контактов (нексусов). При уменьшении их сопротивления, например, при увеличении содержания цАМФ, скорость распространения возбуждения значительно возрастает. Вместе с тем при повышении $[Ca^{2+}]_i$ или понижении pH_i внутри клеток проводимость межклеточных каналов уменьшается, ухудшая условия проведения возбуждения. В таком случае возникает медленное проведение, способствующее возникновению нарушений ритма сердца. Данные о том, что сопротивление контактов в значительной мере зависит от метаболической энергии, необходимой для откачивания ионов Na^+ из клеток и поддержания $[Ca^{2+}]_i$ на низком уровне, указывают, что такие параметры, как скорость проведения, также зависят от энергетического метаболизма и синтеза АТФ. Нарушения сердечного ритма, вызванные токсическим действием дигиталиса или ишемией миокарда, частично обусловлены повышением $[Ca^{2+}]_i$ или снижением pH_i внутри клеток. В обоих случаях электрическое сопряжение между клетками значительно ухудшается или происходит полное разобщение клеток, что частично обусловлено деполяризацией сарколеммы, но также связано и с существенным повышением сопротивления межклеточных контактов [3].

В АВ-узле размер и количество нексусов меньше, чем в предсердии или желудочке [51, 52], а продольное внутриклеточное сопротивление в норме выше [53]. Это частично позволяет объяснить задержку проведения возбуждения, характерную для этой области сердца. В АВ-узле проведение импульса оказывается более чувствительным к дальнейшему росту сопротивления контакта, чем в миокарде предсердий или желудочков. Известно, что так называемое явление усталости в АВ-узле зависит от частоты возбуждения. Объяснение такого явления сводится к тому, что при высокой частоте возбуждения увеличивается сопротивление нексусов, что, возможно, обусловлено повышением $[Ca^{2+}]_i$. Так как число гидрофильных каналов, соединяющих узловые клетки, очень мало, а генерация потенциала действия зависит от медленного тока, переносимого ионами Ca^{2+} и Na^+ [54], то следует ожидать существенной зависимости проведения возбуждения в АВ-узле от частоты стимуляции.

Действительно, получены данные о том, что продольное внутриклеточное сопротивление миокардиальных волокон повышается при стимуляции с высокой частотой [55].

Благодаря изолированному расположению отдельных элементов миокарда «гибель одной клетки не обязательно означает гибель окружающих клеток». Повреждение поверхностной клеточной мембраны приводит к повышению $[Ca^{2+}]_i$, значительному ухудшению связи между клетками и уменьшению тока повреждения, который в противном случае вызвал бы деполяризацию большой массы нормальных клеток. Процесс заживления действительно является важным механизмом защиты при повреждении.

48. *Reuter H.* Properties of two inward membrane currents in the heart. — *Ann. Rev. Physiol.*, 1979, vol. 41, p. 413—424.
49. *Sperelakis N.* Changes in membrane electrical properties during development of the heart. — In: *The slow inward current and cardiac arrhythmias*/Ed. D. P. Zipes, J. C. Bailey, V. Elharrar. The Hague: Martinus Nijhoff, 1980, p. 221.
50. *De Mello W. C.* Cell-to-cell diffusion of fluorescein in heart fibers. — *Fed. Proc.*, 1978, vol. 37, p. 3.
51. *James T. N., Scherf L.* Ultrastructure of the atrioventricular node. — *Circulation*, 1968, vol. 37, p. 1049—1070.
52. *Masson-Pevet M.* The fine structure of cardiac pacemaker cells in the sinus node and in tissue culture. Thesis. Amsterdam: Rodopi.
53. *De Mello W. C.* Passive electrical properties of the atrioventricular node. — *Pflügers Arch.*, 1977, vol. 37, p. 135—139.
54. *Mendez C., Moe G. K.* Atrioventricular transmission. — In: *Electrical phenomena in the heart*/Ed. W. C. De Mello. New York: Academic, 1972, p. 263—291.
55. *Bredikis J., Bukauskas F., Vereikis R.* Decreased intercellular coupling after prolonged rapid stimulation in rabbit atrial muscle. — *Circulat. Res.*, 1981, vol. 49, p. 815—820.

Глава 20

ДЕЙСТВИЕ КАРДИТОКСИНОВ НА ИОННЫЕ КАНАЛЫ МЕМБРАНЫ

М. ЛАЗДУНСКИЙ, Дж. Ф. РЕНО (M. LAZDUNSKI, J. F. RENAUD)

ВВЕДЕНИЕ

В основе нормального электрогенеза и автоматизма сердца лежат изменения различных ионных токов и проводимостей. Некоторые лекарства и терапевтические препараты влияют на мембраны миокардиальных клеток, более или менее специфически воздействуя на натриевые, кальциевые и калиевые каналы.

Одним из наиболее замечательных достижений нейробиологии за последние 10 лет явилось изучение большого количества нейротоксинов, синтезируемых микроорганизмами, растениями, змеями, скорпионами, паукообразными и морскими животными. Изучение любого токсина имеет большое значение, так как вследствие его исключительной специфичности и высокого сродства к соответствующему рецептору его можно использовать для тонкого фармакологического анализа важных физиологических функций. Многие из нейротоксинов являются одновременно и кардиотоксинами.

В данной главе приводится обзор свойств естественных соединений, токсических для миокардиальных клеток в результате воздействия на плазматическую мембрану [1]. Не рассмотрены токсины, специфически влияющие на нервные окончания, на запасание и освобождение нейромедиаторов, например, α -латротоксин, ботулиновый токсин, токсин, вызывающий тетанус, β -бунгаротоксин и крототоксин [2].

Оказывается, что большинство наиболее интересных кардиотоксинов специфически действуют на быстрые натриевые каналы миокардиальных клеток.

ТОКСИНЫ, СПЕЦИФИЧНЫЕ ДЛЯ БЫСТРОГО НАТРИЕВОГО КАНАЛА

Тетродотоксин и сакситоксин

Тетродотоксин (ТТХ) (рис. 20.1) является гетероциклическим гуанидином, который был обнаружен в организме рыбы-собака, а также животных некоторых других видов: тритонов, осьминогов, лягушек и бычков. ТТХ вызывает обратимое ингибирование быстрого натриевого тока в миелинизированных нервах, скелетной

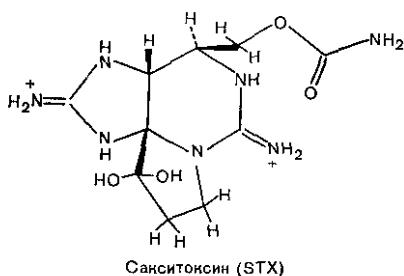
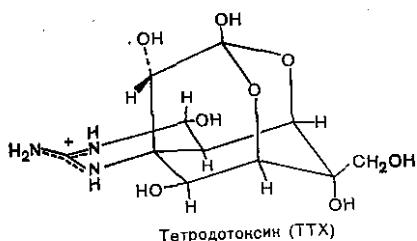


Рис. 20.1. Структурные формулы тетродотоксина и сакситоксина.

мышце и ряде других возбудимых клеток [3]. Концентрационная зависимость действия ТТХ имеет гиперболическую форму, причем половина максимального эффекта достигается в интервале 1—5 нМ в зависимости от типа препарата нервной ткани [4, 5].

Сакситоксин (СТХ), подобно ТТХ, является гетероциклическим гуанидином, имеющим две гуанидиновых группы на одну молекулу токсина вместо одной как у ТТХ (см. рис. 20.1). Он синтезируется в *Gonyaulax*, относящегося к жгутиковым, и обнаружен в высокой концентрации в моллюсках (панцирные рыбы), питающихся этими организмами. ТТХ и СТХ одинаково действуют на быстрые натриевые каналы и оба специфичны для этих каналов [3, 6]. Ингибирующее действие СТХ на

быстрые натриевые каналы также обратимо; кривая доза — эффект имеет гиперболическую форму, и половина максимального ингибирования достигается при 1—5 нМ [6].

Количественное биохимическое изучение связывания ТТХ и СТХ с соответствующим рецептором стало возможно благодаря использованию ТТХ или СТХ [6], в состав которых введен тритий [³H] по методу Вилзбаха. В настоящее время синтезированы новые аналоги с высокой удельной радиоактивностью, полученные в результате химической модификации ТТХ [7]. Синтезирован также аналог ТТХ, активируемый при облучении, так что последнее может вызвать необратимый блок натриевых каналов [8]. Было выдвинуто предположение, что ТТХ и СТХ связываются с селективным фильтром натриевого канала [6, 9]. Согласно этому, гуанидиновая группа ТТХ или СТХ проникает в натриевый канал подобно свободному катиону гуанидия, а остальная часть молекулы, имеющая более крупные размеры, перекрывает входное отверстие канала как пробка и блокирует прохождение по нему ионов Na⁺. По-видимому, гидроксильные группы молекулы токсина принимают участие в образовании водородных связей с белком натриевого канала, стабилизируя связь токсина с каналом. Однако проведенные недавно эксперименты по химической модификации натриевого канала не полностью подтверждают такой механизм образования связи. Связывание ТТХ необратимо устраняется при обработке препаратов мембран нервных волокон реагентами, влияющими на карбоксильные группы [10—12], что свиде-

тельствует о важной роли последней в рецепторном участке токсина. Если ТТХ связывается с селективным фильтром, позволяющим каналу отличать ионы Na^+ от других ионов, то такая химическая модификация белка канала должна также блокировать его проводимость. Однако натриевые каналы, ставшие нечувствительными к ТТХ в результате химической модификации, тем не менее принимают участие в генерации потенциала действия с той же кинетикой активации и инактивации, с той же ионной селективностью и лишь со слегка уменьшенной проводимостью одиночного канала [13, 14]. Рецептор к ТТХ был солюбилизован и частично очищен из ткани электрического органа *Electrophorus electricus*, из ткани мозга и мышцы крысы [15—17].

Наиболее достоверные данные [15] показывают, что место связывания расположено в полипептиде с молекулярной массой от 250 000 до 270 000 дальтон в соответствии с результатами, полученными независимым методом в экспериментах с инактивацией при облучении [18, 19].

Наиболее характерной чертой действия ТТХ на миокард млекопитающих является относительно низкая чувствительность миокарда. Значительное уменьшение скорости нарастания потенциала действия в трабекулах желудочков и волокнах Пуркинье сердца происходит лишь в случаях, когда концентрация ТТХ достигает 1 мкМ [20, 21]. В предварительной серии экспериментов, цель которых состояла в выяснении вопроса, действительно ли различие в чувствительности к ТТХ отражает фундаментальное отличие рецептора к ТТХ в миокарде от рецептора скелетной мышцы или нервной ткани, было обнаружено, что блокирование быстрых натриевых каналов при действии ТТХ зависит от потенциала [22]. В этих экспериментах было показано, что чувствительность натриевых каналов к ТТХ существенно возрастает при деполяризации мембраны. Такая особенность действия ТТХ на быстрые натриевые каналы в действительности характерна только для миокарда, так как она никогда не наблюдается в нервной ткани. Однако выводы, сделанные в этой работе, вызвали сомнение на том основании, что результаты основывались на измерении скорости нарастания потенциала действия, которая не способна точно отражать изменения натриевой проводимости. Позднее несколько групп исследователей провели эксперименты, в которых не была обнаружена зависимость от потенциала для установившегося блокирования тетродотоксином быстрого и фонового натриевых токов, измеряющихся непосредственно в условиях фиксации потенциала [21, 23, 24]. Блокирование натриевых каналов при действии ТТХ на волокна Пуркинье сердца собаки и кролика в условиях фиксации потенциала хорошо описывается реакцией связывания со стехиометрией 1 : 1, причем константа диссоциации равна 1 мкМ и не зависит от потенциала [21, 23, 24]. Такая константа диссоциации на три порядка больше, чем константа диссоциации для взаимодействия ТТХ с рецептором в мембране нервных клеток [6].

В действительности, средство ТТХ к соответствующему рецеп-

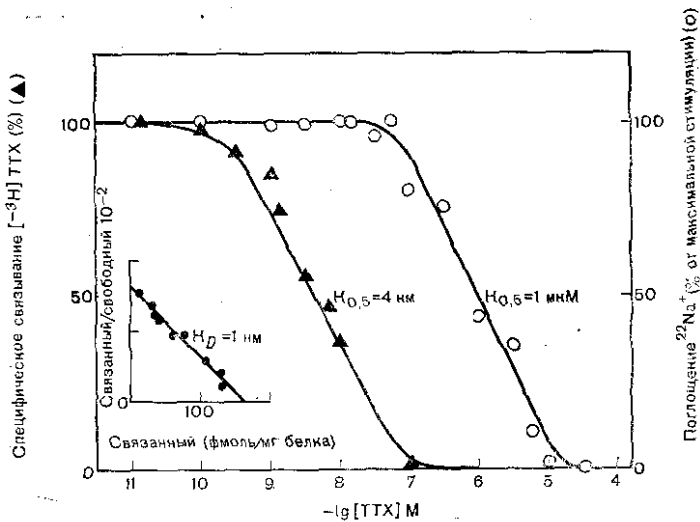


Рис. 20.2. Действие ТТХ на натриевые каналы миокарда желудочка сердца крысы. На вставке в координатах Скэтчарда представлены данные по специфическому связыванию [³H]-ТТХ (темные кружки) и вытеснению специфически связанного [³H]-ТТХ в гомогенате миокарда крысы при действии ТТХ (темные треугольники). Этот график позволяет рассчитать константу диссоциации комплекса [³H]-ТТХ с рецептором (K_D) и константу полувыведения [³H]-ТТХ (K_{0.5}), которые оказались равными 1 нМ и 4 нМ соответственно. Измерение уменьшения скорости входа 22 Na⁺ при действии ТТХ (светлые кружки) показывает, что половина эффекта ТТХ (K_{0.5}) достигается при 1 мкМ.

тору в миокарде, по-видимому, в значительной степени зависит от вида животного. Например, в предсердных трабекулах лягушки константа диссоциации для комплекса ТТХ-рецептор, измеренная в условиях фиксации потенциала, оказалась равной 3,4 нМ и не зависела от потенциала [25]. Эта величина близка к константе диссоциации для нервной и мышечной ткани. Выдвинуто предположение, что в волокнах Пуркинье сердца собаки существуют различные группы рецепторов для ТТХ, соответствующие различным классам натриевых каналов [26].

В настоящее время вопрос о низкой чувствительности миокарда к ТТХ был исследован на культивируемых миокардиальных клетках крысы с помощью двух биохимических методов: в одном используется этилендиаминовый (эп) аналог ТТХ, меченный тритием ([³H]_{эп}-ТТХ) [27], другой — основан на измерении потока ²²Na⁺ и будет подробнее описан в другом разделе этой главы. В экспериментах по непосредственному связыванию [³H]_{эп}-ТТХ измеряется число и определяется средство натриевых каналов всех видов: как работающих, так и не работающих. В исследованиях с помощью потока ²²Na⁺ измеряется число только работающих каналов [28, 29]. Измерение связывания [³H]_{эп}-ТТХ выявили группы высокоаффинных участков связывания с константой диссоциации (K_д) составляющий около 1 нМ, в то время как

при измерении потока $^{22}\text{Na}^+$ обнаружили группу низкоаффинных участков связывания при K_d около 1 мкМ, т. е. почти на 3 порядка больше, чем K_d для мест связывания с высоким сродством (рис. 20.2).

Электрофизиологические исследования культивируемых миокардиальных клеток крысы также позволили выявить натриевые каналы с низкой чувствительностью к ТТХ [30], что подтверждает результаты исследований потока $^{22}\text{Na}^+$.

На основании этих исследований можно сделать вывод, что в миокардиальных клетках млекопитающих одновременно существуют высокоаффинные и низкоаффинные участки связывания для ТТХ, причем, по-видимому, только натриевые каналы, имеющие низкую чувствительность к ТТХ, вносят вклад в электрическую активность миокарда. Аналогичные признаки обнаружены в культивируемых волокнах скелетной мышцы крысы, в которых также выявлено одновременное присутствие двух групп участков связывания ТТХ с теми же величинами сродства, которые были обнаружены в миокарде крысы [31]. И в этом случае вклад в электрическую активность вносят только те каналы, которые имеют низкое сродство к ТТХ ($K_d = 1$ мкМ). В случае скелетной мышцы млекопитающих физиологическая экспрессия каналов того или другого класса, по-видимому, зависит от наличия иннервации. Так, если иннервация мышцы не нарушена, то физиологическая активность определяется натриевыми каналами с высоким сродством к ТТХ; в этом случае препарат проявляет высокую чувствительность к ТТХ. Электрическая активность натриевых каналов с низким сродством к ТТХ проявляется после денервации, и препарат становится малочувствительным к ТТХ [32].

Высокоаффинные места связывания $[^3\text{H}]_{\text{эн}}\text{-ТТХ}$, обладающие насыщением, идентифицированы в мембранах миокарда крысы, кролика, морской свинки и куриных эмбрионов, т. е. в препаратах, проявляющих как высокую (клетки сердца куриных эмбрионов), так и низкую (крыса, кролик, морская свинка) чувствительность к ТТХ [27]. Кривая насыщения соответствует единственной популяции рецепторов для ТТХ с K_d 0,5—1 нМ независимо от регионарного распределения рецепторов. ТТХ и СТХ специфически связываются и замещают $[^3\text{H}]_{\text{эн}}\text{-ТТХ}$ с K_d , равными 4 и 3,4 нМ соответственно (см. рис. 20.2). Связывание $[^3\text{H}]_{\text{эн}}\text{-ТТХ}$ ингибируется при кислых рН и константа полунгибирования равна 6,2. Такой уровень рН соответствует величине рК сильно ионизированной группы, входящей в состав натриевого канала, и близка к величине, полученной в нервной ткани [33]. Такой сильно ионизированной группой, по-видимому, является карбоксильная группа, которая может быть изменена при воздействии карбодинамидов или солей триалкилоксииниума другими препаратами, обладающими высокой чувствительностью к ТТХ [10, 12, 13]. Одновалентные катионы селективно вытесняют $[^3\text{H}]_{\text{эн}}\text{-ТТХ}$ из мест связывания, что указывает на связывание токсина со специфическим местом координационного связывания катионов. По эффективности вытеснения $[^3\text{H}]_{\text{эн}}\text{-ТТХ}$ из мест связывания

вания одновалентные катионы располагаются в следующей последовательности: гуанидин > Tl^+ > NH_4^+ > Li^+ > Na^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+ . Интересным признаком связывания неорганических одновалентных катионов с натриевым каналом является положительная кооперативность, свидетельствующая о наличии нескольких сопряженных мест связывания одновалентных ионов во входном отверстии натриевого канала. Двухвалентные катионы также вытесняют $[^3H]_{эп}$ -ТТХ из мест связывания со следующей последовательностью эффективности: Mg^{2+} ($K_d = 1,3$ мМ) > Ca^{2+} ($K_d = 3,2$ мМ). Так как такие катионы, как Na^+ , K^+ или Ca^{2+} , предотвращают связывание ТТХ с соответствующим рецептором, то величины K_d , измеренные в растворе Рингера, оказываются в 6 раз больше, чем для раствора холина [27].

Проведенные биохимические исследования показывают, что взаимодействие ТТХ с высокоаффинными участками связывания на мембране миокардиальных клеток обладает свойствами, подобными обнаруженным в нервной ткани и скелетной мускулатуре [6].

Алкалоиды группы вератрина, батрахотоксин, аконитин, грайанотоксин

Эти соединения (рис. 20.3) представляют собой липидорастворимые молекулы, оказывающие значительное влияние на электрическую активность миокардиальных и других возбудимых клеток [4].

Вератридин и другие алкалоиды группы вератрина являются стероидными алкалоидами, образующимися в растениях, принадлежащих к родам *Veratrum*, *Zygadenus*, *Stenanthium* и *Schoenocaulon* [34].

Батрахотоксин (БТХ) является стероидным алкалоидом, выделенным из кожи колумбийской лягушки *Phyllobates aurataenia*. Он является одним из наиболее токсичных соединений, и оказываемое им летальное действие на млекопитающих преимущественно связано с нарушением ритма сердца. В литературе имеется подробный обзор результатов исследования этого токсина [35].

Аконитин является основным алкалоидом растения *Aconitum napellus*. Структура его молекулы заметно отличается от молекул вератридина и БТХ.

Грайанотоксины (ГТХ) представляют собой токсичные бипереноиды, обнаруженные в растениях различных видов *Rhododendron*, *Kalmia* и *Leucothoe* (Ericaceae).

Вератридин, БТХ и аконитин вызывают деполяризацию мембран нервных и мышечных клеток. Такой эффект обусловлен тем, что потенциалозависимые натриевые каналы оказываются постоянно активированными при нормальном потенциале покоя [36—38]. Гипервозбудимость и деполяризация возбудимых клеток под влиянием этих токсинов связаны с двумя эффектами: а — сдвигом зависимости активации натриевого канала от потенциала в сторону более отрицательных потенциалов; б — блокированием

инактивации этих каналов. Кроме того, эти три токсических соединения не только влияют на воротный механизм потенциалозависимых натриевых каналов, но также изменяют их ионную селективность и увеличивают проницаемость для более крупных ионов [39, 40].

По-видимому, токсины этих трех типов преимущественно связываются с натриевыми каналами, находящимися в активированном состоянии, так как их действие усиливается в ритмическом ряду стимуляции [36, 38, 41]. Дезполяризация возбудимых клеток, вызванная вератридином, БТХ и аконитином, блокируется при действии ТТХ [3, 42, 43].

Механизм действия (а также рецептор) ТТХ на натриевые каналы [3, 33] в принципе тот же, что и у алкалоидов вератрина, БТХ и аконитина, несмотря на существенное различие их структур [44, 45].

Для анализа тонких механизмов действия этих нейротоксических соединений применяли методы двух различных типов. Первый подход заключался в использовании метода фиксации потенциала, позволяющего получить данные о кинетике и зависимости от потенциала для состояний активации и инактивации, а также о количестве ионов, проходящих через открытый канал. При втором подходе используется измерение потоков радиоактивных одновалентных катионов [46]. Вератридин, БТХ и ТТХ увеличивают начальную скорость поступления $^{22}\text{Na}^+$ в клетки нейроblastомы или скелетной мышцы [31]. Такое стимулирующее действие обусловлено химической активацией натриевых каналов этими токсинами, и оно ингибируется ТТХ. БТХ является наиболее эффективным из токсинов этого класса.

Действию алкалоидов группы вератрина, БТХ, аконитина и гвайанатоксинов на миокард посвящено большое число работ. Недавно был опубликован критический обзор всех имеющихся данных [42].

В экспериментах с использованием метода фиксации потенциала на предсердных трабекулах лягушки для изучения действия вератрина, и на волокнах Пуркинье сердца овцы для изучения действия аконитина [47—49] было показано, что действие этих

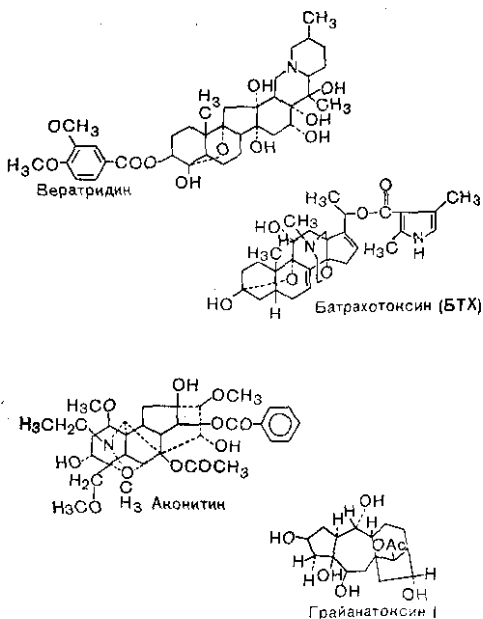


Рис. 20.3. Структурные формулы липидорастворимых молекул вератридина, батрахотоксина, аконитина и гвайанатоксина 1.

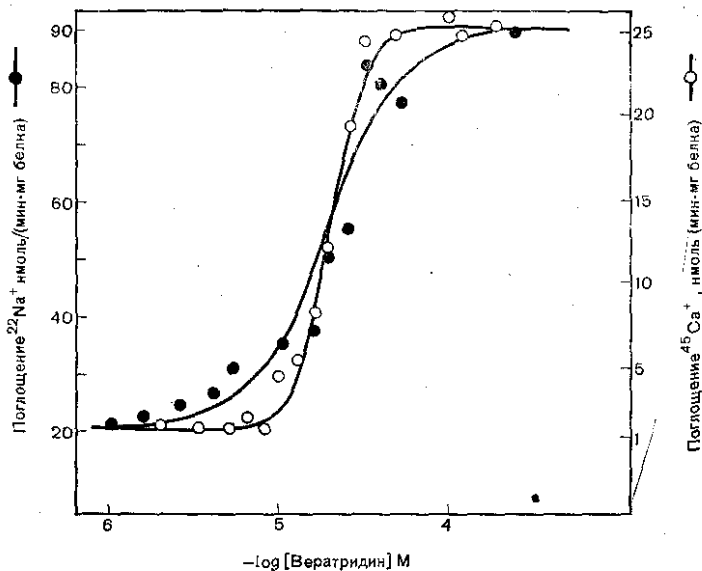


Рис. 20.4. Увеличение начальной скорости поглощения $^{22}\text{Na}^+$ (темные кружки) и $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (светлые кружки) миокардиальными клетками эмбриона в культуре при действии вератридина [54].

липидорастворимых соединений на миокард аналогично их влиянию на нервные волокна и клетки скелетной мышцы. Оба токсических соединения блокируют механизм инактивации натриевого канала. (Вератрин является смесью токсических алкалоидов, среди которых содержится чистое соединение — вератридин. Поэтому в экспериментах предпочтительно использовать вератридин, а не вератрин.)

Алкалоиды группы вератрина, аконитин и БТХ в низких концентрациях удлиняют фазу реполяризации потенциала действия различных миокардиальных препаратов. Этот эффект зависит от концентрации и частоты стимуляции и ингибируется ТТХ [42], причем действие БТХ проявляется в наномолярном диапазоне [50—52], а действие других токсинов — в микромолярном [42, 49, 53]. При более высоких концентрациях все эти липидорастворимые токсины вызывают деполяризацию мембран миокардиальных клеток. И этот эффект токсинов блокируется ТТХ.

Измерения потоков $^{22}\text{Na}^+$ в культивируемых миокардиальных клетках куриного эмбриона [54] показали, что начальная скорость входа $^{22}\text{Na}^+$ в эти клетки возрастает в 5 раз при концентрации вератридина 0,1 мМ (рис. 20.4). Половина максимального эффекта на основе кривых доза—эффект достигается при 22 мкМ. Стимуляция вератридином скорости входа Na^+ ингибируется ТТХ ($\text{K}_{0.5} [\text{ТТХ}] = 6,6 \text{ нМ}$ при 22 мкМ вератридина).

Грайданотоксины так же активируют натриевые каналы в миокардиальных препаратах [55, 56], как и в нервных клетках, ДТХ

оказывает действие даже на клетки СА-узла, хотя электрическая активность этих клеток резистентна к действию ТТХ [57]. Это является одним из примеров возможной демонстрации присутствия в препарате натриевых каналов с помощью токсинов, специфически влияющих на воротный механизм канала.

Вератридин и другие алкалоиды этой группы, БТХ и грайанотоксины вызывают обратимый положительный инотропный эффект, зависящий от концентрации токсина [42]. Единственным токсином этой группы, не оказывающим, согласно имеющимся данным, положительного инотропного действия, является аконитин. Было проведено подробное сравнение зависимостей эффекта от концентрации для большого количества алкалоидов группы вератрина [42] и группы структурно близких грайанотоксинов [48]. Было показано, что максимум положительного инотропного эффекта при действии различных алкалоидов группы вератрина практически один и тот же [42], но существенно различаются диапазоны концентраций, в которых эти токсины влияют на силу сокращения, причем половина максимального эффекта достигается в диапазоне от 10 нМ до 100 мкМ. Такие алкалоиды этой группы, как гермететрин, протовератрины или гермитрин вызывают положительное инотропное действие в концентрациях, на порядок меньших, чем вератридин. Такие различия в действии алкалоидов группы вератрина еще не нашли объяснения, так как измерения потоков $^{22}\text{Na}^+$ на клетках нейробластомы не выявили существенных отличий сродства этих соединений к натриевому каналу [59].

В процессе сопряжения возбуждения с сокращением в миокарде принимают участие по крайней мере две системы поступления Ca^{2+} : медленный кальциевый канал и механизм $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена [60, 61]. Положительное инотропное действие вератридина (и других токсинов этой группы), БТХ и грайанотоксинов является косвенным результатом их влияния на натриевые каналы. Вызывая постоянную активацию натриевых каналов, эти токсины приводят к повышению внутриклеточной концентрации Na^+ , что вызывает вход Ca^{2+} по механизму $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена. Очевидно, что положительное инотропное действие, обусловленное влиянием этих липидорастворимых токсинов, блокируется ТТХ [42]. Участие $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена в механизме развития инотропного эффекта, вызываемого липидорастворимыми токсинами, было прямо показано в экспериментах с использованием метода фиксации потенциала на предсердных трабекулах лягушки [48] и при измерении потоков $^{22}\text{Na}^+$ и $^{45}\text{Ca}^{2+}$ на культивируемых эмбриональных клетках миокарда желудочков [54]. При повышении входа $^{22}\text{Na}^+$ в миокард под действием вератридина начальная скорость поступления $^{22}\text{Na}^+$ увеличивается в 25 раз (см. рис. 20.4). Как и следовало ожидать при косвенной стимуляции вератридином механизма $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена, активируемое им поступление Ca^{2+} ингибируется ТТХ, зависит от внеклеточной концентрации ионов Na^+ и ионы Li^+ способны в этом случае заменить ионы Na^+ (рис. 20.5).

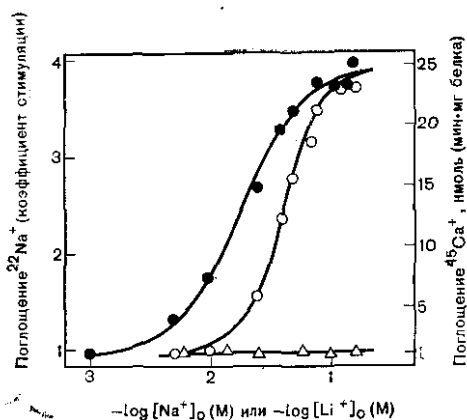


Рис. 20.5. Влияние внеклеточной концентрации Na^+ на поглощение $^{22}\text{Na}^+$ (темные кружки) и $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (светлые кружки), стимулируемое вератридином в культивируемых миокардиальных клетках эмбрионов. При замене Na^+ на Li^+ вератридин не способен стимулировать поглощение Ca^{2+} (треугольники) [54].

В отличие от ТТХ, СТХ или описанного недавно полипептидного токсина вератридин и БТХ, по-видимому, не являются специфическими для быстрого натриевого канала. Недавно было показано, что эти липидорастворимые токсины блокируют медленные кальциевые каналы в клетках нейробластомы в том же диапазоне концентраций, в котором они активируют натриевые каналы [62]. Было бы интересно исследовать их действие на медленные кальциевые каналы миокардиальных клеток.

Токсины, выделенные из яда скорпиона и актинии

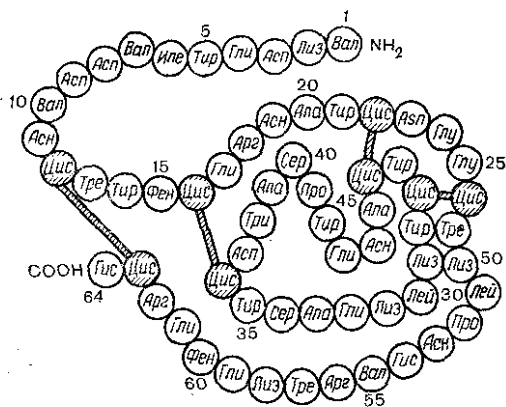
Токсины из яда северо-американского и северо-африканского скорпиона были получены в чистом виде. Была определена их аминокислотная последовательность [63] (рис. 20.6). Молекулы этих токсинов представляют собой полипептиды с одной цепью, между отдельными аминокислотными остатками которой имеются многочисленные поперечные связи, образованные дисульфидными мостиками. Они представляют собой минибелки с молекулярной массой около 7000. Яд скорпиона содержит смесь множества токсинов, некоторые из которых специфичны для млекопитающих, другие — для насекомых или ракообразных. В активном центре этих токсинов в качестве одного из наиболее важных аминокислотных остатков был идентифицирован остаток лизина [64]. Эксперименты по изучению действия очищенных токсинов из *Androctonus australis*, *Leiurus quinquestriatus* и *Buthus Eurpus* на различные препараты нервной ткани с помощью метода фиксации потенциала [65—67] показали, что основное их действие выражается в значительном замедлении процесса инактивации натриевого канала. Эти токсины не влияют на активацию натриевого канала. Исходные яды обладают, по-видимому, теми же свойствами, что и очищенные токсины [3].

Из множества видов актиний были выделены токсины (АТХ), действующие на животных различных видов [68]. Была определена аминокислотная последовательность некоторых из этих ток-

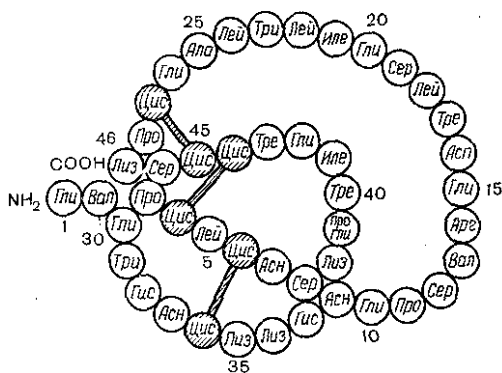
Рис. 20.6. Структурные формулы токсина II из яда скорпиона *Androctonus Hector* и токсина V из актинии *Anemonia sulcata*.

синов [69—72] (см. рис. 20.6). Они являются основными полипептидами с одной целью, молекулярная масса которых составляет 2500—5000. Конформация молекулы поддерживается поперечными связями, образованными дисульфидными мостиками. В активном центре этих токсинов в качестве наиболее важного аминокислотного остатка идентифицирован остаток аргинина (гуанидиновая группа) [73]. АТХ и токсины скорпиона (СкТХ) не имеют явных структурных соответствий (см. рис. 20.6). Как и СкТХ, АТХ специфически замедляют процесс инактивации натриевых каналов в мембране нервных клеток, не влияя на состояние активации [74, 75]. Этот эффект угнетается ТТХ. Как СкТХ, так и АТХ потенцируют действие вератридина, БТХ, аконитина и ГТХ на натриевую проницаемость клеток нейроblastомы [33, 59, 76]. Но не все токсины скорпиона имеют один и тот же механизм действия. Например, яд американского скорпиона *Centruroides sculpturatus* не влияет на инактивацию натриевых каналов, а сдвигает зависимость активации от потенциала в сторону более отрицательных потенциалов [77].

В СкТХ и АТХ удалось ввести радиоактивную метку и с помощью меченых токсинов была биохимически идентифицирована рецепторная субъединица этих токсинов в натриевом канале [63, 78, 79]. Обе эти группы токсинов полезны для анализа биохимических свойств инактивационных ворот. Основные результаты исследования связывания ^{125}I -токсинов сводят к следующему: а —



Токсин II из яда скорпиона (*Androctonus australis Hector*)



Токсин V из актинии (*Anemonia sulcata*)

токсины обеих групп связываются с некоторыми участками на внешней стороне натриевого канала, которые отличаются друг от друга, но взаимозависимы; стехиометрия связывания выше для ^{125}I -АТХ [79]; б — связывание СкТХ со специфическими участками связывания зависит от потенциала и не происходит при деполяризации мембраны [63, 66, 78, 80], в то время как АТХ связывается как с поляризованными, так и деполяризованными синапсами [79]; в — на один участок связывания ТТХ в канале имеются 2 участка связывания АТХ.

Химическая модификация карбоксильных групп АТХ слабо влияет на сродство токсина к рецептору, но полностью подавляет его токсическое действие и, конечно, его влияние на натриевые каналы. Другими словами, химически модифицированный токсин является антагонистом нативного токсина [73].

СкТХ II, выделенный из *Androctonus australis* Hector, существенно удлиняет фазу реполяризации миокардиального потенциала действия. Такое удлинение ингибируется ТТХ и не наблюдается в растворах с низкой концентрацией Na^+ [81]. Очищенные АТХ, выделенные из *Anemonia sulcata* и *Anthopleura xanthogrammica*, оказывают аналогичное действие в различных миокардиальных препаратах [82—84]. Наиболее вероятный вывод, который можно сделать на основании описанных результатов, состоит в том, что полипептидные токсины этих классов замедляют инактивацию миокардиальных натриевых каналов и могут даже вызывать неполную инактивацию. Другими словами, механизм их влияния на миокардиальные клетки тот же, что и на натриевые каналы нервных клеток. Это подтверждается: а) результатами исследования действия АТХ на агрегаты миокардиальных клеток куриного эмбриона с помощью метода фиксации потенциала [43]; б) результатами экспериментов по определению связывания меченого ^{125}I токсина II, выделенного из яда скорпиона *Androctonus*, с миокардиальными клетками цыпленка [85].

Полипептидные токсины обоих типов оказывают положительное инотропное действие на различные миокардиальные препараты при очень низких концентрациях [82, 84, 86, 87].

Среди большого количества полипептидных токсинов, выделенных из ядов различных скорпионов или актиний, наиболее сильное положительное инотропное действие оказывает токсин I, выделенный из яда *Anemonia sulcata* (см. рис. 20.6), и токсин II, выделенный из яда *Anthopleura xanthogrammica*, при концентрациях 1—5 нМ [87]. Половина максимального эффекта при их действии на натриевые каналы миокардиальных клеток млекопитающих наблюдается при концентрациях около 1 нМ. Интересно отметить, что миокардиальные клетки млекопитающих, чувствительные к ТТХ, оказываются необычайно восприимчивы к влиянию АТХ, в то время как чувствительные к ТТХ нервные клетки и миокардиальные клетки цыпленка в меньшей степени реагируют на АТХ. Сродство АТХ к натриевым каналам чувствительных и резистентных клеток различается приблизительно в 100 раз. Наиболее важные результаты относительно механизма действия

АТХ на сердце были получены в экспериментах на культивируемых миокардиальных клетках куриного эмбриона с помощью: а) электрофизиологических измерений с одновременной регистрацией сокращения; б) измерения потоков $^{22}\text{Na}^+$ и $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Получены следующие результаты для АТХ [83]: 1. Токсин значительно удлиняет потенциал действия, замедляет частоту сердечного ритма и одновременно увеличивает амплитуду и длительность сокращения. 2. Скорости входа $^{22}\text{Na}^+$ и $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в миокардиальные клетки возрастают приблизительно в $1\frac{1}{2}$ и 12 раз соответственно. Это воздействие блокируется ТТХ, зависит от внеклеточной концентрации ионов Na^+ и не наблюдается при замене ионов Na^+ ионами Li^+ . 3. АТХ потенцирует действие вератридина, проявляющееся увеличением входа $^{22}\text{Na}^+$ и $^{45}\text{Ca}^{2+}$. 4. Несмотря на блокирование медленных кальциевых каналов верапамилом, D-600 и ионами Mn^{2+} , при добавлении в раствор АТХ удается вызвать сокращение препарата миокардиальных клеток (рис. 20.7), но при замене ионов Na^+ ионами Li^+ такие сокращения исчезают (см. рис. 20.7, в). Все эти результаты указывают, что увеличение амплитуды и длительности сокращения миокарда при действии токсина скорее обусловлено (как и в случае липидорастворимых токсинов) косвенной активацией системы $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена. Механизм действия токсинов, полученных из яда скорпиона, по-видимому, аналогичен, так как они также повышают скорость поступления $^{22}\text{Na}^+$ и $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в миокардиальные клетки, такое стимулирующее действие ингибируется ТТХ [88] и они потенцируют действие вератридина [85].

Полипептидный токсин, выделенный из кораллов семейства *Scipioroga*, оказывает положительное инотропное действие, угнетаемое ТТХ [89]. Механизм кардиостимулирующего эффекта этого пептида, по-видимому, аналогичен таковому у ScTx и АТХ.

Совсем недавно был открыт совершенно новый класс полипептидных токсинов, выделенных из яда скорпиона [90]. Они были получены от скорпионов Центральной и Южной Африки вида *Centruroides suffusus* или *Tityus serrulatus* [91]. Эти токсины блокируют работу натриевых каналов в мышечных клетках. Хотя на первый взгляд их физиологическое действие не отличается от такового ТТХ или ScTx , они связываются с каналом в другом месте. Эти токсины удалось пометить радиоактивным йодом, что позволило подробно изучить их свойства относительно связывания с натриевыми каналами. Константа диссоциации для токсина, полученного из яда *Tityus*, и натриевого канала нервных клеток или электрического органа *Electrophorus electricus* составляет около 10^{-12} М [91]. Стехиометрия соотношения количества рецепторов для ТТХ и рецепторов для токсинов, выделенных из *Tityus* или *Centruroides*, равна 1:1. Более того, эти полипептидные токсины отличают натриевые каналы, находящиеся на поверхности клетки от расположенных в мембране Т-тубул мышечных клеток [90]. Большой интерес может вызвать изучение действия этих токсинов на миокардиальные клетки. Мы уже говорили, что мембраны культивируемых миокардиальных клеток куриных эмбрио-

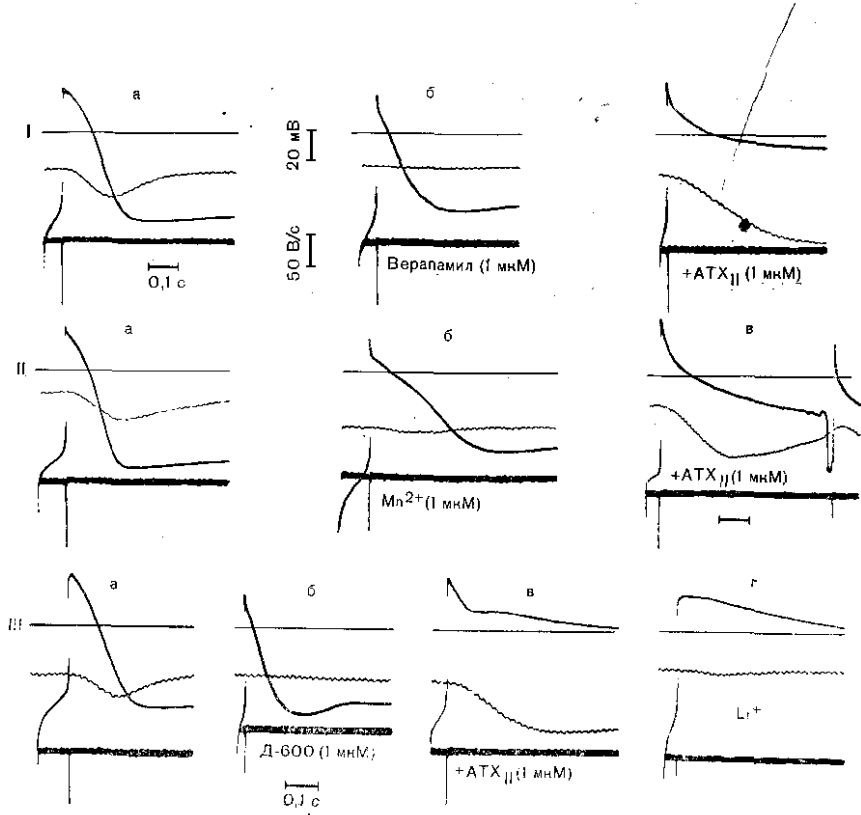


Рис. 20.7. Действие АТХ-II на миокардиальные клетки куриных эмбрионов в культуре на фоне верапамила, ионов Mn^{2+} и Д-600.

I: верапамил. II: Mn^{2+} . В каждой серии регистраций: а— контроль; б — установившееся действие блокатора на медленные кальциевые каналы (обратите внимание на угнетение сократительной активности); в — после добавления АТХ-II в среду, содержащую блокатор кальциевого канала (обратите внимание на восстановление сократительной активности). III: угнетение сокращения, индуцированного АТХ-II в присутствии верапамила, при замене ионов Na^{+} во внеклеточной среде содержащей ионы Li^{+} (сокращение отсутствует); в — после добавления 1 мкМ АТХ-II в среду, содержащую ионы Na^{+} и 1 мкМ Д-600 (сокращение восстановилось); г — после полной замены ионов Na^{+} ионами Li^{+} в присутствии 1 мкМ Д-600 и 1 мкМ АТХ-II (обратите внимание, что сократительная активность вновь исчезла). Каждый снимок на этом рисунке содержит: нулевую линию потенциала, запись dV/dt (внизу), запись потенциала действия и запись силы сокращения (в середине), на которой отклонение вниз соответствует увеличению развиваемой силы.

нов имеют участки связывания для таких токсинов. Токсины взаимодействуют с местом связывания в сильной степени, так как константа диссоциации для взаимодействия токсина, выделенного у *Tityus*, с мембраной миокардиальных клеток находится около 15 пМ, т. е. приблизительно на 2 порядка величины ниже, чем константа диссоциации комплекса ТТХ — натриевый канал ($K_d \approx 1$ нМ).

Использование токсинов для исследования дифференцировки натриевых каналов в миокарде

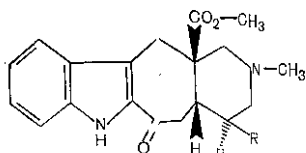
Большинство исследователей, изучающих онтогенез сердца эмбрионов, обращали внимание на то, что в ходе эмбрионального развития сердца цыпленка и крысы происходит повышение мак-

симальной скорости нарастания потенциала действия и увеличение чувствительности к блокирующему действию ТТХ как потенциала действия, так и сокращения [92, 93]. На ранних стадиях развития (как *in vivo*, так и *in vitro*) входящим током, с ответственным за фазу нарастания потенциала действия, является медленный натриевый ток, чувствительный к D-600, но не к ТТХ. Чувствительные к действию ТТХ быстрые натриевые каналы появляются на более поздних стадиях развития. Электрофизиологические и биохимические исследования с использованием специфических нейротоксинов показали [43], что: а) рецепторы для вератридина, БТХ, АТХ и ТТХ имеют место уже на ранней стадии развития, когда потенциал действия еще не чувствителен к ТТХ; б) быстрые натриевые каналы на этой стадии развития находятся в нерабочем состоянии («молчат»), т. е. не могут быть активированы электрической стимуляцией, но их можно активировать путем применения токсинов, влияющих на воротную систему (вератридин, БТХ и АТХ): в) переход из ранней в позднюю стадию развития сопровождается не только превращением «молчащих» каналов в работающие, но и повышением плотности каналов в 4—5 раз.

«Молчащие» натриевые каналы, которые имеют место, но не проявляются физиологически на очень ранней стадии развития эмбрионального сердца в онтогенезе, весьма напоминают натриевые каналы, обнаруженные в фибробластах [94].

Другие токсины

Эрватамин. Эрватамин является токсичным алкалоидом (рис. 20.8), выделенным из австралийского дерева *Ervatamia orientalis* [95]. Анализ механизма действия эрватамина и эписэрватамина



Эрватамин: R=H R'=C₂H₅
 Эписэрватамин: R=C₂H₅ R'=H

Рис. 20.8. Структурные формулы эрватамина и эписэрватамина.

тамина (структурный аналог, в 4—8 раз эффективнее эрватамина) на нервную ткань [96, 97] показал, что: а) они вызывают частотозависимое блокирование быстрых натриевых каналов; б) ингибируют действие вератридина, БТХ, СкТХ и АТХ на натриевые каналы подобно ТТХ; в) не связываются с рецепторами, специфичными для ТТХ, СкТХ и АТХ; г) эти токсические алкалоиды связываются с воротным механизмом натриевого канала и конву-

рентно ингибируют действие БТХ, что позволяет предположить, что токсины этих двух классов имеют общий рецептор. Эпизрвтамин и БТХ имеют близкое сродство к натриевым каналам.

Эрватамин блокирует потенциал действия миокардиальных клеток, не влияя на потенциал покоя [98]. Он ингибирует быстрый натриевый ток, связываясь с рецепторами одного типа ($K_d = 20$ мкМ). Ингибирование зависит от частоты, так как эрватамин уменьшает скорость реактивации натриевого канала. Он блокирует также медленные натриевые каналы, проявляющие свою активность в бескальциевых растворах, содержащих ТТХ, а также — медленные кальциевые каналы [98].

Кардиотоксины. Хотя эти токсины на самом деле не принадлежат к семейству естественных соединений, специфически влияющих на ионные каналы, их было бы целесообразно рассмотреть по крайней мере из-за их названия. Кардиотоксины образуют группу токсических полипептидов, состоящих из одной цепи, включающей примерно 60 аминокислот, которые в избытке содержатся в ядах змей семейства Elapidae. Структура кардиотоксинов близка к таковой у выделенных из яда змей нейротоксинов, блокирующих никотиновые рецепторы.

Этот класс минибелков называется кардиотоксинами, так как они вызывают остановку препаратов изолированного сердца в фазе систолы и гибель экспериментальных животных от фибрилляции сердца. Кардиотоксины связываются с рецептором липидного типа [100, 101] и обуславливают явные морфологические изменения мембран [102]. Они влияют на клетки различных типов, как возбудимые, так и невозбудимые, способствуя необратимой деполаризации, и, таким образом, нарушают как структуру, так и функции клеток. К структурным изменениям, являющимся следствием связывания токсинов с отрицательно заряженными головками фосфолипидов, относится, помимо всего прочего, необратимое разрушение (Na^+ , K^+)-АТФазы [101], а также ионных каналов (Romey, личное сообщение). Большинство препаратов кардиотоксинов содержит некоторое количество фосфолипаз [102], мембранные эффекты, наблюдаемые при действии таких препаратов, часто обусловлены синергизмом белков этих двух классов [102].

Палитоксин. Палитоксин был выделен из Zoanthids рода *alythoa* [103]. Это соединение является наиболее мощным токсином из всех, изолированных из морских животных. В концентрации около 0,1 нМ он ингибирует развитие фазического сокращения и вызывает тоническую контрактуру в изолированных полосках миокарда желудочков. Вызванная палитоксином контрактура сопровождается поглощением $^{45}Ca^{2+}$ [104]. Механизм действия этого токсина в настоящее время неизвестен.

З а к л ю ч е н и е

Большинство известных естественных кардиотоксинов влияет на чувствительность нервных волокон и клеток скелетной мускулатуры и

является специфичным для быстрых натриевых каналов миокардиальных клеток. На основании механизма их действия и имеющейся информации о рецепторах все кардиотоксины можно разделить на 3 основных класса: 1) ТТХ и СТХ; 2) алкалоиды группы вератрина, аконитин, БТХ и грайанотоксины; 3) полипептидные токсины, выделенные из яда скорпионов и яда актиний и кораллов. В зависимости от их действия на быстрые натриевые каналы эти токсины могут блокировать сокращение, вызывать положительные инотропные эффекты и спонтанные сокращения, нарушения ритма и фибрилляцию. Пиретроиды (новые инсектициды) являются еще одним классом соединений, влияющих на быстрые натриевые каналы [105, 106]. Их изучение представляет интерес с точки зрения кардиотоксичности. Свойства токсинов различных типов, влияющих на натриевые каналы, суммированы в табл. 20.1.

К другим естественным кардиотоксинам относится эрватамин, действующий преимущественно как местный анестетик, кардиотоксины яда змей, в действительности являющиеся цитотоксина-

Таблица 20.1. Краткая характеристика свойств токсинов, различных классов, влияющих на активность натриевых каналов

Токсин	Физиологическое действие	Литературный источник
Тетродотоксин (ТТХ) Сакситоксин (СТХ)	Блокирование натриевых токов	[3, 21]
Липидорастворимые токсины Вератридин Аконитин Батрахотоксин (БТХ) Грайанотоксины (ГТХ)	Постоянная активация натриевых каналов	[34, 35, 37, 38, 42, 44, 49]
Токсины, выделенные из яда северо-американских и северо-африканских скорпионов (СкТХ) Androctonus australis Hector (токсин II) Leiurus quinquestriatus Buthus Eupus	Специфическое замедление инактивации натриевых каналов	[63, 65—67]
Полипептидные токсины из актиний (АТХ) Anemonia sulcata (токсины II и V) Anthopheura xanthogrammica (токсины I и II)		[68, 73—75, 86]
Токсины, выделенные из яда центрально- и южно-африканских скорпионов Centruroides suffusus suffusus (Css II) Tityus serrulatus (Tityus)	Блокирование быстрого натриевого тока	[77, 90, 91]
Пиретроиды	Модифицирование процесса закрывания быстрых натриевых каналов	[105, 106]

ми, и палитоксин, который еще не был достаточно подробно изучен, чтобы можно было определить механизм его действия.

Пока не открыто никаких естественных соединений, которые были бы специфичны для ионных каналов других типов, например, для классических калиевых каналов или медленных кальциевых каналов, также играющих существенную роль в развитии потенциала действия и в электромеханическом сопряжении. Фармакологические свойства этих каналов, известные в настоящее время, были определены с помощью таких соединений, как ТЭА, аминопиридины, Д-600, верапамил, нитрендипин и их аналоги [107—109], не являющиеся естественными соединениями, часто не абсолютно специфичными для данного типа каналов, и обычно действующие в относительно высоких концентрациях, за исключением аналогов нитрендипина. Только нитрендипин и его аналоги, по-видимому, могут быть использованы для изучения свойств кальциевого канала на молекулярном уровне [108, 109]. Большой интерес представляло бы открытие естественных токсинов, специфичных для медленных кальциевых каналов, для системы $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена или для других каналов, принимающих участие в механизме генерации пейсмекерного потенциала.

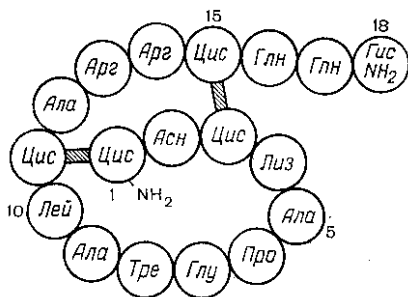


Рис. 20.9. Структурная формула апамина из яда пчелы.

Недавно было показано, что один из полипептидных токсинов, выделенных из яда пчелы, взаимодействует с Ca^{2+} -зависимыми калиевыми каналами нервных волокон, клеток скелетных мышц и гладких мышц сосудов [110]. Этот токсин, называемый апамином (рис. 20.9, очень сильно взаимодействует с Ca^{2+} -зависимыми калиевыми каналами ($K_d = 15 - 20$ пМ). Так как Ca^{2+} -зависимые калиевые каналы играют важную роль в генерации спонтанной электрической активности во многих возбудимых клетках [11, 112] и вследствие этого — в сопряжении клеточного обмена ионов Ca^{2+} с мембранным потенциалом, апамин, несомненно, станет столь же широко используемым фармакологическим средством, как и ТТХ. Следовательно, имеется настоятельная необходимость изучить действие этого токсина на различных миокардиальных препаратах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lanzdunski M., Renaud J. F.* The action of cardiotoxins on cardiac plasma membranes. — *Ann. Rev. Physiol.*, 1982, vol. 44, p. 463—473.
2. *Howard B. D., Gunderson C. B. Jr.* Effects and mechanisms of polypeptide neurotoxins that act presynaptically. — *Ann. Rev. Pharmacol.*, 1980, vol. 20, p. 307—336.
3. *Narahashi T.* Chemicals as tools in the study of excitable membranes. — *Physiol. Rev.*, 1974, vol. 54, p. 813—889.
4. *Schwartz J. R., Uulbricht W., Wagner H. H.* The rate of action of tetrodotoxin on myelinated nerve fibers of *Xenopus Laevis* and *Rana esculenta*. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1973, vol. 233, p. 167—194.
5. *Cuervo L. A., Adelman W. J.* Equilibrium and kinetic properties of interaction between tetrodotoxin and the excitable membrane of the squid giant axon. — *J. gen. Physiol.*, 1970, vol. 55, p. 309—355.
6. *Ritchie J. M., Rogart R. B.* The binding of saxitoxin and tetrodotoxin to excitable tissue. — *Rev. physiol. biochem. pharmacol.*, 1977, vol. 79, p. 1—50.
7. *Chicheportiche R., Balerna M., Lombet A.* et al. Synthesis of new, highly radioactive tetrodotoxin derivatis and their binding properties to the sodium channel. — *Europ. J. Biochem.*, 1980, vol. 104, p. 617—625.
8. *Chicheportiche R., Balerna M., Lombet A.* et al. Synthesis and mode of action on axonal membranes of photoactivable derivatives of tetrodotoxin. — *J. Biol. Chem.*, 1979, vol. 254, p. 1552—1557.
9. *Ritchie J. M.* The sodium channel as a drug receptors. — In: *Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach*/Ed. R. W. Straub, L. Bolis. New York: Raven, 1978, p. 227—242.
10. *Baker P. F., Rubinson K. A.* Chemical modification of crab nerves can make them insensitive to the local anaesthetics tetrodotoxin and saxitoxin. — *Nature*, 1975, vol. 257, p. 412—414.
11. *Reed J. K., Raftery M. A.* Properties of the tetrodotoxin binding component in plasma membranes isolated from *Electrophorus electricus*. — *Biochemistry*, 1976, vol. 15, p. 944—953.
12. *Shrager P., Projera C.* Inhibition of the receptor for tetrodotoxin in nerve membranes by reagents modifying carboxyl groups. — *Biochim. biophys. Acta*, 1973, vol. 318, p. 141—146.
13. *Sigworth F. J., Spalding B. C.* Chemical Modification reduces the conductance of sodium channels in nerve. — *Nature*, 1980, vol. 283, p. 293—295.
14. *Spalding B. C.* Properties of toxin-resistant sodium channels produced by chemical modification in frog skeletal muscle. — *J. Physiol. (Lond.)*, 1980, vol. 305, p. 485—500.
15. *Moore H. P. H., Fritz L. C., Raftery Ma., Brookes J. P.* Isolation and characterization of a monoclonal antibody against the saxitoxin-binding component from the electric organ of the eel *Electrophorus electricus*. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, p. 1673—1677.
16. *Hartshorne R. P., Catterall W. A.* Purification of the saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, p. 4620—4624.
17. *Barchi R. L., Murphy L. E.* Size characteristics of the solubilized sodium channel saxitoxin binding site from mammalian sarcolemma. — *Biochim. biophys. Acta*, 1980, vol. 597, p. 391—398.
18. *Levinson S. R., Ellory J. C.* Molecular size of the tetrodotoxin binding site estimated by irradiation inactivation. — *Nature, New Biol.*, 1973, vol. 245, p. 122—123.
19. *Barhanin J., Schmid A., Lomber A.* et al. Molecular size of different neurotoxin receptors on the voltage-sensitive Na⁺ channel. — *J. Biol. Chem.*, 1983, vol. 258, p. 700—702.
20. *Dudel J., Peper K., Rudel R., Trautwein W.* The effect of tetrodotoxin on the membrane current in cardiac muscle (Purkinje Fibers). — *Pflügers. Arch.*, 1967, vol. 295, p. 213—226.
21. *Cohen C. J., Bean B. P., Colatsky T. J., Tsien R. W.* Tetrodotoxin block of sodium channels in rabbit Purkinje fibers. — *J. gen. Physiol.*, 1981, vol. 78, p. 383—414.

- myocardial cells. — In: *Cardiac toxicology*. Vol. 1/Ed. Balazs T. Boca Raton F. L.: CRC, 1981, p. 39—108.
108. *Ehlerl F. J., Itoja E., Roeske W. R., Yamamura H. I.* The interaction of [³H]-nitredipine with receptors for calcium antagonists in the cerebral cortex and heart of rats. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1982, vol. 104, p. 937—943.
 109. *Bolger G. T., Gengo P. J., Luchowski E. N. et al.* High affinity binding of a calcium channel antagonist to smooth and cardiac muscle. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1982, vol. 104, p. 1604—1609.
 110. *Hugues M., Romey G., Duval D. et al.* Apamin as a selective blocker of the calcium-dependent potassium channel in neuroblastoma cells: voltage-clamp and biochemical characterization of the toxin receptor. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, p. 1308—1312.
 111. *Meech R. W.* Calcium-dependent potassium activation in nervous tissue.— *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1978, vol. 7, p. 1—18.
 112. *Barrett J. N., Barrett E. F., Dribin L. B.* Calcium-dependent slow potassium conductance in rat skeletal myotubes. — *Dev. Biol.*, 1981, vol. 82, p. 257—266.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Агентов инотропное действие 244
Аконитин 598
 Алкалоиды группы вератрина (аконитин, бахротоксин, грайанотоксин) 598—599
Антиаритмические препараты 528—550
 Механизм взаимодействия с каналом, учитывающий состояние канала 534
 — действия 528
 — — зависящего от потенциала 530
 — — — от времени 531
 — — — от состояния канала 532
Антагонисты антиадреналиновых препаратов (характеристика и механизм действия) 475—489
 — кальциевые 476 (табл. 15.1)
Атриовентрикулярный (АВ) узел 150—156, 161—162
 Влияние безнатриевого и бескальциевого раствора Тироде 159
 Исследования на кластерах изолированных клеток 162—163
 Латентная пейсмекерная активность клеток 161—162
 Потенциалы действия в небольших образцах ткани 151—153
 Мембранные токи 156
 Наличие электрогенного натриевого насоса 155
 Реакция на пропускание тока 153
 Частичный вклад i_{Na} 157
АТФ 388, 394, 402
 — гидролиз 388
 — — влияние фосфоламбана 402
 — — механизм 394
 β -Адренергические катехоламины 478
Бахротоксин 598
Блокаторы органические кальциевых каналов 286, 546
 Блокирование каналов 260
 — — анестетиками 263
 — — ацетилхолином 260
 — — лекарственными препаратами 263
Быстрый ответ ткани 184
Везикулы покрытые 51
Внутренние запасники 279
Вставочные диски 45
Гликозиды сердечные 450
 Взаимодействие препаратов 462
 Действие 450
 — положительное инотропное 464
 Механизм терапевтического действия 462
 — токсичности 469
 Связывание с (Na^+, K^+) -АТФазой 464, 468
 Фармакодинамика 456
 Фармакокинетика 452
Гормонов действие 244
Грайанотоксин 599
Дигиталиса при действии интоксикация 461
 — фармакодинамика 455
 — фармакокинетика 452
 — химические свойства 450
 — электрофизиологические эффекты 458
Диски вставочные см. Вставочные диски
Инотропных агентов положительное действие 244
Ионные основы электрической активности сердца 135—145 см. также Сердца возбуждение
 Основные понятия 135
 Два типа входящих токов в сердце 135
Натриевый ток 136
Кальциевый ток 138
 Эксперименты с регистрацией потенциала действия 138
 Фармакология и чувствительность к нейромедiatorам 140

- Выходящие токи: реполяризация потенциала действия 140
- Задержанное выпрямление 140
- Транзиторный выходящий ток 141
- Токи, активируемые ионами кальция 143
- Пейсмекерный ток 143
- Хронотропное действие нейромедиаторов 145
- Ионные токи *см.* Токи
- Ионный транспорт, градиентный 297
- Ионов поддержание распределения 90, 94—102
- Ca^{2+} распределение *см.* Ca^{2+} -ионы
- Cl^- распределение 97
- перегрузка 486
- Ионы калия *см.* K^+ -ионы
- кальция *см.* Ca^{2+} -ионы
- хлора *см.* Cl^- -ионы
- Кабельный анализ, основанный на одномерной кабельной цепи 176
- — с помощью теории, описывающей одномерную кабельную цепь ограничения 178
- — — — — практическое применение 180
- Кабельные свойства клеточной мембраны 166
- Кабельная цепь одномерная 173
- Концепции и предположения 174
- Кабельные цепи многомерные и нелинейная теория 182
- Кабельное уравнение классическое: одномерная кабельная цепь 174
- Кальциевой перегрузки последствия и защитные мероприятия 575
- Кальциевые антагонисты 484, 486, 490, 495
- каналы 282 *см.* Каналы
- Кальциевый насос сарколеммы 339, 398
- парадокс 567
- ток *см.* Токи
- Кальций (Ca) 98
- и поврежденные кардиомиоциты 556
- связанный на внутренней мембране СР 353
- Ca^{2+} -ионов аккумулярованных локализация 561
- внутриклеточных запасников входящий ток 279
- изменение концентрации в цитозоле 562
- освобождение из СР 279, 324
- — — аргументы против 326
- — — доказательства 324
- поглощенных внутриклеточная локализация 570
- поглощения везикулами СР регуляция 403
- прирост содержания и истощение запасов АТФ 563
- — — при кальциевом парадоксе 567
- — — — постигипоксической реоксигенации 567, 572
- распределение 98
- чрезмерное накопление 502
- поступления внутренний контроль 259
- — пути 573
- — — при кальциевом парадоксе 567, 574
- — — — постигипоксической реоксигенации
- — — — постишемической реперфузии 573, 575
- физиологическое значение 404
- Ca^{2+} -ионы 98
- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ — влияние на каналы мембраны 270
- Кальция накопления при постишемической перфузии 555
- освобождение из СР скринированных миокардиальных клеток 323
- поглощение ишемическим миокардом 558
- — и гидролиз АТФ 388
- — — расслабление сердца 404
- — — кальмодулин-зависимое 403
- — — с помощью цАМФ 400
- — — фрагментированным СР 388
- поступление сарколеммальное 330, 478
- свободных ионов регистрация концентрации в миоплазме при помощи:

- биоломлюесценции акварина 345
 кальций-селективных электродов 350
 механического напряжения миофибрилл 341
 разностной спектрометрии с арсеназо III 352
 — специфичность прироста содержания, вызванного реперфузией 559
 Канала быстрого натриевого специфичные токсины 593—607
 Алкалоиды группы вератрина, батрахотоксин, аконитин, грайанотоксин, 598
 Выделенные из яда скорпиона и актинин 602
 Тетродотоксин и сакситоксин 593
 Другие токсины 607
 Эрватамин 607
 Кардиотоксины 608
 Палитоксины 608
 — механизм взаимодействия с препаратом 531 см. также Антиаритических препаратов действие
 — разных состояний следствие 537
 Каналов быстрых натриевых дифференцировка в миокарде 606
 — медленных блокирование 260 см. также Блокирование медленных каналов
 — — особые свойства 248
 Зависимость от ЦАМФ 248
 — от метаболизма 253
 Гипотеза фосфорилирования 255
 Селективное блокирование при ацидозе 257
 Гипотеза защиты миокарда 259 см. также Ca^{2+} -ионы
 — — роль в поступлении ионов Ca^{2+} 241
 Каналы медленные миокардиальных клеток и их роль в поступлении ионов Ca^{2+} 241
 — мембраны, влияние $[Ca^{2+}]_i$ 270
 — — ионные 593
 Клетки АВ-узла 150
 — — изолированные 162
 — проводящей системы 18, 53, 57, 58
 — рабочего миокарда желудочков 16
 — — — предсердий 18
 — — (сократительного) миокарда 21
 Клеток миокардиальных ультраструктура 16
 — — электрические характеристики см. Электрические характеристики миокардиальных клеток
 — рабочего (сократительного) миокарда другие оргanelлы 49
 — — — межмембранные контакты 45
 — — — мембранные системы 35
 — — — митохондрии 32
 — — — фибриллярные компоненты 23
 — — — форма и размер 21
 — — — ядро 34
 Лизосомы и другие включения 51
 Медленные каналы см. Каналы
 Медленный ответ ткани 186 (табл. 6.1), 187
 Межмембранные контакты 45
 — токи АВ-узла 156
 Мембрана клеточная 182
 — поверхностная 35
 Мембранные системы 35
 — токи см. Токи
 Мембраны активные свойства 182
 — — — и возбуждение 182
 — пассивные свойства 182, 183 см. также Стоки
 — свойства и функции 167
 — сопротивление и емкость 92
 — СР структура и состав 381
 — — структурная организация 387
 — состав и структура 91
 — текучесть 93
 Микротрубочки 29
 Миокард 90
 Миокарда биопсия 85
 — воспаление 76
 — гипертрофия 76
 — гипотеза защиты 259
 — заживление 579
 — инфекции 76
 — ишемия 67
 — ишемии патофизиология 67
 — — экспериментальное изучение 67

- — этиология 67
- млекопитающих ультраструктура 15—61
- механические силы (активные и пассивные) 416
- недостаточность 76
- патологические процессы 67
- повреждения токсические 73
- предсердия и желудочки 132
- снижение потребности в кислороде 486
- миокардиальные клетки см. Клетки
- Миокардиопатия 80
- гипертрофическая 83
- застойная 82
- рестриктивная (констриктивная) 85
- экспериментальная на моделях животных 86
- Миофибриллы и миофибриллоподобные массы 23
- Митохондрия 32
- (Na^+/K^+)-АТФаза 463
- и натриевый насос 463
- — связывание сердечных гликозидов 465
- (Na^+/K^+)-АТФазы ингибирование с инотропным эффектом 466
- Na^+/K^+ -насос 95, 463
- $\text{Na}^+—\text{Ca}^+$ -обмен 98, 335
- $\text{Na}^+—\text{Ca}^+$ -обмена влияние на сопряжение между клетками 584—586
- кинетические свойства 307
- применение гипотезы к сокращению сердца 313
- роль в клетках ткани сердечной мышцы 291, 313, 319
- энергетические свойства 303
- Натриевого насоса автоматизм 114
- — пейсмеркерные потенциалы 114
- — электрогенный потенциал 106
- тока наличие в клетках АВ-узла 157
- Натриевый насос 106
- ток 136
- Натрий (Na) 95
- Нейромедиаторов действие 244
- — хромотропное 145

- Отведеный система 219
- — полная 222
- Отведения стандартные 219
- Органеллы 49
- Пейсмеркерная активность 161
- — латентная 161
- — нормальная, эктопическая 491
- Пейсмеркерных потенциалов электрогенез в АВ-узле 150
- Пластинчатый комплекс 49
- Покрытые везикулы 51
- Поперечно-продольная тубулярная система (ППТС) 37
- Потенциал действия 90
- Потенциала действия автоматизм 519
- — биоэлектрические эквиваленты 167
- — возбудимость 166
- — источники 166, 192, 194—196
- — проведение 166
- — распространение 191
- Локальные токи 191
- Источник 192
- Стоки 194—198 см. также Стоки
- Фактор безопасности 198
- — реполяризация и рефракторность 513
- — структура 167
- — фаза нарастания 509
- — эктопическая активность 520
- — медленного развития 246
- расширение в сердце 227
- математические модели, позволяющие связать потенциалы сердца с потенциалами на поверхности тела 228
- Потенциалы действия в небольших образцах ткани АВ-узла 151
- покоя 104, 504
- равновесные 99
- электрогенного натриевого насоса 106
- Потенциалов действия медленных возникновение и распространение 267—268
- — — возможная роль в развитии аритмий
- диффузный расчет 104

- покоя влияние на потенциал действия 117
- — расчет 104
- профиль распределения в мембране 121
- Реперфузия постишемическая 565
- Ретикулум саркоплазматический см.
- Саркоплазматический ретикулум
- Ритма нарушение 200
- нарушения автоматизм 202
- — антиаритмические препараты 200, 203 см. также Антиаритмические препараты
- — возбудимость 202
- — регуляция 200
- Саркомера длина 418
- — большая 418
- — малая 418
- — промежуточная 418
- сравнение соотношений сила — длина 428
- Саркоплазматический ретикулум 40
- Саркоплазматическим ретикулатом
- Ca²⁺-поглощение 388
- — Ca²⁺-поглощения регуляция 400
- — — — кальмодулин-зависимая 403
- Саркоплазматического ретикулаума
- состав белковый 383
- — — — липидный 383
- — Са-насосы 398
- — физиологическое значение 404—407
- — фрагментированные препараты 382
- — — — с помощью цАМФ 400
- — — — — стимуляция 401
- Сердечная мышца 443
- Активное состояние 443
- Анализ механической активности 440
- Вязоупругие свойства 430
- Вязкость и ползучесть 437
- Механические эквивалентные цепи 431
- Напряжение покоя 434
- Соотношение силы и скорости изменения длины 438
- Увеличение силы сокращения 456
- Сердце 128
- Сердца возбудимость 128, 214 см. также Кабельные свойства
- возбудимости нарушение 202
- — нормальное распространение 128
- — роль специализированных тканей 128
- входящие токи 135
- сокращение (применение гипотезы Na⁺—Ca⁺-обмена) 313, 478
- потенциал действия 130
- потенциала действия распределенные 227
- — — — распределения математические модели 228
- электрической активности ионные основы 135
- Система тубулярная поперечно-продольная 37
- проводящая предсердно-желудочковая
- Сток 166, 192, 194
- кабельная теория для непрерывного распространения 195
- подножие потенциала действия 194
- разрывное распространение 196
- Транс ответ быстрый 184
- — медленный 187
- Ток 102
- входящий 135
- — кальциевый 138
- — медленный 278
- — — — внутриклеточных запасников 279
- — натриевый 136
- выходящий 140
- — активируемый ионами кальция 141, 143
- — пейсмекерный 143
- — транзиторный 141
- ионный 102
- — мембранный 102
- кальциевый 138, 330
- натриевый 136
- пейсмекерный 143
- Тока входящего кальциевого измене-

- ние в присутствии химических веществ 285
- — — связь с сокращением 278
- — — транзиторные изменения 289
- ионного измерение 134
- Токсины см. Канала быстрого натриевого специфичные токсины
- Тубулярная система 37

- Узел атриовентрикулярный см. Атриовентрикулярный узел**
- Узловые клетки 53
- Узловая ткань 130
- Усилители 216

- Фибриллярные компоненты клеток рабочего миокарда 23**
- Фильтры 218

- Характеристики электрические клеток в покое 90—125**
- временные ЭКГ 221
- Cl⁻-ионов распределение 97

- Центриоли 50**
- Цепи эквивалентные 132

- ЭКГ 211**
- временные характеристики 221
- интерпретация 231
- Цепи и фундаментальные ограничения 231

- Типы утверждений 232
- Статистическая классификация 233
- Физический и физиологический анализ 233
- Вектор кардиограммы 234
- Одиночный движущийся диполь 235
- Распределение потенциалов и картирование поверхности тела 235
- Формы записей 234
- происхождение 221
- регистрация 215
- Соображения безопасности 219
- Фильтры 218
- Электроды и усилители 216
- связь с возбуждением 214
- система отведений полная см. Отведения
- Электрическая активность сердца 128
- Электрические аналоги: эквивалентные цепи 132
- характеристики клеток см. Клетки
- Электрогенез пейсмекерного потенциала в АВ-узле 150
- Электроды 216
- Электромеханическое сопряжение 278
- Электрофизиология клетки 503
- Электрохимические движущие силы 102
- Ядро клетки 34