

СВЕРДЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ

(ректор — д.м.н., профессор В.Н.Климов)

КАФЕДРА НОРМАЛЬНОЙ ФИЗИОЛОГИИ

(заведующая — к.м.н., доцент В.И.Дедловская)

Р.В.ГНИТЬКО

АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ И
МЕХАНИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИОКАРДА
МЕТОДОМ ФИКСАЦИИ ТОКА НА МЕМБРАНЕ

Диссертация на соискание
ученой степени кандидата
биологических наук.

Научный руководитель —
к.м.н., доцент В.Я.Изаков.

Свердловск

1972

О Г Л А В Л Е Н И Е

Стр.

В В Е Д Е Н И Е	4
ГЛАВА I. АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ СИСТЕМ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКОЕ СОПРЯЖЕНИЕ МИОКАРДА (литературный обзор)	
1. Введение	8
2. Особенности структур, обеспечивающих электромеханическое сопряжение в миокарде.	13
3. Особенности высвобождения и поглощения кальция в миокарде	17
4. Роль электромеханического сопряжения в регуляции сократимости миокарда	24
5. Заключение	34
ГЛАВА II. МЕТОДИКА	
1. Фиксация тока на мембране	36
2. Препарат и растворы	41
3. Регистрация внутриклеточной электрической активности	42
а. Изготовление, заполнение и подготовка микроэлектродов к работе	43
б. Входной каскад усилителя (предусилитель)	46
в. Усилительная и регулирующая аппаратура	51

	Стр.
4. Регистрация механической активности	52
5. Программируемая стимуляция и раздражение пре- парата	55
а. Стимуляция	56
б. Генератор раздражающего тока	58
в. Блок управления	60
6. Вспомогательные устройства	61
7. Порядок исследований	63
8. Материал диссертации	64
ГЛАВА III. ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ И МЕХАНИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МИОКАРДА ПРИ ДЕЙСТВИИ ДЕПОЛЯРИЗУЮЩЕГО И ГИПЕРПОЛЯРИЗУЮЩЕГО ТОКА В НОРМАЛЬНОМ РАС- ТВОРЕ	64
Выводы	81
ГЛАВА IV. ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ И МЕХАНИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РИТМИЧЕСКИ РАБОТАЮЩЕГО МИОКАРДА ПРИ ФИКСА- ЦИИ ТОКА НА МЕМБРАНЕ	83
1. Влияние фиксации тока на хроноинотропию ми- окарда	85
2. Исследование облегчения сокращений при дейст- вии деполяризующих и гиперполяризующих толч- ков тока	96
3. Выводы	103
ГЛАВА V. ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ И НАТРИЯ В ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКОМ СОПРЯЖЕНИИ МИОКАРДА ...	104
1. Влияние ионов кальция на сократительную актив- ность при фиксации тока на мембране	104
2. Исследование влияния ионов натрия на сократи- тельную активность миокарда при действии де- поляризующего тока	117

3. Влияние тетродотоксина и строфантина на электромеханическое сопряжение миокарда...	127
4. Выводы	141
ГЛАВА УІ. ОБСУЖДЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ ...	144
ГЛАВА УІІ. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ СОКРАЩЕНИЙ РИГ- МИЧЕСКИ РАБОТАЮЩЕГО МИОКАРДА	163
1. Основные положения модели	165
2. Оптимизация параметров и решение системы дифференциальных уравнений на ЦВМ М20	170
3. Исследование модели на ЦВМ М20	175
4. Исследование модели на аналоговой машине МН-ІОМ	186
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	194
ЛИТЕРАТУРА	197

ВВЕДЕНИЕ

Механизм сопряжения электрических явлений в поверхностной мембране с сокращением становится узловым проблемой в физиологии мышечной ткани. В настоящее время он интенсивно исследуется на скелетных мышцах, гладкой мускулатуре и миокарде.

Основные моменты электромеханического сопряжения сначала были выяснены на клетках скелетных мышц и часть выводов без должной экспериментальной проверки была перенесена для объяснения связи возбуждение-сокращение в миокарде. Однако клетки миокарда имеют ряд отличительных особенностей морфологического плана (Глаголева В.В. и Чечулин Ю.С., 1966; Саркисов Д.С., Втюрин Б.В., 1967; Смит Р., 1967 и др.) и обладают более высокой чувствительностью к физиологически активным веществам по сравнению со скелетными мышцами, ввиду чего экстраполяция электромеханического сопряжения со скелетной мускулатуры на миокард должна производиться с большой осторожностью. Обращает на себя внимание также принципиальная разница в форме потенциалов действия (ПД), генерируемых в миокарде и скелетных мышцах, а также корреляция параметров ПД миокарда с вызываемым механическим напряжением, которая существенно изменяется при целом ряде физиологических и фармакологических воздействий. Эти воздействия определяют изменение структуры ПД, величину механического напряжения и ритм сердцебиений. Инотропные явления, возникающие в миокарде при различных режимах стимуляции, как было показано, в значительной мере ^{связаны} с кумулятивными явлениями.

ми (Бабский Е.Б., Райхбаум - 1967 а,б. Изаков В.Я., Мар-
хасин В.С., Элик Е.Ф. - 1967; Изаков В.Я., Элик Е.Ф. -
1969), и электромеханическое сопряжение при ритмической ра-
боте миокарда модулируется от сокращения к сокращению и
связано с предисторией механической деятельности клеток.
Ввиду изложенного, изучение электромеханического сопряже-
ния в миокарде представляет самостоятельный интерес как в
теоретическом, так и в практическом плане.

В настоящее время складывается мнение, что в миокарде
ПД не просто триггер², запускающий механизм сокращения, а од-
но из центральных звеньев, посредством которого осуществляют-
ся регулирование интенсивности механического ответа в за-
висимости от предистории деятельности, состояния клеток и
состава окружающей миокард среды. Можно полагать, что ПД
в миокарде является тем звеном, через которое осуществля-
ется регулирующее воздействие медиаторов и других физиоло-
гически активных веществ на силу сокращений.

Целью настоящей работы было выяснение особенностей
электромеханического сопряжения в миокарде при его ритми-
ческой деятельности. Очевидно, для выяснения взаимосвязи
электрической и механической активности необходимо в же-
лаемом направлении изменять параметры ПД и проследивать
как при этом меняется сократимость. Применение для этой
цели фармакологических веществ, изменения ионного состава
среды и увеличение либо уменьшение температуры само по се-
бе является не совсем приемлемым подходом, так как указан-
ные воздействия влияют на многие звенья в цепи электроме -

ханического сопряжения и интерпретация получаемых данных становится затруднительной. Надежды на применение метода фиксации напряжения в препарате с одновременной регистрацией механической активности оправдываются достаточно медленно, ибо фиксация напряжения на мембране сердечных клеток, обладающих малыми размерами и неправильной геометрией, встречает серьезные методические трудности (Johnson, Lieberman 1971).

С этой целью была разработана специальная установка, позволяющая методом упрощенного сахарозного мостика за счет фиксации тока на мембране непосредственно управлять длительностью генерируемых ПД, при одновременной регистрации электрической и механической активности миокардиальных клеток. Сначала изучалась связь параметров ПД и сокращений с параметрами фиксирующего тока при одиночных раздражениях с целью выяснения различных функциональных зависимостей между параметрами ПД и сокращениями. Эти данные отражены в главе III.

Затем сопряжение изучалось при ритмическом раздражении миокарда и при задании предыстории возбуждения при одновременной фиксации тока в различные фазы ПД и в диастолу (глава IV).

С целью более детального изучения отдельных звеньев электромеханического сопряжения аналогичные серии опытов были проведены в гиперкальциевом и гипонатриевом растворах, а также при воздействии специфического ингибитора натриевого канала - тетродотоксина и блокатора активного переноса натрия - строфантина. Эти данные приведены соответственно

в гл. У. ~~У.В.~~ В гл. У.И дается обсуждение экспериментальных результатов. В гл. У.ИИ представлена математическая модель электромеханического сопряжения при ритмической деятельности миокарда. Исследование и отработка предлагаемой модели была проведена на аналоговой моделирующей машине МН-10М. Оптимизация параметров и идентификация модели с экспериментальными данными производилась на ЦВМ М-20.

ГЛАВА I

АНАЛИЗ СТРУКТУР И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ СИСТЕМ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКОЕ СОПРЯЖЕНИЕ МИОКАРДА (Литературный обзор)

I. ВВЕДЕНИЕ

Проблема электромеханической связи, т.е. связи электрических явлений, в том числе и возбуждения поверхностной мембраны с конечным ответом сократительной системы в сокращающихся клетках сочетает традиционный электрофизиологический подход с данными, которые поставляют молекулярно-биологические исследования. Это проблема перехода макроскопических явлений вклада системы в тонкие молекулярные события внутри клетки, а затем трансформация последних в сокращение мышцы. Данная задача решается при интеграции усилий электрофизиологов, морфологов, биохимиков и специалистов по молекулярной биофизике, причем сочетание не механическое, и даже не исключительно логическое, а реализуемое в ходе параллельной постановки экспериментов. Более того, проблема систем клеточной регуляции механической деятельности решается в настоящее время с позиции общесистемного подхода и общей теории систем.

Общеизвестно, что посредником между электрической и механической активностью являются ионы кальция, причем появление достаточно малых количеств ионизированного кальция выше некоторого порога внутри клетки вызывает укорочение миофибрилл, а его исчезновение — процесс расслабления. Сейчас

постулируется, что цикл укорочение-расслабление отражает динамику содержания ионизированного кальция в определенных участках миоплазмы. Это правило справедливо как для сердечной, так и для скелетной мускулатуры. Появлению свободных ионов кальция предшествует возбуждение мембраны. Электромеханическую связь, по сути дела, можно разбить на 2 момента (*Sandow*, 1970):

1) каким образом электрический процесс на мембране вызывает высвобождение кальция (электро-кальциевая связь или проблема электрохимического преобразователя);

2) каким образом ионизированный кальций вызывает укорочение протомиофибриллы (кальций-механическая связь, или проблема химико-механического преобразователя).

Sonnenblick, *Itam*, 1969 выделяют и 3-й компонент-механохимическое разобщение (или расслабление).

В связи с этим мышцу условно можно разделить на 2 системы: контрактильную, которая запускается ионизированным кальцием, и на контролирующую, которая отвечает за механизм высвобождения и реабсорбции кальция (*Ebashi*, *Endo*, *Ohtsuki* - 1969). Устройство последней, вероятно, различно в разных мышцах и у животных, стоящих на разных ступенях эволюционного развития. Повидимому, именно эти системы порознь включены в механизмы клеточной регуляции: контрактильная - в механизм геометрической регуляции. Критическим моментом в проблеме электромеханической связи было открытие с помощью электронного микроскопа саркоплазматического ретикулума и Т-системы, которая представляет выпячивание поверхностной мембраны в скелетной и сердечной мыш-

цах *Bennett, Porter, 1953; Porter, Palade, 1957* и др.) и выяснение факта, что саркоплазматический ретикулум является тем внутриклеточным участком, из которого происходит высвобождение кальция, а в последующем и его реабсорбция.

В более общем смысле к контролирующим структурам (это особенно важно в случае миокарда) помимо саркоплазматического ретикулума следует отнести плазматическую и Т-систему, т.е. все те образования, которые регулируют высвобождение кальция, его свободную концентрацию и обратное поглощение.

В результате работ, проведенных на волокнах скелетной мышцы, была выкристаллизована следующая схема событий в механизме электромеханической связи. Деполяризация поверхностной мембраны, которая в дальнейшем проводится внутрь клетки через Т-систему и тем или иным образом передается на мембрану ретикулума, а затем приводит к высвобождению ионизированного кальция, который вызывает сокращение. В последующем, по прекращению деполяризации, имеет место реабсорбция кальция, в результате чего наблюдается расслабление. Эта схема послужила отправным моментом для аналогичных исследований на миокарде, стала классической и рассматривает электромеханическую связь как результат взаимодействия трех основных структурных элементов мышцы.

Первый и основной структурный элемент включает контрактильные белки-актин, миозин и "нативный тропомиозин" (тропоин+тропомиозин). Второй структурный элемент - поверхностная мембрана, которая является диффузионным барьером для молекул и ионов и местом, где разыгрываются электриче-

ские события. Третьим структурным элементом является саркоплазматический ретикулум (система внутренних тубулярных и везикулярных мембранных образований), чья основная функция — регуляция концентрации ионизированного кальция внутри клетки.

Приведенная классическая схема часто без должного основания переносится на электромеханическую связь в различных миокардиальных клетках. Однако условия таковы, что классическая схема выполняется не во всех миокардиальных клетках, особенно, если учитывать особенности их строения — малые размеры, характер межклеточных соединений, морфологическую неоднородность популяций волокон, а также особенности функционального плана — постоянные ритмические сокращения, большую длительность ПД и активного состояния, высокую чувствительность к химическим веществам и тот факт, что электромеханическая связь изменяется от сокращения к сокращению. Для миокарда различных животных характерна также различная степень развитости внутриклеточных контролирующих структур.

Приведенные данные позволяют полагать, что для миокарда возможны следующие типы электромеханической связи: Тип "А". Классический замкнутый тип. Он наблюдается в клетках с хорошо развитыми внутриклеточными контролирующими структурами (ретикулумом и Т-системой); Тип "Б". Открытый тип. Наблюдается в миокардиальных клетках малого диаметра, где внутренние мембранные системы практически отсутствуют. В сопряжении роль внешнего кальция является критической;

Тип "В". Промежуточный. Контролирующими системами клетки в механизме электромеханической связи являются и внутренние структуры, и плазматическая мембрана. Потенциалы действия могут быть не только запускающим, но и регулирующим звеном, так же, как и в типе "Б". Он встречается в большинстве сократительных клеток, особенно у холоднокровных (Орлов Р.С., Изаков В.Я., 1971).

Сложность электромеханической связи в сердце обусловлена указанной неоднородностью и сложными взаимоотношениями между двумя системами регулирования (внешней и внутренней) в тех клетках, где они сочетаются. Миокард различных животных и даже различные отделы миокарда одного животного могут отличаться в зависимости от преобладания того или иного типа электромеханической связи. Кроме того возможно, что единый тип поверхностной мембраны может выполнять разные функции в зависимости от внутриклеточной среды и некоторых других условий. Указанием на наличие такого перехода является изменение типа электромеханической связи при денервации скелетной мышцы.

Ясно, что при разрешении проблемы электромеханического сопряжения миокарда, регуляции его электрической и механической активности необходим тщательный анализ результатов, полученных на других объектах, учет морфологических и функциональных особенностей всех структурных элементов, контролирующих электромеханическую связь.

2. Особенности структур, обеспечивающих электрохимическое сопряжение в миокарде

В настоящее время можно считать, что миокард, впрочем как и другие органы, имеет типично клеточное, а не синцитиальное строение (Смит, 1967, Струков А.И., Пауков В.С., 1969, Глаголева В.В., Чечулин Ю.С., 1968). Как и большинство сократительных клеток миокардиальные имеют контрактильный материал и другие составляющие, как то: ядро, митохондрии, аппарат Гольджи, лизосомы, цитоплазматический ретикулум (гранулярный и агранулярный) и т.д. Саркисов Д.С., Втюрин Б.В., 1967). Здесь мы ограничимся лишь рассмотрением саркоплазматического ретикулума (СР) и клеточной мембраны, т.к. именно данные структуры имеют наибольшее отношение к вопросу электрохимической связи.

Согласно описаниям многих авторов Саркисов Д.С., Втюрин Б.В. - 1967, Muir - 1957, Nelson, Benson - 1963, Muir - 1965, Staley, Benson, - 1968, Stenger, Spizo - 1961, Yamamoto - 1967), поверхностная мембрана (сарколемма) миокардиальных клеток состоит из двух слоев - наружного и внутреннего. Внутренняя, плазматическая мембрана толщиной в $65-120^{\circ}\text{A}$, разделена промежутком в $100-200^{\circ}\text{A}$ от наружной, базальной мембраны, толщиной в $150-300^{\circ}\text{A}$. Около внутренней поверхности сарколеммы содержится большое количество пиноцитозных пузырьков.

В клетках сократительного миокарда желудочков теплокровных животных имеются две системы саркоплазматических мембранных образований - поперечная (Т-система) и продольная (собственно саркоплазматический ретикулум) Nelson,

Benson - 1963, Porter, Palade - 1957, Simpson - 1965, 1968, Simpson, Vertaellis - 1962, Simpson, Rayns - 1968). В общем виде Т-система состоит из овоидной формы трубочек (или удлиненных пузырьков) диаметров до 0,2 мк, образующих сетчатую структуру, пронизывающую клетку на уровне Z линий.

Использование техники "замораживающего протравливания тканей" с последующей электронной микроскопией (Simpson 1968, Simpson, Rayns - 1968, Sommer, Johnson - 1969) позволило установить непрерывную связь плазматической мембраны со стенками трубочек Т-системы, а также организацию наружных отверстий трубочек Т-системы в ряды, расположенные поперечно к пространству между миофибриллами и продольно к Z - линиям саркомеров. Применение крупнодисперсных частиц типа ферритина или продуктов пероксидазной реакции, так же как и в скелетной мышце выявило непрерывную связь элементов Т-системы с внеклеточной жидкостью (Forssman, Girardier - 1966, Sommer, Johnson - 1968).

К настоящему времени установлено, что трубочки Т-системы не имеют открытых коммуникаций с элементами саркоплазматического ретикулума, т.е. как и в скелетной мышце они нигде не переходят в элементы СР. Использование пероксидазных меток способствовало дальнейшей детализации строения Т-системы клеток миокарда (Sonnenblick, Stam - 1969). Оказалось, что на концах трубочек Т-системы имеются разветвления. Эти разветвления в виде тончайших отростков пронизывают клетку; концы этих отростков имеют размеры,

близкие к размерам элементов СР и лишены базальной мембраны.

Таким образом, Т-система в мышечных клетках сердца млекопитающих является продолжением клеточной поверхности (сарколеммы), образует глубокую широкоразветвленную сеть этой мембраны внутри клетки, и повидимому, обеспечивает более тесный контакт внеклеточной среды с контрактильными элементами.

Продольная система саркоплазматического ретикулюма или собственно СР состоит из мельчайших трубочек, образующих собою непрерывную сеть, которая распространяется от саркомера к саркомеру (*Sommer, Jonson - 1968, 1970, Sonnenblick, Stam - 1969*). В отличие от СР скелетной мышцы, который как бы привязан к отдельным саркомерам и сеть тончайших трубочек заканчивается расширениями, так называемыми терминальными цистернами, располагающимися в непосредственной близости от трубочек Т-системы, сеть тончайших трубочек СР мышцы сердца не имеет терминальных цистерн.

В сетевидной структуре СР содержатся как поперечно, так и продольно ориентированные трубчатые элементы. Поперечно ориентированные трубочки СР на уровне Z - линии образуют участки сцепления. Подобные же сцепления поперечно-ориентировочных трубочек СР выявлены в непосредственной близости от сарколеммы и в контакте со вставочными дисками (*Page - 1967, 1968, Sommer, Johnson - 1968*). Сцепления СР в тех же отделах клетки, где располагаются трубочки Т-системы, образуют уплощенные мешкообразные структуры. Весьма

примечательно, что где бы не располагались участки сцепления СР- на уровне ли элементов Т-системы, или же вдоль сарколеммы, везде они характеризуются гранулярными включениями электронноплотного материала, подобного включениям, найденным в концевых цистернах СР скелетной мышцы (Peaschey - 1965, 1966) и содержащим Ca^{++} .

Некоторые исследователи предложили специальное обозначение для элементов ретикулума, расположенных вблизи от сарколеммы, назвав их контактными СР. В контактном СР, в участках наиболее тесной топографической связи с сарколеммой, выделены постоянно встречающиеся электронно-плотные образования - контактные мостики.

Структура сарколеммы, в особенности внутриклеточных мембранных систем, в миокарде амфибий имеет некоторые отличия от миокарда млекопитающих. Клетки миокарда лягушки отделены друг от друга значительно большими, чем у теплокровных, межклеточными промежутками. Толщина плазматической и базальной мембраны не отличается от толщины мембраны клеток теплокровных (Simpson - 1968, Simpson, Rayns 1968).

В отличие от миокарда теплокровных в клетках амфибий нет элементов Т-системы. Система СР столь хорошо развитая в миокарде теплокровных у амфибий развита значительно слабее (Staley, Benson - 1968, Sommer, Johnson - 1969). СР представлен в форме рассеянных, одиночных трубочек и пузырьков, не имеющих, как правило, закрепленного пространственного отношения к топографии саркомеров. В некоторых участках мышечных волокон элементы СР вплотную прилежат

к сарколемме и межклеточным щелям. Иногда небольшие пузырьки СР встречаются в межфибриллярных пространствах, в области χ - линий.

Слаборазвитый СР был выявлен и в миокарде рыб (*Jamamoto* - 1967). Здесь СР представляет собою рассеянную по протоплазме редкую сетчатую структуру, не окружающую миофибриллы, как это имеет место в клетках теплокровных, а лишь располагающуюся около них.

Примечательно, что наряду со слабо выраженным СР, в клетках сердца рыб обнаружены структуры типа саркоплазматических концевых цистерн, располагающиеся поблизости от внутренней поверхности клеточной мембраны. Контуры этих "цистерн" извилисты и иногда прослеживается их связь с трубками СР. Такого рода взаимоотношение между "цистернами" и сарколеммой в миокарде рыб весьма напоминает структурную связь между Т-системой и СР в сердце теплокровных (*Muir*, 1957, *Nelson*, *Benson* - 1963). Итак, морфологический анализ структурных элементов электромеханического сопряжения в клетках миокарда теплокровных и холоднокровных показывает, что анатомические параллели между скелетной мышцей и мышцей сердца и терминология, используемая для описания тончайших структур скелетной мышцы оказываются недостаточно адекватными для мышцы сердца теплокровных и, в особенности, холоднокровных животных.

3. Особенности высвобождения и поглощения кальция в миокарде

Анализ физико-химических и ферментативных свойств

саркоплазматического ретикулума в настоящее время ведется на изолированных с помощью дифференциального ультрацентрифугирования фрагментах микросомальной фракции. В ходе этих исследований было установлено ряд фундаментальных положений:

- 1) гомогенат способен поглощать из окружающего раствора ионы кальция;
- 2) изолированный ретикулум обладает АТФ-азными свойствами;
- 3) обнаружена корреляция между способностью гомогената поглощать кальций и расщеплять АТФ.

Исторически исследование свойств ретикулума берет свое начало с изучения природы механизма расслабления. Известно, что АТФ способна переводить водяной гель актомиозина в сжатое состояние (суперпреципитация) и приводить к укорочению глицеринизированных мышечных волокон. Сокращение остается на постоянном уровне и очень медленно релаксирует. Хотя АТФ есть причинный фактор для сокращения, его удаление не вызывает расслабления. Таким образом, актомиозиновая система не обладает важным физиологическим свойством мышцы — способностью расслабляться. *Szent-györgy* (1942) выдвинул представление о "двойной функции АТФ". Он ^{по}предложил, что АТФ обладает и сокращающим и расслабляющим действием в зависимости от условий — ионной силы, pH, концентрации и др.

Значительно позже *Marsh* (1952) и *Bendall* (1953) установили, что суспензия миофибрилл в гомогенате при добавлении АТФ не сокращается и расщепление АТФ АТФ-азой происходит крайне медленно. В противоположность этому на хоро-

шо отмытых миофибриллах наблюдается сокращение и высокая скорость расщепления АТФ. Было постулировано, что в гомогенате имеется какой-то фактор, который тормозит сокращение и расщепление АТФ. *Bozler* (1954) и *Watanabe* (1955) установили, что таким свойством обладает кальций-хелатный агент- ЭДТА, который в присутствии АТФ вызывает расслабление глицеринизированных мышц. Они подчеркнули, что ЭДТА имитирует эффект физиологического расслабляющего фактора. В последующем было показано, что физиологическим расслабляющим фактором является СР (*Obashi, Endo* 1963). В экспериментах с влиянием изменения ионной среды на морфологию элементов СР в миокарде теплокровных и Т-системы было показано (*Legato, Spigo, Langer* - 1968), что низкая концентрация ионов натрия и хлора приводит к увеличению размеров структур СР и Т-системы. Перфузия раствором с низким содержанием натрия или высоким уровнем кальция, но в обоих случаях при нормальной концентрации хлоридов вызывала расширение только трубочек СР. На основании этих данных было высказано предположение, что дилатация СР, возникающая при перфузии раствором с высоким содержанием Са или низким содержанием натрия, отражает процесс повышенной секвестрации кальция внутри СР. Этот вывод вполне согласуется с представлением, что главным местом высвобождения и поглощения кальция является СР (*Sadow* - 1965).

Анализ фрагментов СР из мышцы сердца различных животных выявил АТФ-азную активность саркоплазматического ретикулома не только по отношению к АТФ, но и к другим фосфорным соединениям (аденозин-моно и дифосфату, инозин-дифос-

фату, тиамин-фосфату). АТФ-азная активность СР миокарда была равномерно распределена во всех его фрагментах пузырь - ках, трубочках, сцеплениях трубочек (Lee, 1967, Simpson 1968).

Сопоставление АТФ-азной активности СР с влиянием различных факторов, изменяющих скорость поглощения кальция, обнаружило связь АТФ-азной активности СР с работой, так называемого кальциевого насоса. Активность кальциевой АТФ-азы тормозится высокими концентрациями кальция, сульфгидрильными ингибиторами, ЭДТА и возрастает при добавлении в среду ионов магния и под влиянием низких концентраций ионов кальция (Carvalho 1968, Hasselbach, 1964, 1966, Tice, 1967).

В большинстве наблюдений, посвященных изучению аккумуляции кальция элементами изолированного СР, отмечалось, что способность СР миокарда поглощать кальций значительно меньше, чем в скелетной мышце (Fanburg - 1964). Например, фрагменты СР из сердечной мышцы быка накапливали 0,3 микромоля кальция на мг белка за 90 минут, в то время как фрагменты саркоплазматического ретикулома скелетной мышцы могут аккумулировать до 0,65 микромолей/мг белка в течение 3 минут, т.е. соотношение потенциальных возможностей к накоплению кальция в сердечной и скелетной мышцах равно 1:60. Этот факт был объяснен меньшей поглощающей способностью СР миокарда и, возможно, его нестойкостью по отношению к методике препаровки (Lee, Ladinsky, Choi, Kasuja - 1966). Действительно, при более тщательной препаровке ретикулом этой же мышцы поглощал 0,8 микромолей кальция на мг белка

за 20 минут, т.е. степень поглощения кальция СР сердечной мышцы была меньше этой способности ретикулюма скелетной мышцы только в 5 раз (*Fanburg, Gergely* - 1965). Исследования показали, что в изолированной пузырьковой фракции СР скорость накопления кальция равнялась скорости накопления кальция и скелетной мышце.

Как же происходит поглощение кальция в СР миокарда? В работах (*Lee* - 1967, *Lee, Visscher* - 1970) показано, что поглощение кальция ретикулюмом возрастает, если в среде находятся оксалаты или соединения неорганического фосфора. Этот процесс становится еще заметнее, если в среде добавляется креатин-фосфат вместе с креатинфосфокиназой (КФК-система). Поскольку и неорганический фосфат, и КФК-система являются нормальными компонентами мышцы сердца, то было изучено влияние обоих факторов на накопление кальция СР. Без неорганического фосфата и КФК-системы аккумуляция кальция ретикулюмом была очень слабой (17% от общей концентрации кальция в среде). Добавление одного неорганического фосфата увеличивало поглощение кальция до 19%, а добавление КФК-системы без неорганического фосфата доводило поглощение до 24%. Если же в среде находились и неорганический фосфат и КФК-система, то наблюдался резкий прирост способности саркоплазматического ретикулюма накапливать кальций (до 89%).

На основании этих экспериментов высказывается интересное соображение о том, что увеличение неорганического фосфора в результате сокращения может автоматически увеличивать скорость поглощения кальция СР сердца, работая как

часть системы с обратной связью в цикле сокращение-расслабление.

Вызывают интерес и работы, в которых свойства СР исследовались в среде, без добавления оксалатов, а полученные результаты расценивались с позиций катионно-обменных свойств внутриклеточных мембранных систем (*Carvalho* - 1966, 1968, *Carvalho, Leo* - 1967). Так, для скелетной мускулатуры кролика общая емкость СР для связывания катионов оказалась равной 350 микроэквивалентов на грамм белка, причем были выявлены конкурентные взаимоотношения между ионами кальция, магния, калия и водородом. Анализ показал, что связывание катионов саркоплазматическим ретикуломом является по своей природе электростатическим процессом, в котором наибольшая активность принадлежит имидазольным группировкам белков, фосфатидным и сериновым группам липидов. Добавление в среду АТФ увеличивало конкурентную способность ионов кальция по сравнению с другими катионами занимать участки связывания в СР примерно в 1000 раз.

Таким образом, способность СР к связыванию кальция зависит не только от содержания в миокардинальных клетках фосфорных макроэргических соединений, но и от наличия в них различных катионов и, в том числе и от катионов натрия. Это особенно важно, ибо концентрация натрия в миоплазме, которая при возбуждении увеличивается, может быть физиологическим регулятором активности ретикулома, контролируя высвобождение или поглощение ионов кальция. *Palmer* и *Posey* (1967) на изолированном ретикуломе сердца кролика нашли, что натрий уменьшает количество связанного кальция в при-

сутствии АТФ. Это связано не с ингибированием поглощения, а с быстрым высвобождением связанного кальция.

Большинство исследователей в настоящее время считает, что процессы внутриклеточного связывания, накопления и высвобождения кальция в мышечных клетках происходят исключительно в СР. Мы полагаем, что в этих механизмах нельзя исключить участия и поверхностной мембраны. В особенности это относится к тем мышечным образованиям, где СР развит слабо, например, в клетках сердца амфибий и рыб. К сожалению, до сих пор не имеется данных ни о кальциевой емкости сарколеммы, ни о степени конкуренции в ней различных катионов.

Суммируя данные о функциональных свойствах саркоплазматического ретикулума сердца, необходимо отметить следующее:

1) несмотря на то, что точная локализация кальциевого насоса в системе внутриклеточных мембран клеток миокарда в настоящий момент не определена, можно полагать, что внешняя мембрана наряду с СР играет важную роль в процессах внутриклеточной регуляции содержания кальция;

2) СР миокарда принципиально не отличается от СР скелетной мышцы: он поглощает кальций при участии АТФ или КФК-системы и снижает свободную внутриклеточную концентрацию кальция до критических величин ($10^{-7}M$), ниже которых блокируется активность автоматизированной АТФ-азы и сокращения;

3) скорость поглощения и емкость для кальция в СР миокарда несколько меньше, чем в скелетных мышцах;

4) количество кальция, связываемого, высвобождаемого и вновь реаккумулируемого в СР сердца, подвержено значитель-

ным колебаниям в зависимости от колебаний содержания кальция, натрия, а возможно, и других ионов во внешней среде.

4. Роль электромеханического сопряжения в регуляции сократимости миокарда

В 1952 году *Sandow* предположил, что потенциал действия или деполяризация мембраны вызывает увеличенный вход кальция в миоплазму, что инициирует реакции, ведущие к возникновению механической активности. Эта гипотеза, судя по современным данным, несправедливая в целом для волокон скелетной мышцы, нашла многочисленные подтверждения для миокарда. Несмотря на то, что механизм высвобождения кальция под влиянием деполяризации до сих пор неизвестен, сам факт высвобождения свободных ионов кальция в миоплазму показан на *m. sartorius* жабы с использованием мурексиды, чей спектр адсорбции изменяется при комбинации с кальцием (*Jobris*, *O'Connor* - 1956) и на одиночных волокнах рачка *Balanus nubilus* посредством кальций-чувствительного фотопротейна-акворина, который люминисцирует, соединяясь с кальцием (*Ridgway*, *Ashley* - 1967, *Ashley*, *Ridgway* - 1968, 1969, 1970 а.б). Этими опытами было установлено, что кальциевый переход при относительно кратковременных деполяризующих толчках нарастает при деполяризации и падает вслед за реполяризацией, а форма кривой кальциевого перехода напоминает первую производную фазы нарастания изометрического напряжения. Последнее позволило авторам предположить, что скорость развития механического напряжения пропорциональна за-

зависимой от кальция световой эмиссии, т.е. свободной концентрации кальция, или:

$$\frac{dP}{dt} = K_i [Ca] \quad ,$$

где P — изометрическое напряжение;

$[Ca]$ — концентрация свободного кальция внутри клетки;

K_i — константа пропорциональности.

Это предполагает, что напряжение пропорционально площади кривой кальциевого перехода

$$P(t) = K_i \int_0^t Ca(t) dt \quad .$$

Увеличение интенсивности деполяризации увеличивает скорость нарастания, максимум и площадь кальциевого перехода. Параллельно увеличивается максимальная скорость и максимальная амплитуда соответствующего изометрического ответа. Удлинение деполяризации также сказывается и на кальциевом переходе, и на характеристиках изометрического напряжения-кривая кальциевого перехода расширяется. При очень длительной деполяризации кривая кальциевого перехода состоит по крайней мере из 3-х фаз: быстрого нарастания и медленного падения при продолжающейся деполяризации и быстрого падения при реполяризации. Факт, что кальциевый переход значительно опережает развитие механического напряжения, авторы интерпретировали тем, что кальций требуется для генерации механического напряжения, но не обязателен для его поддержания, т.е. пик напряжения достигается, когда кальций уже реаккумулируется саркоплазматическим ретикуломом.

Аналогичные данные были получены в опытах *Heilbrun*, *Wiersiski* (1947) и *Niedergerke* (1955), которые путем ионофореза вводили в мышечные волокна малые концентрации

кальция и получали при этом локальное укорочение мышц, сменявшееся расслаблением, как только прекращалось поступление кальция. Сопоставляя эти результаты с данными опытов *Falk* и *Gerard* (1954), которые через микроэлектрод вводили в мышечные волокна калий, натрий, хлор; АТФ и не получили никаких признаков механической деятельности, следует признать, что кальций является единственным физиологическим ионом, который будучи введенным в клетки, вызывает укорочение саркомеров.

На основании изложенных данных, а также ряде работ по влиянию внеклеточного кальция, можно утверждать, что электромеханическая связь для скелетных мышц опосредуется через внутринаправленное распространение потенциала и выделение кальция из мест связывания, а кальциевый обмен действует в замкнутом контуре и относительно независим от внеклеточного кальция. В принципе такой же механизм связи с определенными модификациями действует и в тех миокардиальных клетках, где имеется развитая Т-система. Различия между подобными миокардиальными клетками и скелетными скорее количественные, чем качественные (*Edman, Grieve, Nelson* - 1966, *Brady* - 1964, *Naulet* - 1965). В таких волокнах электромеханическую связь условно можно разделить на следующие этапы: (см. напр. *Ониани Т.Н.* - 1969):

- 1) распространение деполяризации по Т-тубулам;
- 2) этот электрический сигнал передается на саркоплазматический ретикулум и является командой для высвобождения кальция в цитоплазму;
- 3) увеличение концентрации свободного кальция в непо-

средственной близости от миофибрилл, что ведет к развитию силы в саркомерах;

4) под влиянием еще неидентифицированного сигнала происходит удаление кальция и падение активного состояния.

Однако эта стройная схема для миокарда нуждается в подтверждениях. Во всяком случае проведение возбуждения внутрь волокна до сих пор для клеток сердца не показана. (Müeller 1966). Кроме того, относительно малые размеры миокардиальных клеток снимает аргументы Хилла, что диффузия активатора через поверхностную мембрану маловероятна ввиду крайне малой задержки. Для сердца трудно определить такую задержку, но даже прикидочные расчеты показывают, что нельзя исключить диффузию активатора (Ca^{++}), как механизм сопряжения электрических и механических процессов. В тех мышцах, где саркоплазматический ретикулум развит слабо (миокард холоднокровных, главная мышца, тонические мышцы) системы более чувствительны к изменению наружного кальция и демонстрируют более прямую связь между трансмембранным потоком кальция и мышечным напряжением (контракtilная сила линейно зависит от наружного кальция).

Важная роль внеклеточного кальция для генерации сокращений миокарда была продемонстрирована еще Niedergerke (1963), показавшего, что электрическое раздражение усиливает поглощение меченого кальция, а также Langer и Brady (1963), Langer 1968, которые установили, что скорость обмена кальция в сокращающемся препарате резко возрастает.

В целом взгляды исследователей на роль внеклеточного

кальция в электромеханическом сопряжении в настоящее время достаточно противоречивы. Несмотря на то, что при деполаризации имеется значительное возрастание трансмембранного потока кальция (об этом же свидетельствует обнаружение кальциевого тока в опытах с фиксацией напряжения - см. далее), большинство авторов склонно считать, что количество входящего кальция слишком мало для инициации и поддержания мышечного напряжения (*Niedergerke* , 1968, *Weber* , *Herz* , *Reiss* , 1963). Сейчас со всей уверенностью можно только постулировать, что:

1) в тех клетках, где саркоплазматический ретикулум развит слабо, должны существовать другие участки хранения (и высвобождения) кальция, ибо даже в бескальциевых раст-
ворах имеются сокращения;

2) даже в тех случаях, где имеется внутренняя транс-
локация кальция, существенную роль выполняет и внешний каль-
ций.

Какие же структуры клеток миокарда могут выполнять роль мест хранения кальция там, где имеются рудименты ре-
тикулома? Вероятно, справедливо предположение *Niedergerke*,
что сарколеммальная мембрана сама выполняет функции сарко-
плазматического ретикулума, тем более, что ее площадь до-
статочно велика ($11400 \text{ см}^2/\text{г}$ - *Staley* , *Benson* - 1968), и
она может высвобождать кальций при возбуждении и связывать
(выталкивать) его при расслаблении. Можно считать за пра-
вило, что по мере уменьшения диаметра волокна все большие
клеточные функции выполняются поверхностной мембраной. Если
указанное предположение правильно, то мембраны желудочка
лягушки должны обладать свойствами изолированных препара-

тов саркоплазматического ретикулума скелетных мышц

(*Staley, Benson* - 1968), т.е. они должны:

- 1) ингибировать сокращения изолированных миофибрилл;
- 2) ингибировать АТФ-азную активность миофибрилл;
- 3) аккумулировать кальций.

Однако подобные эксперименты еще не поставлены. Рядом исследователей установлено, что кроме сокращения - кальций контролирует и узловые моменты метаболических процессов и является как бы общим медиатором функции и метаболизма. *Fleckenstein* (цит. по *Ebashi, Endo, Ohtsuki* 1969) предложил следующие варианты связи деполяризации, сокращения и биохимических реакций внутри миокардиальных волокон.

А	Б	В
Деполяризация	Деполяризация	Деполяризация
внутри направленное движение кальция	внутри направленное движение кальция	внутри направленное движение кальция
расщепление макроэргических фосфатов	расщепление макроэргов	сокращение
сокращение		расщепление макроэргов

Согласно первому варианту, кальций прямо вызывает расщепление макроэргических соединений, согласно двум другим - распад богатых энергией фосфорных соединений является следствием сокращений. Действительно, большинство данных пока вызывает интенсификацию обмена АТФ в восстановительный период. Более гармонично выглядит вариант Б, ибо *Hill, Howartz*

(1957) и др. показали, что частично деполяризованные мышечные волокна (увеличение внеклеточной концентрации калия) резко усиливают поглощение кислорода без улавливаемых изменений механической активности. Поразительно, что вроде бы все три варианта имеют определенные экспериментальные подтверждения.

Важным аспектом электромеханической связи является нахождение количественных зависимостей между изменениями уровня мембранного потенциала и величиной и скоростью развиваемого сокращения, которые, как мы видели, коррелируют с высвобождением кальция. Используя деполяризацию мембраны при помощи гиперкалиевых растворов разной концентрации, *Hodgkin, Horowitz*, (1960), а ранее *Lüttgan, Niedergerke* (1958) показали, что минимальная контрактура появлялась при деполяризации -50 мв (потенциал покоя составлял -90 мв), а максимальное напряжение развивалось при мембранном потенциале 20 мв. Кривая связи максимума контрактуры и потенциала на мембране оказалась *S*-образной. Аналогичная связь найдена и в других мышцах (*Orkand* - 1962). Из этих данных вытекает, что потенциал действия начинает принимать участие в активации сократительных белков, когда он достигнет -50 мв (пороговая деполяризация) и его эффект длится до тех пор, пока потенциал вновь не упадет до этой величины. Было найдено, что вариация концентрации ионов кальция и натрия в наружной среде сдвигает порог развития контрактуры. Эти данные впоследствии были подтверждены и дополнены опытами с фиксацией напряжения на мембране и одновременной регистрацией механической активности. *Beeler, Reiter* (1970) по-

казали, что при деполяризации -60 мв (это пороговый потенциал для натриевого тока) наблюдалось очень малое сокращение. Дальнейшая деполяризация не изменяет силы сокращения вплоть до потенциала -35 мв. При дальнейшем увеличении катодического воздействия отмечается значительный прирост сократимости. Максимальное нарастание было при мембранном потенциале -30 до 10 мв. При мембранном потенциале $+55$ мв и выше сокращение вновь падало. Снижение концентрации ионов натрия или увеличение содержания кальция во внешней среде смещает порог развития контрактур в сторону более отрицательных величин напряжения на мембране.

До недавнего времени по аналогии со скелетной мышцей полагали, что в миокарде потенциал действия выполняет роль триггера, запускающего сократительный механизм. Однако, накапливались данные, что потенциал действия помимо включения выполняет функцию регулятора контрактильного процесса. Так было найдено множество различных корреляций между параметрами ПД и сокращениями (*Trautwein*, *Dudel* - 1954; *Hollandez*, *Webb* - 1955; *Webb*, *Hollandez* - 1959; и др.). Наибольшее внимание было уделено корреляции сокращений с длительностью фазы плато ПД. Этому способствовало, что при постоянной температуре при увеличении частоты стимуляции в миокарде лягушки происходит параллельное падение длительности плато и времени нарастания сокращения до максимума (*Brady* - 1964, *Kraft*, *Weigmann* - 1957, *Weigmann*, *Kraft*, *Küpper* - 1957). Аналогичные сдвиги наблюдаются во время лестничного феномена (*Niedergercke* - 1956), уменьшении внеклеточной концентрации натрия (*Lüttgen*,

Niedergerke - 1958, Изаков В.Я. - 1968, Орлов Р.С., Шевелев В.М. - 1970) и при изменениях содержания наружного кальция (*Niedergerke* - 1956). В большинстве случаев более длительным ПД соответствовала большая амплитуда сокращений. Применение разнообразных фармакологических воздействий: строфантина (Шевелев В.М. - 1971), тетродотоксина (Орлов Р.С., Шевелев В.М. - 1969), катехоламинов, изменений внеклеточной концентрации кальция (Орлов Р.С., Элик Е.Ф. - 1969), ионов марганца (Орлов Р.С., Элик Е.Ф. - 1970) и других, показало, что за редким исключением удлиненным потенциалам сопутствует длительное сокращение. Параллельно накапливались данные о том, что изменение температуры и различные ионные и фармакологические воздействия способны изменить электромеханическое сопряжение (*Schmidt*, *Chang* - 1961). Указанные факты не являются удивительными, ибо температурные характеристики, и, в частности, эмпирическая энергия активации разных фаз потенциала действия (Изаков В.Я., Элик Е.Ф. - 1969, Элик Е.Ф., Изаков В.Я. - 1969) и сокращений существенно различаются.

Данные по корреляции амплитуды ПД с силой и длительностью сокращений при разных воздействиях различна, поэтому, по крайней мере, для миокарда она представляется несущественной. Данное утверждение вытекает из того, что в физиологических условиях изменение амплитуды ПД не наблюдается (Орлов Р.С., Изаков В.Я. - 1969).

В 1959 году *Kavaler*, пропуская толчки деполяризующего тока через полоску мышцы желудочка, показал наличие прямой связи между длительностью потенциала действия и вре-

менем нарастания контактного ответа до максимального значения. Данный метод был признан наиболее "чистым" в изучении электромеханического сопряжения и полученные с его помощью данные показывают, что миокардиальное напряжение пропорционально длительности ПД, причем сокращение поддерживается до тех пор, пока имеется деполяризация мембраны.

Таким образом, можно считать, что деполяризация увеличивает поступление и/или высвобождение кальция, создавая условия для развития и удержания напряжений.

Ионы кальция могут поступать к миофиламентам из трех основных источников:

- 1) из мест связывания в саркоплазматическом ретикулюме;
- 2) из наружного раствора (трансмембранный поток кальция);
- 3) из мест связывания в плазматической мембране.

Поэтому, решающим в регуляции сократимости миокарда, является также то, что концентрация ионов кальция и натрия внутри клетки оказывает значительное влияние на длительность ПД. Это подтверждается рядом исследований.

В 1964 году *Brady* предположил, что во время начальной части ПД происходит быстрое вхождение ионов кальция в миокардиальные клетки, и именно внутриклеточный кальций является фактором, детерминирующим длительность фазы плато, являясь как бы регулятором калиевой проводимости. Аналогичный вывод был сделан *Sleator*, *Gubagiff* - 1968, предположивших, что длительность ПД обратно пропорциональна

количеству кальция в специфических участках мембран, особенно в случае клеток с плохо развитой Т-системой. До недавнего времени эта интересная гипотеза не находила своего экспериментального подтверждения, однако доказательства в ее пользу вытекают из данных *Hagiwara, Nakajima*, 1966, которые на мышце усюного рака показали, что ПД не возникают, если концентрация внутриклеточного кальция превышает $2 \times 10^{-6} \text{ м}$.

О важной роли натрия в регуляции длительности ПД и амплитуде сокращений говорят работы с вариациями внеклеточной его концентрации (*Niedergerke, Orkand* - 1966 а.б), а также работа Орлова Р.С., Исакова В.Я., Шевелева В.М. (1971) "О природе частотнозависимого саморегуляторного механизма сокращений миокарда", в которой показано, что концентрация натрия у внутренней поверхности клеточной мембраны определяет длительность ПД.

5. В ы в о д

Из приведенного материала ясно, что ПД в миокарде не просто триггер в сложной цепи реакций между мембраной и kontrakтильными белками, а фактор, регулирующий амплитуду, форму и длительность сокращений. Мы полагаем, что схема электромеханического сопряжения, развитая для скелетной мускулатуры, может быть использована для описания этого процесса в клетках сердца лишь при значительных дополнениях и модификациях. Это различие должно быть тем больше, чем меньше размеры клеток сердечной мышцы, и чем менее в них развиты внутриклеточные мембранные системы.

Для миокарда электромеханическое сопряжение может быть замкнутого типа, открытого или смешанного. Причем, деполяризация мембраны ведет к поступлению из вне и/или высвобождению из внутриклеточных запасов ионизированного кальция, создавая условия для развития сокращения. Длительность ПД и соответственно амплитуда и длительность сокращений каким-то образом регулируется через содержание внутри клетки ионов натрия и кальция. Очевидно, решение проблемы электромеханического сопряжения в миокарде необходимо связывать не только с выяснением вопроса о последовательности механизмов, начиная с поверхностной мембраны, вплоть до миофибриллярных структур, но и с выяснением количественных аспектов регулирующей роли ПД. Наиболее важно выяснить указанные зависимости в процессе нормальной связи возбуждения и сокращения. Полное объяснение роли ПД, как регулятора сократимости миокарда, должно базироваться на полной информации об электрических и электрохимических событиях от мембраны до миофибрилл во всех звеньях этой цепи. Наиболее перспективными методами исследования проблемы регуляции электрической и механической активности, а также электромеханического сопряжения на интактных структурах представляется фиксация током напряжения на мембране^с одновременной регистрацией электрической и механической активности.

ГЛАВА II

М Е Т О Д И К А

В настоящей работе электромеханическое сопряжение миокарда исследовалось при помощи фиксации тока на мембране. Этот метод обладает большими возможностями, поскольку деполяризующие и гиперполяризующие толчки тока, пропускаемые через мембрану, позволяют непосредственно регулировать длительность и амплитуду ПД, увеличивая или уменьшая при этом амплитуду сократительного ответа.

Фиксация тока на мембране производилась с помощью упрощенного сахарозного мостика (Гнистько Р.В., Изаков В.Я., Орлов Р.С. - 1971). Электрическая активность регистрировалась внутриклеточно при помощи стеклянных микроэлектродов. Одновременно при помощи механотрона регистрировалась механическая активность миокарда.

I. Фиксация тока на мембране

Методы фиксации тока и напряжения на мембране позволяют глубже проникнуть в физико-химические свойства плазматических мембран, и в частности дают возможность снимать вольт-амперные характеристики, производить разделение ионных токов ; а на ряде очень крупных волокон изучать зависимость механического ответа от потенциала на мембране. Однако существуют определенные трудности использования данных методик в тканях с малыми клетками и со сложной геометрией и топологией расположения волокон. Так, при упот-

реблении для целей фиксации высокоомных микроэлектродов трудности связаны с введением одновременно нескольких микроэлектродов, их неконтролируемыми выпрямляющими свойствами при пропускании тока, а в случае мышц - с их механической активностью. Кроме того, при фиксации мембраны через микроэлектрод невозможно подвергнуть воздействию весь препарат и, следовательно, проследить за сопряжением электрической и механической активности. В последнее время резко увеличивается число работ при фиксации напряжения мембраны миокардиальных клеток с использованием сахарозного мостика (двойного или одинарного). Подобная методика особенно удобна для изучения электромеханического сопряжения, ибо поляризации подвергается весь препарат. Однако, эта методика также сопряжена с рядом трудностей из-за сложности достаточно полного электрического разобщения камер, особенно при сокращающемся объекте, неоднородности поляризации по длине, нестационарных диффузионных потенциалов, которые влияют на чистоту получаемых данных. (Исчерпывающая критика метода фиксации напряжения на мембране применительно к миокарду дана в недавнем обзоре *Johnson, Liberman - 1971*).

Ввиду указанных трудностей в работе использовалась для изучения электромеханического сопряжения методика фиксации тока в сахарозном мостике. Хотя потенциал мембраны не является при этом контролируемой величиной, имеется возможность программированного изменения длительности ПД и параметров сокращений и изучения их взаимосвязи. С этой целью была сконструирована установка для одновременной регистрации трансмембранного потенциала действия через микроэлектрод,

с заданием тока в сахарозный мостик. (Гнитько Р.В., Изаков В.А., Орлов Р.С. - 1971) при одновременной регистрации механической активности.

В целом методика представляет собой совмещение микроэлектронной техники и сахарозного мостика. Электрическая активность регистрируется внутриклеточно (что имеет преимущество перед регистрацией между отсеками в сахарозном мостике, ибо исчезает непостоянный шунтирующий фактор, влияющий на регистрируемый ПД, дрейф диффузионного потенциала и т.д.), а фиксация тока осуществляется через модифицированный сахарозный мост. Хотя аппаратура разрабатывалась для миокарда холоднокровных, она может быть использована для изучения мембранных и сократительных механизмов, а также их связи и на других объектах.

С помощью данной установки можно решать ряд задач о связи возбуждения и сокращения в миокарде. Перечислим некоторые из них:

1) изменять длительность и амплитуду потенциала действия (ПД) путем задания деполяризующих и гиперполяризующих толчков тока разной силы и продолжительности "внутри" ПД с разной привязкой к фронту ПД и изучать влияние этих изменений на механическую активность и сами ПД;

2) изменять потенциал на мембране во время диастолы для изучения зоны последствия и механизма облегчения сокращений;

3) задавать различную предисторию электрической активности перед тестирующим раздражением;

4) изучать роль разных фаз ПД в регуляции сопряжения

электрической и механической активности и чувствительность разных фаз ПД к прилагаемому току;

5) применением толчков тока, отличных от прямоугольных, изучать процессы адаптации и инактивации;

6) изучать механизмы авторегуляции силы сокращений от ПД при ритмической и одиночной стимуляции при одновременной фиксации тока на мембране.

Блок-схема установки приведена на рис. I. Она включает в себя трехсекционную камеру (9) для размещения полоски миокарда (8), блок генерации стимулирующего (запускающего ПД) импульса (3), блок раздражения или блок выработки деполяризующих и гиперполяризующих толчков тока (5), блока управления стимулирующими импульсами (4), катодный повторитель для регистрации внутриклеточной электрической активности (1), систему регистрации механической деятельности полоски-механотрон (15) и усилитель механотрона (2), двн электроннолучевых осциллографа, шлейфовый осциллограф (7), а также блок устранения артефактов толчков тока (6).

Сахарозная камера имеет три секции: А - для изотонического раствора хлористого калия; Б - для изотонического раствора сахарозы с удельным сопротивлением 10^4 - 10^5 ом/см; В - тестирующая камера (раствор Рингера, куда добавляется исследуемое вещество). Полоска миокарда лягушки 10-15 мм, длины и 1,5-2,5 мм в диаметре одним концом фиксируется в камере А, а другим связана с механотроном (15), который может перемещаться в горизонтальном направлении для создания изометрического режима. Препарат помещался в желобок, который имеется в перегородках, разделяющих камеры между

собой (толщина сахарозной камеры 2 мм). Для лучшего разобщения камер А и В препарат дополнительно углублялся в камере В с помощью специальной резиновой прокладки-мембраны (13). Для лучшей фиксации препаратом и для того, чтобы механическая активность регистрировалась только с участка, расположенного в тестирующей камере используется штырек (16) из нейтрального металла диаметром 0,3 мм. Описанные меры надежно разобщают тестирующую и деполяризующую камеры, позволяют избавиться от артефактов, связанных с перемещением препарата и предотвращают смешивание растворов, а значит и шунтирование.

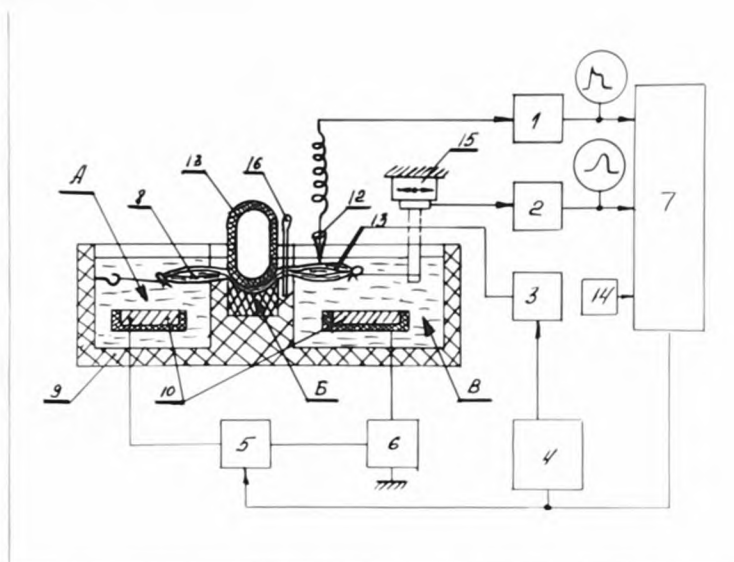


Рис. I. Блок-схема установки для фиксации тока на мембране методом упрощенного сахарозного мостика.

Фиксация тока на мембране осуществляется подачей в определенные моменты времени необходимых толчков тока через электроды (10), находящиеся в камерах А и В. Прикладываемый ток проходит через мембраны клеток тестирующей ка-

меры В, внутреннюю часть клеток камеры Б (сопротивление внутриклеточного раствора значительно ниже омывающего сопротивления сахарозы) и замыкается через деполяризованные, а следовательно, короткозамкнутые при помощи гиперкалиевого раствора мембраны клеток в камере А. Частично он шунтируется внеклеточным омывающим раствором. Поскольку сопротивление сахарозы не очень велико, и препарат имеет относительно большой диаметр, шунтирование оказывается значительным, а следовательно, раздражающие импульсы дают большую плотность тока на раздражающих электродах. Для уменьшения плотности раздражающего тока и устранения артефактов, связанных с поляризацией электродов, последние выполнены в виде специальных каломельных ячеек с площадью контакта с растворами 0,5-1,0 см².

2. Препараты и растворы

Работа проводилась на полосках, вырезанных из желудочка лягушек *Rana ridibunda*. Препараты находились при температуре раствора $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Состав основного раствора: NaCl - 110 мМ, KCl - 2,5 мМ, CaCl₂ - 1,08 мМ, NaHCO₃ - 2,38 мМ, K₂HPO₄ - 0,08 мМ, глюкоза 5,5 мМ. При уменьшении количества натрия осмотичность поддерживалась эквивалентным количеством сахарозы. Исследуемые вещества добавлялись в основной раствор (тестирующую камеру). Опыт начинался спустя 15-20 минут после помещения препарата в основной раствор для достижения ионного и температурного равновесия препарата и солевой среды. Раствор насыщался кислородом.

3. Регистрация внутриклеточной электрической активности

Микроэлектродная техника в сравнении с другими методами электрофизиологического анализа имеет ряд преимуществ; она позволяет длительно регистрировать электрические процессы одиночной клетки практически без ее повреждения, а также точно определять величину и временные характеристики трансмембранных потенциалов и их зависимость от функционального состояния ткани. Несмотря на трудоемкость, микроэлектродная регистрация дает несравненно большую информацию, нежели внеклеточная, где регистрируемый сигнал является усредненным потенциалом совокупности клеточных элементов.

Исследование внутриклеточной электрической активности клеток миокарда требует применения микроэлектродов с размером кончика менее $0,5 \mu$ (Woodbury, Hecht, Christopher - 1951), т.к. только в этом случае повреждение клеточной мембраны минимально, и, кроме того, через кончики электродов таких размеров диффузия электролита ничтожна. Применение электродов большего диаметра приводит к повреждению клетки и шунтированию регистрируемого потенциала.

По сравнению с другими объектами применение микроэлектродной техники к клеткам сердца затрудняется следующими обстоятельствами:

- 1) малыми размерами сократительных клеток (для миокарда желудочка лягушки $5-7 \mu$ в диаметре и не более 50μ в длину);
- 2) наличием выраженной сократительной активности.

Трудности изучения феноменов, зависящих от ритма, связаны с необходимостью применения длительных пауз, а время пребывания микроэлектродов в клетке ограничено. Описанные обстоятельства повышают требования к качеству электродов (размер и конфигурация кончика) и требуют принятия мер для ограничения подвижности препарата с одной стороны, и увеличения подвижности микроэлектрода — с другой.

а. Изготовление, заполнение и подготовка
микроэлектродов к работе

Электроды изготавливались из стекла пирекс и "нейтральное", которое по электрическим и физико-химическим свойствам мало отличается от обычно употребляемых марок стекл. Заготовками служили стеклянные капилляры с наружным диаметром 1,25 — 1,30 мм и толщиной стенки порядка 0,4 мм. Селекция заготовок осуществлялась микрометром. При отсутствии предварительной селекции заготовок в форме микроэлектродов, длине шейки и диаметре кончика наблюдался большой разброс, что значительно уменьшает количество пригодных для проведения экспериментов микроэлектродов. Вытяжка электродов осуществлялась на полуавтомате вертикального типа МЭ-3, изготовленного в экспериментальных мастерских Украинского физиологического института им.Богомольца. По нашим наблюдениям для клеток миокарда наиболее употребимы электроды с небольшой узкой частью (до 10 мм), высокой конусностью и резким вторичным сужением (длина 5-6 микрон).

Для заполнения микроэлектродов электролитом предложены различные способы: кипячение в спирте с последующей заменой на 3М KCl, кипячение под вакуумом, заполнение самодиффузией и т.д. (Мещерский Н.М. - 1960). После опробования ряда способов мы использовали наиболее простой - кипячение электродов под вакуумом в 2,5 М р-ре KCl до тех пор, пока весь воздух в капилляре не будет замещен раствором. Сначала проводился подогрев электродов и раствора, а лишь затем включался вакуумный насос. Регулирование величины вакуума позволяло управлять интенсивность кипения. Вся процедура, включая время охлаждения, занимала 1,5-2 часа. Электроды в большинстве случаев использовались в день приготовления и лишь изредка на следующий день. В этом случае электроды хранились при температуре 2-5°C. Преимущество такого способа - быстрота изготовления и относительно малый процент брака. Перед употреблением электрод извлекался из раствора электролита и помещался в раствор Рингера.

Наличие выраженной сократительной активности в миокарде препятствует употреблению обычных жестких схем соединения электродов с входным устройством. Поэтому приходится применять дополнительные меры для ограничения подвижности препарата и/или увеличения подвижности электрода. Мы не сочли возможным использовать устройства, ограничивающие подвижность препарата (придавливающие кольца, помещение в желатину и т.д.) ибо при этом ухудшается функциональная способность миокарда, затруднена диффузия и т.д. Опробовав различные способы, мы остановились на использовании "плавающих" микроэлектродов по методике Woodbury, Brady - 1956. С этой целью электрод надрезался в участке сужения

карборундовым диском, зажимался мягко в пинцет, надламывался, а толстая его часть отбрасывалась. Тонкая часть насаживалась на платиновую проволоку диаметром 50μ , закрученную в виде спирали. Длина проволоочки 7-10 см. Противоположный конец проволоочки находился в стеклянном капилляре, заполненном агаром, перемешанным с раствором KCl (25M). Нижняя часть агарового коленца заливалась парафином, что обеспечивало неподвижность платиновой проволоочки в агаре и предотвращало высыхание и разрушение агара. В свою очередь указанный капилляр соединялся через систему переходников с сеткой входного каскада. Схема соединения микроэлектрода с входным устройством усилителя показана на рис.2. С сеткой первой лампы соединяется толстая серебряная проволочка, которая предварительно хлорируется. Этот хлор-серебряный электрод помещается во фторопластовую втулку, заполненную раствором KCl +агар. На втулку навертывается сменный колпачек, заполняемый 2,5M KCl , в который вставляется микроэлектрод. В свою очередь фторопластовая втулка вставляется в бронзовую втулку, находящуюся в плексиглазовом блоке. Такая разборная система удобна в работе, позволяет быстро производить хлорирование, промывку и т.д. Кроме того, она при необходимости позволяет в ходе опыта переходить от "плавающих" электродов в "жестким". В дальнейшем, с целью упрощения методики противоположный конец платиновой проволоочки с микроэлектродом через специальный разъем соединялся непосредственно с управляющей сеткой первого каскада регистрирующего усилителя.

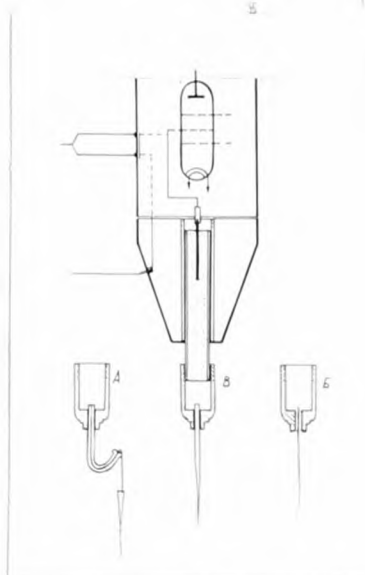


Рис.2. Соединение микроэлектрода с входным устройством усилителя.

- А - соединение с "плавающим" электродом.
- Б - устройство для хлорирования.
- В - соединение с неподвижным микроэлектродом.

б. Входной каскад усилителя (предусилитель)

Входной каскад усилителя для регистрации внутриклеточной электрической активности клеток сердечной мышцы холднокровных в принципе может отличаться от такового, применяемого в работе с нервными клетками (Костюк П.Г. - 1960, Мещерский Р.М. - 1960, *Frank, Becker* - 1964, Бызов - 1964) менее жесткими требованиями. Так как фронт нарастания ПД в миокарде невелик (скорость деполяризации не превышает 50 в/сек), входная емкость в принципе может быть выше 1 пф (до 5-6 пф). Однако незначительные размеры клеток миокарда предъявляют повышенные требования к нейтрализации сеточного тока. С целью расширения экспериментальных возможностей при исследованиях нами был сконструирован универсаль-

ный предусилитель с нейтрализацией входной емкости и точного тока, который имеет передаточный коэффициент, близкий к единице $K=0,99$ (Гнистько Р.В., Изаков В.Я., Орлов Р.С. 1971). Преимуществом разработанного предусилителя является возможность фиксации тока на мембране непосредственно через регистрируемый электрод, автоматическая калибровка измеряемых ПД, возможность хлорирования активного и индифферентного электродов. Конструктивно входной каскад выполнен в виде выносного блока, который располагается на микроманипуляторе, в экранированной камере вблизи препарата. Микроманипулятор выполнен на базе микроскопа М-9. Общий вид микроманипулятора с предусилителем представлен на рис.3.

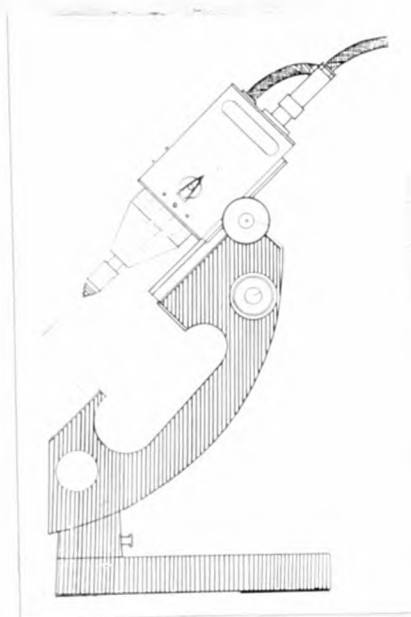


Рис.3. Микроманипулятор с предусилителем.

Такой вариант микроманипулятора обеспечивает три степени свободы движения, и наличие микровинта с точностью хода $0,002$ мм позволяет плавно вводить микроэлектрод в за-

данную точку. При работе с "плавающими" микроэлектродами не требуется большой точности хода, так как проникновение микроэлектрода в клетку осуществляется в период механической системы и электрод как бы "насаживается" на клетку. Процент удачных вкалываний в клетку невелик (5-7%). Среднее время пребывания электрода в клетке 3-5 минуты, иногда десятки минут, очень редко - несколько часов.

Электрические параметры предусилителя таковы: входное сопротивление 1,5 гом, входная емкость менее 1 пф, передаточный коэффициент 0,99, входной ток при нейтрализации се- точного тока не более $10^{-11} \div 10^{-12}$ а, нестабильность 1-2 мв/час.

Электрическая схема катодного повторителя представле- на на рис.4. Он собран по каскодной схеме и содержит цепь нейтрализации входной емкости. Высокое входное сопротивле- ние и коэффициент усиления, близкий к единице, обеспечива- ется использованием вместо катодного сопротивления основно- го каскада (левая половина лампы L_2) генератора тока на од- ной половине лампы L_1 . Вторые половины ламп L_1 и L_2 пред- назначены для нейтрализации проходной емкости сетка-анод первого каскада. Поскольку коэффициент усиления близок к единице, емкость сетка - анод на входную цепь влияния не оказывает. Нейтрализация паразитной входной емкости дости- гается экранировкой входной цепи и подачей на экран напря- жения с катода первого каскада.

Применение в качестве усилительных элементов триодов, вместо обычно встречаемых пентодов, потребовало усложне- ния схемы, но позволило снизить уровень помех на выходе ка- тодного повторителя за счет более низких собственных шумов

этих ламп. Реле P_2 , сопротивление R_9, R_{10} и вольтметр V расположены в блоке управления предусилителя.

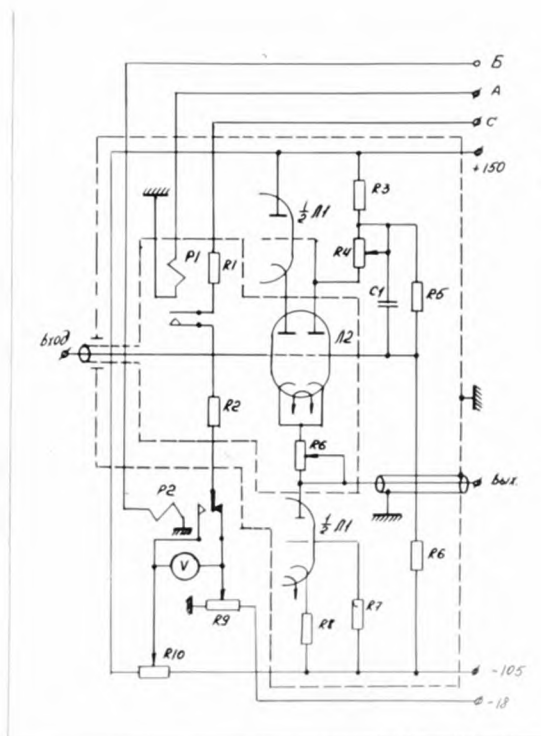


Рис. 4. Электрическая схема катодного повторителя

L_1 - 6Н17Б, L_2 - 6Н16Б, R_1 - 1 ком, R_2 - 1,5 гом, R_3 - 150 ком, R_4 - 10+20 ком, R_5 - 620 ком, R_6 - 1 мГ, R_7 - 1 мГ, R_8 - 20 ком, R_9 - 1 ком, R_{10} - 100 ком, R_{11} - 10 ком, P_1 - РЭС-1, P_2 - 10, C_1 - 0,01 мкФ, V - вольтметр, А - шина управления реле P_1 . Б - шина управления реле P_2 . С - шина для хлорирования серебряного наконечника.

Схема работает следующим образом: входной сигнал поступает на сетку левой половины лампы L_2 и выделяется полностью на ее катодном сопротивлении. Затем этот сигнал поступает на усилительный каскад с общей сеткой, характерной

особенностью которого является широкая полоса пропускания и усиление сигнала по напряжению без его инверсии. Напряжение с анодного сопротивления данного каскада через катодный повторитель (вторая половина лампы L_I — на рис. 4 показано вверху) поступает на анод основного каскада. Таким образом, скачку напряжения на сетке первого каскада соответствует скачок напряжения на его аноде и катоде той же полярности. Подбирая анодное сопротивление R_4 , можно добиться полной нейтрализации емкости сетка-анод первого каскада. Для нейтрализации сеточного тока используется сопротивление R_2 и потенциометр R_9 . Подавая на реле P_I (шина А) толчки напряжения (кратковременное замыкание сетки первого каскада на моль), добиваются, чтобы скачки напряжения на выходе равнялись нулю. Затем сопротивлением R_6 доводят выходное напряжение до нуля. После этого катодный повторитель готов к регистрации. При подаче тока на мембрану через стеклянный микроэлектрод потенциометром R_{10} по показанию вольтметра (V) устанавливается соответствующее напряжение и с помощью управляющих напряжений, подаваемых на реле P_2 , производится смена подпорного нейтрализующего сеточный ток напряжения. Поскольку сопротивление значительно больше сопротивления микроэлектрода, ток через мембрану практически не зависит от изменения сопротивления микроэлектрода и потенциала на мембране. Следует отметить, что в месте контакта платиновая проволочка (30–50 микрон) — плавающий микроэлектрод при подаче раздражающего тока возникает электролитический процесс, что ведет к неустраняемым артефактам. С целью снижения плотности тока в участке кон-

такта и кончику платиновой проволоочки припаяется серебряный наконечник диаметром 0,5 мм и длиной 2-7 мм, который перед опытом хлорировался. Это позволило расширить диапазон токов до $\pm 20 \times 10^{-9}$ а. Артефакт от падения напряжения на стеклянном и индифферентном электродах устранился введением части подпорного сеточного напряжения на противофазный вход осциллографа. Катодный повторитель обеспечивается питанием от специального полупроводникового источника напряжений с коэффициентом стабилизации по высокому напряжению не хуже 1000, а по напряжению накала не хуже 10000. В этом же источнике питания конструктивно расположены все устройства и ручки управления для настройки и эксплуатации предусилителя. Его внешний вид показан на рис.5, электрическая схема на рис.6. На лицевую панель вынесены: ручки управления, контроль напряжений, калибровка напряжения, устройство для измерения сопротивления электродов, устройство для подачи тока через микроэлектрод, регулировка величины тока и его полярности, контроль сеточного тока, регулировка тока для хлорирования. Блок рассчитан для одновременной работы с двумя катодными повторителями. Мы не описываем здесь работу блока питания и блока управления и приведем только его принципиальную схему.

в. Усилительная и регистрирующая аппаратура

Сигнал с выхода катодного повторителя подавался на катодно-лучевой осциллограф СІ-І9Б для усиления и визуального контроля, а с выходных пластин осциллографа через де-

литель напряжения сигнал поступал для записи на один из каналов шлейфного осциллографа Н-102. Скорость протяжки пленки 10 мм в сек при парной и одиночной стимуляции и 4 мм в сек при длительной ритмической стимуляции.



Рис.5. Внешний вид пульта управления катодного повторителя с блоком питания.

4. Регистрация механической активности

Существует два режима сокращений мышцы-изометрический и изотонический. Каждый из них требует применения специальных датчиков (датчиков перемещения и напряжения). Нами были испытаны оба режима регистрации сокращений. В работе предпочтение было отдано регистрации механической активности миокарда при помощи механотрона (изометрический режим). Это было сделано по следующим соображениям. Изометрический режим позволяет уменьшить подвижность препарата, что дела-

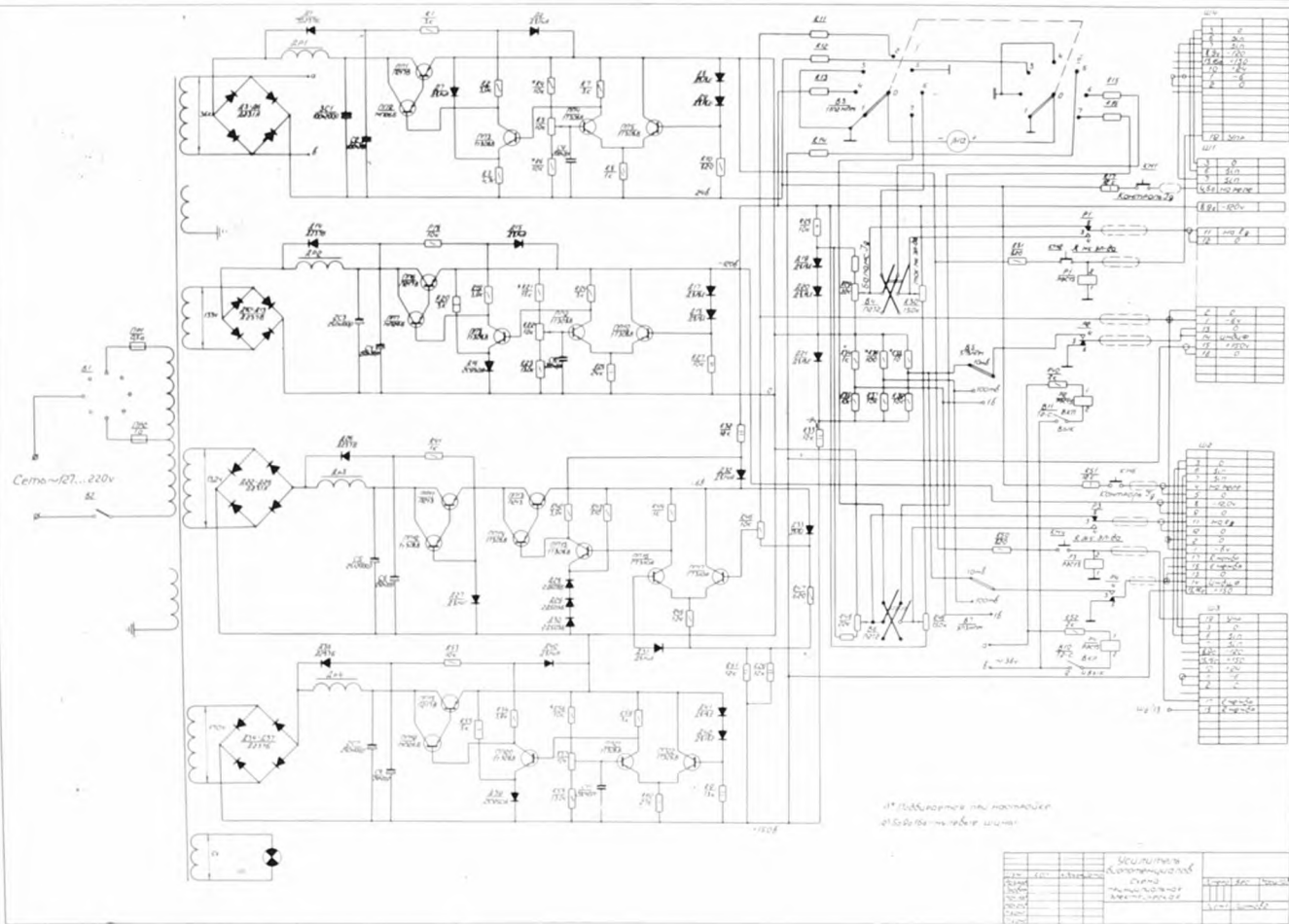


Рис. 6. Принципиальная схема блока питания катодного повторителя.

ет регистрацию электрической активности при помощи техники микроэлектродов более устойчивой (примерно в 3-4 раза). Механотрон является значительно более чувствительным по отношению к тензодатчикам прибором, что позволяет использовать тонкие полоски (до $0,5 \text{ мм}^2$).

В наших экспериментах механическое напряжение регистрировалось при помощи механотрона 6MXIC (сдвоенный диод с подвижными анодами), включенного в электрическую схему, приведенную на рис.7.

Когда к перу механотрона прикладывается механическое напряжение, анодные токи в цепях R_1 и R_2 перераспределяются, что приводит к возникновению напряжения на выходе схемы. Линейность выходной характеристики не хуже 1% обеспечивается соответствующим режимом работы механотрона. Питание осуществляется от стабилизированных источников типа "Александрит". Сопротивление R_1 служит для выбора рабочей точки механотрона, которая выставляется по нулевому уровню выходного напряжения.

С целью увеличения чувствительности сигнал с выхода схемы подавался на осциллограф CI-19Б, а затем, через выносной делитель, на один из входов шлейфного осциллографа Н-102.

Конструктивно механотрон прикреплялся к манипулятору, при помощи которого имелаась возможность плавно изменять натяжение препарата. Полоска миокарда, предварительно привязанная к нитке, закреплялась на кончике пера механотрона специальным крючком. В принципе установка позволяет соответствующей установкой сопротивления R_2 и последующим выво-

дом выходного напряжения на ноль при помощи манипулятора давать на полосу миокарда дозированную статическую нагрузку.

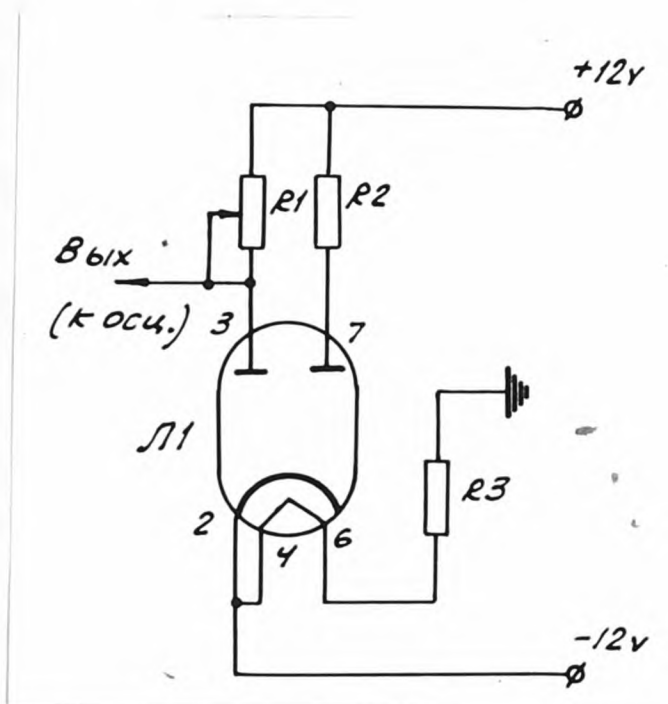


Рис.7. Принципиальная электрическая схема усилителя механотрона.

Л1-механотрон 6MX1E, R_1 -3,3к, R_3 -27ом.

5. Программируемая стимуляция и раздражение препарата

а. С т и м у л я ц и я

Стимуляция препаратов осуществлялась стимулами отрицательной полярности длительностью 2-10 мсек через высокочастотные развязывающие приставки от стимулятора ЗСЛ-1. Сила тока всегда была сверхпороговой. Один (индифферентный) электрод был каломельным и имел большую площадь контакта с раствором, другой (стимулирующий) находился у поверхности

препарата в тестирующей камере.

Использование одного малого и одного большого электрода дает возможность получить униполярное раздражение (*Stainfield, Hoffman, Siebens* - 1957), причем возбуждение возникает на малом электроде. Ритм сердца в промежутке между воздействиями заданной частоты поддерживался при $T=10$ сек. Перед очередным воздействием в зависимости от предистории препарата (частотной нагрузки или фиксирующего тока) давалась пауза от 30 сек до 3-5 мин.

Так как в задачу настоящего исследования входило выяснение влияния режима работы сердца на параметры механической и электрической активности миокарда, принципиально важным было избавиться от естественной пейсмекерной активности. В большинстве случаев это достигалось сразу при вырезании полоски миокарда. Когда проявлялась автоматия, эффективным приемом ее устранения являлась стимуляция препарата с частотой 0,5-0,8 сек в течение 3-5 минут.

б. Генератор раздражающего тока

Программируемая фиксация тока на мембране осуществлялась от специально сконструированного генератора тока. Характерной особенностью генератора является то, что он управляется от специального импульсного напряжения и выдает ток в форме трапеции по длительности равный управляемым импульсам. Скорость нарастания тока и спада регулируется, с целью устранения явления самовозбуждения. В наших опытах полное время нарастания раздражающего (фиксирующего мембрану) тока регулировалось от 10 мсек до 1 сек, длительность фиксирующего

тока варьировалась от 0,1 сек до ∞ , сила тока через весь препарат с учетом шунтирования составляла от 0 до $5 \cdot 10^{-3}$ а.

Электрическая схема генератора тока трапецевидной формы представлена на рис.8. По существу схема представляет собой генератор с линейно нарастающим и линейно спадающим фронтами импульса, которое через большое сопротивление R_6 прикладывается к раздражающим электродам. Передний фронт регулируется сопротивлением R_2 , задний фронт сопротивлением R_4 . Длительность генерируемого тока определяется длительностью управляющего сигнала. Реверс тока осуществляется тумблером Т1. Начало импульса раздражения привязыва - лось к импульсу стимуляции в интервале от 0,1 сек до 15 сек.

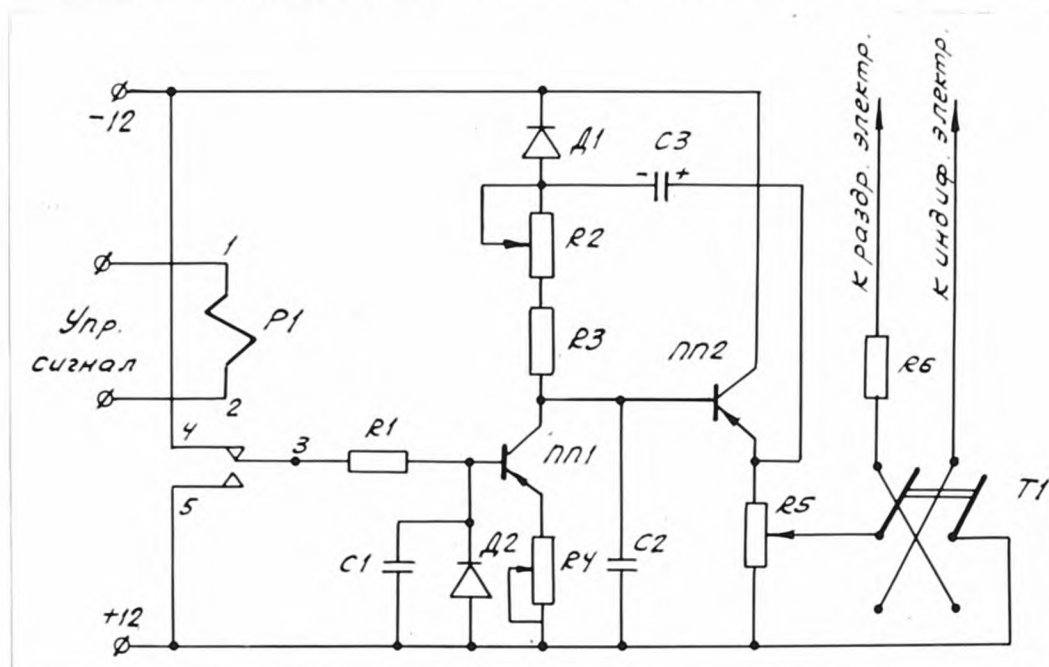


Рис.8. Блок выработки трапецевидных импульсов тока.
ПП1, ПП2-транзистор П25, П1- реле РЭС-10, Т1-тумблер,
В2Т, R_1 -6,2 к, R_2 -240 к, R_3 -1 к, R_4 -680 ом,
 R_5 -1 к, R_6 - 2,4 к.

в. Блок управления

С целью задания сложных режимов работы клеток миокарда был разработан блок управления генератором стимуляции и генератором фиксирующего тока. В рамках диссертации не представляется возможным рассмотреть полную электрическую схему устройства управления, поэтому опишем кратко его блок-схему, которая представлена на рис.9. Генератор серий I запускает генератор импульсных сигналов 2, который выдает короткие запускаящие импульсы через схему "или" 3 на выход А и одновременно на счетчик импульсов 4. Счетчик работает таким образом, что по достижении заранее установленного кода по числу необходимых импульсов в пачке он срывает генератор импульсных сигналов и дает импульс в линии задержки 5 и 7. Выходной импульс с линии задержки 5 поступает на формирователь импульсов и далее через схему "или" 3 на выход А, тем самым генерируя тестирующий импульс стимуляции. Привязка тестирующего импульса к последнему импульсу в пачке осуществлялась со временем от 0,2 сек до 30 сек. Выходной импульс с выхода линии задержки 7 запускает формирователь управляющего импульса для генератора раздражающего тока. В установке имеется возможность привязки тестирующего импульса непосредственно за импульсом фиксирующего тока, а также наоборот - возможность привязки фиксирующего тока к импульсам стимуляции, в том числе и к тестирующему импульсу.

В целом установка позволяет осуществлять следующие режимы стимуляции препарата и фиксации тока на мембране.

I. Периодическое возбуждение клеток миокарда с любой частотой на фоне постоянного деполяризующего или гиперполя-

ризирующего тока мембраны и без него.

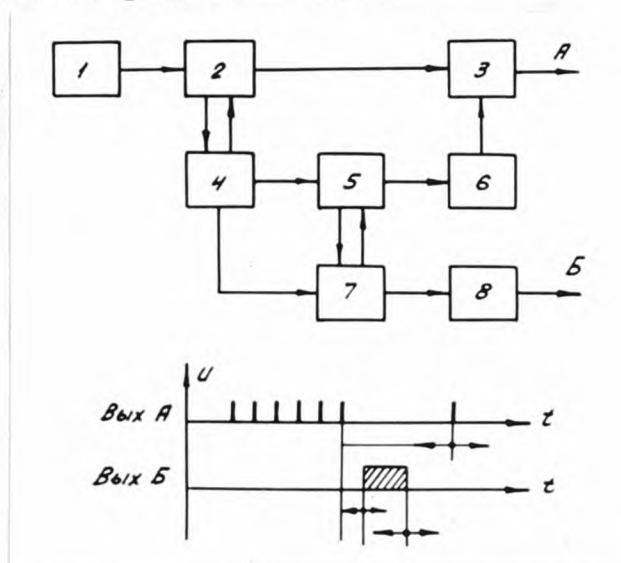


Рис.9. Блок-схема устройства управления стимуляцией и раздражением

1 - генератор серий импульсов; 2 - генератор периодических импульсов; 3 - схема "или" и формирователь импульсов для блока стимуляции; 4 - счетчик импульсов; 5 - формирователь задержки тестирующего импульса; 6 - генератор тестирующего импульса; 7 - формирователь задержки импульса раздражения; 8 - формирователь управляющего импульса для генератора раздражающего тока.

А - временная диаграмма импульсов, управляющих стимуляцией;

Б - временная диаграмма импульса управления раздражением.

2. Периодическое возбуждение клеток миокарда на любой частоте при кратковременной фиксации тока на мембране (как периодической, так и аperiodической) с любыми привязками к ЦД.

3. Вырабатывать на период заданную пачку импульсов с произвольной привязкой тестирующего импульса. При этом фиксирующий ток мембраны может подаваться во время любой фазы

ПД и диастолы.

4. Осуществлять предварительную фиксацию тока на мембране с последующей стимуляцией миокарда на любой частоте и одиночным импульсом.

6. Вспомогательные устройства

Для устранения артефакта, связанного с падением напряжения в растворе и на каломельном электроде при наличии фиксирующего тока мембраны, а также артефакта, связанного с наличием контактного потенциала, использовались схема нейтрализации, приведенная на рис.10. Последовательно с индифферентным электродом включены часть сопротивления $R1$, часть сопротивления $R2$ и генератор калиброванного напряжения, запускаемый вручную. При помощи потенциометра $R1$ и тумблера $T1$ нейтрализуется контактный потенциал микроэлектрод-раствор, который регистрируется сразу же, как только кончик микроэлектрода коснется раствора тестирующей камеры. Потенциометр $R2$ и тумблер $T2$ позволяют убрать артефакт раздражающего тока. Это достигается при подаче фиксирующего тока, до того как микроэлектрод введен в клетку, но находится в растворе.

Введение калиброванного импульсного напряжения в цепь последовательно с индифферентным электродом при помощи управляющего реле $P2$ (рис.6) позволяет калибровать регистрируемые ПД.

Для удобства в работе и установке предусмотрена схема для измерения сопротивления микроэлектродов (сопротивление $3I$, $KH2$, реле PI на рис.6).

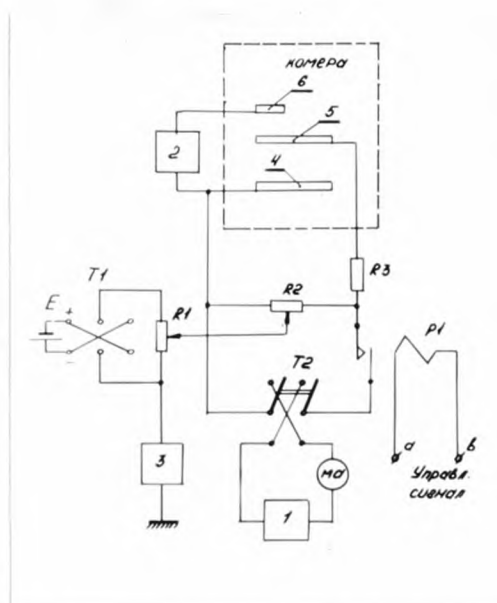


Рис.10. Схема устранения артефактов.

1 - генератор трапецевидного напряжения; 2 - высокочастотная выносная головка стимулятора; 3 - генератор калиброванных импульсов; 4 - индифферентный электрод; 5 - электрод для фиксации тока; 6 - стимулирующий электрод; Ма - прибор для контроля фиксирующего тока, $R1, R2 - 1 \text{ к}$, $R3 - 2,4 \text{ к}$.

7. Порядок исследований.

После установки полоски миокарда в камеру она подвергалась стимуляции с частотой $0,1 \div 0,2$ (1 /сек) в течение $10 \div 20$ минут, после чего препарат был готов к опыту. Хорошим средством активации препарата являлось попеременное приложение коротких (не более 0,4 сек) толчков деполяризующего и гиперполяризующего тока. Пропускание сильного (более 3 ма) деполяризующего тока в течение длительного времени ($20 \div 30$ сек) приводит к необратимым процессам.

Ритмическая стимуляция проводилась на фиксированных частотах ($n = 10-15$ импульсов, $f = 0,1 \frac{1}{\text{сек}}$; $0,2 \frac{1}{\text{сек}}$; $0,4 \frac{1}{\text{сек}}$; $1,0 \frac{1}{\text{сек}}$). Промежутки между сериями обычно составляли одну минуту. При фиксации тока на мембране более 1-2 сек пауза между сериями увеличивалась до 2-3 минут, при этом с целью тестирования и лучшего восстановления препарата иногда давалась периодическая стимуляция на частотах $f = 0,1$ ($1 / \text{сек}$). При достижении амплитуды сокращения до исходного уровня давалась 1 мин. пауза и записывалась новая серия. Время записи одной серии импульсов колебалось от 30 до 120 сек.

Ввиду большой продолжительности опытов и трудоемкости продолжительного отведения электрической активности с клеток миокарда, в основном изучалось воздействие тока на изменение параметров сокращения. Регистрация ПД производилась избирательно в отдельные моменты опыта.

Метод парных стимулов использован для оценки влияния тока на зону последствия одиночного возбуждения. Под зоной последствия понимается тот временной интервал, на котором сказывается действие первого возбуждения на параметры ПД и сокращения второго (тестирующего) возбуждения. После 30-60-секундного покоя давался первый стимул и возникало первое возбуждение препарата (фоновый импульс), затем через определенный период времени давался второй (тестирующий) импульс. При этом фиксация тока на мембране осуществлялась по желанию - во время первого ПД, во время диастолы, во время второго возбуждения или не давалась вообще. При изменении интервала между стимулами прослеживалось изменение параметров ПД и сокращения второго возбуждения по отношению к первому.

Этот метод позволяет исключить кумулятивные эффекты ритмической стимуляции и проследить следовые явления, имеющиеся после одиночного возбуждения.

8. Материал диссертации

Представляемый материал основан на 146 опытах, из них в нормальном растворе 66 в гиперкальциевом растворе 30, в гипонатриевом - 26. При действии специфического блокатора натриевого канала-тетродотоксина, а также блокатора активного переноса натрия-строфантина было проведено 24 опыта.

ГЛАВА III

ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ И МЕХАНИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МИОКАРДА ПРИ ДЕЙСТВИИ ДЕПОЛЯРИЗУЮЩЕГО И ГИПЕРПОЛЯРИЗУЮЩЕГО ТОКА В НОРМАЛЬНОМ РАСТВОРЕ

В настоящей главе используется функциональная связь параметров сокращений с параметрами ПД, а также зависимость электрической и механической активности миокарда от параметров фиксирующего тока, приводятся данные по изменению процессов активации и инактивации сокращений в клетках миокарда при фиксации тока на мембране. Обсуждаются некоторые аспекты действия фиксирующего тока. В ходе проведения данной серии опытов мы пытались установить воздействие толчков тока на параметры ПД и сокращений и ответить на следующие вопросы:

- 1) какова функциональная связь параметров фиксирующих толчков тока с длительностью ПД;
- 2) какова функциональная связь амплитуды и длительности сокращений с длительностью и силой фиксирующих толчков тока;
- 3) как изменяется контрактильный ответ во времени в зависимости от силы фиксирующего тока при длительной деполяризации и гиперполяризации мембраны;
- 4) какова функциональная связь между длительностью ПД и величиной механического ответа в условиях естественного электрогенеза;
- 5) в какой фазе ПД пропускание тока через мембрану наиболее эффективно сказывается на параметрах сокращений?

Данная серия опытов проведена на 36 препаратах. Электрическая активность была зарегистрирована из 80 клеток. Одновременная регистрация потенциалов действия и сокращений проведена на двадцати двух препаратах.

Наиболее характерным эффектом деполяризующих толчков тока во время одиночных возбуждений является увеличение амплитуды и длительности сокращений (рис. II). При некоторых условиях изменяется и форма сокращений. Постепенное увеличение длительности деполяризующего тока при постоянной его силе ведет сначала к пропорциональному приросту амплитуды и длительности сокращений, а затем к изменению их формы. Из рисунка II видно, что при малых длительностях толчков значительно изменяется амплитуда сокращений, при этом длительность сокращений изменяется мало. После того, как амплитуда контрактильного ответа достигнет некоторого уровня, характерного для каждой определенной силы тока, она остается практически неизменной. Длительность сокращений изменяется пропорционально длительности деполяризующего импульса. Контракtilный ответ не удерживается на максимуме. При больших длительностях деполяризующего тока наблюдается сначала быстрая, а затем очень медленная инактивация контрактильного ответа. Быстрая фаза инактивации выражена тем меньше, чем выше величина деполяризующего тока (рис. I2). Из данного рисунка видно, также, что чем больше сила деполяризующего импульса, тем больше относительный прирост максимальной амплитуды сокращения. Таким образом, влияние деполяризующих толчков тока выражено тем сильнее, чем больше их сила и длительность.

Кинетика расслабления после снятия деполяризующего толчка тока практически не зависит от длительности воздействующего импульса. На рис. I3 приведена суперпозиция контрактильных ответов при действии деполяризующих толчков тока разной силы и длительности. Из рис. видно, что удерживаемая контрактура тем выше, чем больше сила воздействующего тока. Длительность сокращений, по существу, определяется длительностью воздействующего импульса. Резких изменений в форме первой фазы сокращений при вариациях силы и длительности фиксирующего импульса не наблюдается. Имеется лишь незначительное увеличение скорости нарастания контрактильного ответа, которая пропорциональна силе тока. Однако заметим, что форма сокращений претерпевает значительные изменения при изменении времени привязки фиксирующего импульса (t_{np}) по отношению к импульсу раздражения (рис. II з, и, к, л).

Гиперполяризующий ток, задаваемый во время сокращений, обладает действием, противоположным деполяризующему — подавляет амплитуду сокращений и уменьшает их длительность вплоть до полного подавления сократимости. Сказанное иллюстрируется рис. I4б, где для сравнения даны одновременно эффекты и деполяризующего и гиперполяризующего токов. Неожиданные явления наблюдались при действии сильного гиперполяризующего тока. Если подавать гиперполяризующие толчки средней силы без предварительного, запускающего стимула, то это не приводит к возникновению ЦД и сокращений, хотя точно такой же деполяризующий ток ведет к возникновению сильной деполяризующей контрактуры. При снятии такого гиперполяризующего тока

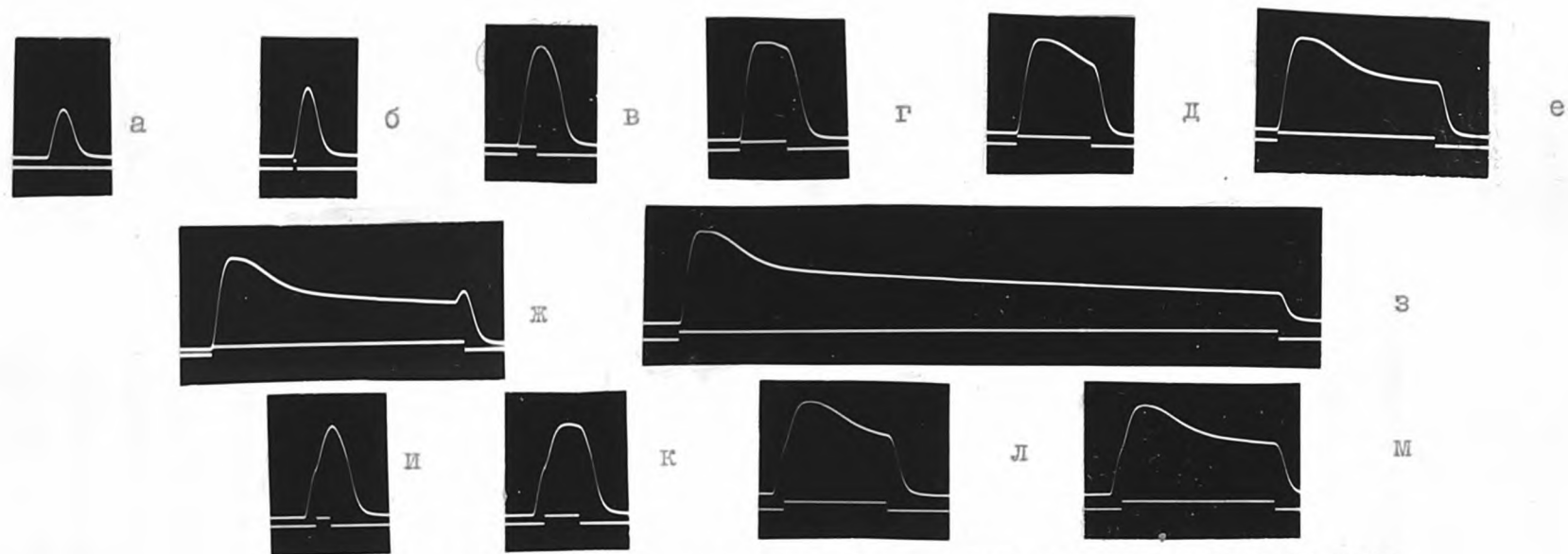


Рис. II. Сокращения миокарда при действии деполяризующих толчков тока различной длительности (верхние-кривые - сокращения, нижние - толчки тока, отклонение вверх - деполяризация)

а - фон, б, в, г, д, е, ж, з - длительность деполяризующих толчков тока равна соответственно 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 2,4; 4 и 10 сек, привязка к раздражающему стимулу - 0,1 сек; и, к, л, м - то же и в, г, д, е - привязка 0,4 сек.

развивается обычное анодразмыкательное возбуждение и сокращение. Однако, при сильном гиперполяризующем токе возникает контрактильный ответ типа контактуры^Р и его кинетика во многом отличается от кинетики деполяризующих контрактур (рис.14 в-г). Во-первых процесс инактивации развивается крайне медленно или вообще отсутствует. Во-вторых, при длительном действии сильного гиперполяризующего тока через некоторое время после начала толчка (это время тем меньше, чем больше сила тока) наблюдается дополнительный подъем на кривой сокращения пропорциональный силе и длительности тока. В-третьих, по прекращении действия гиперполяризующего тока развивается дополнительная контактура^Р с крайне медленным расслаблением. Амплитуда этой анодразмыкательной контактуры тем выше, чем больше длительность предшествующей гиперполяризации (рис.15). После прекращения действия сильного гиперполяризующего тока и спада анодразмыкательной контактуры амплитуда одиночных сокращений возвращается к нормальному уровню.

До этого момента амплитуда сокращений, вызванных на фоне анодразмыкательной контактуры обычно больше фоновых сокращений. Примечательно, что амплитуда анодразмыкательной контактуры пропорциональна длительности гиперполяризующего тока, (рис.15). С другой стороны, скорость расслабления тем ниже, чем выше величина предшествующего гиперполяризующего тока.

Характерно, что на свежем препарате ток всегда более эффективен, по сравнению с полосками, которые

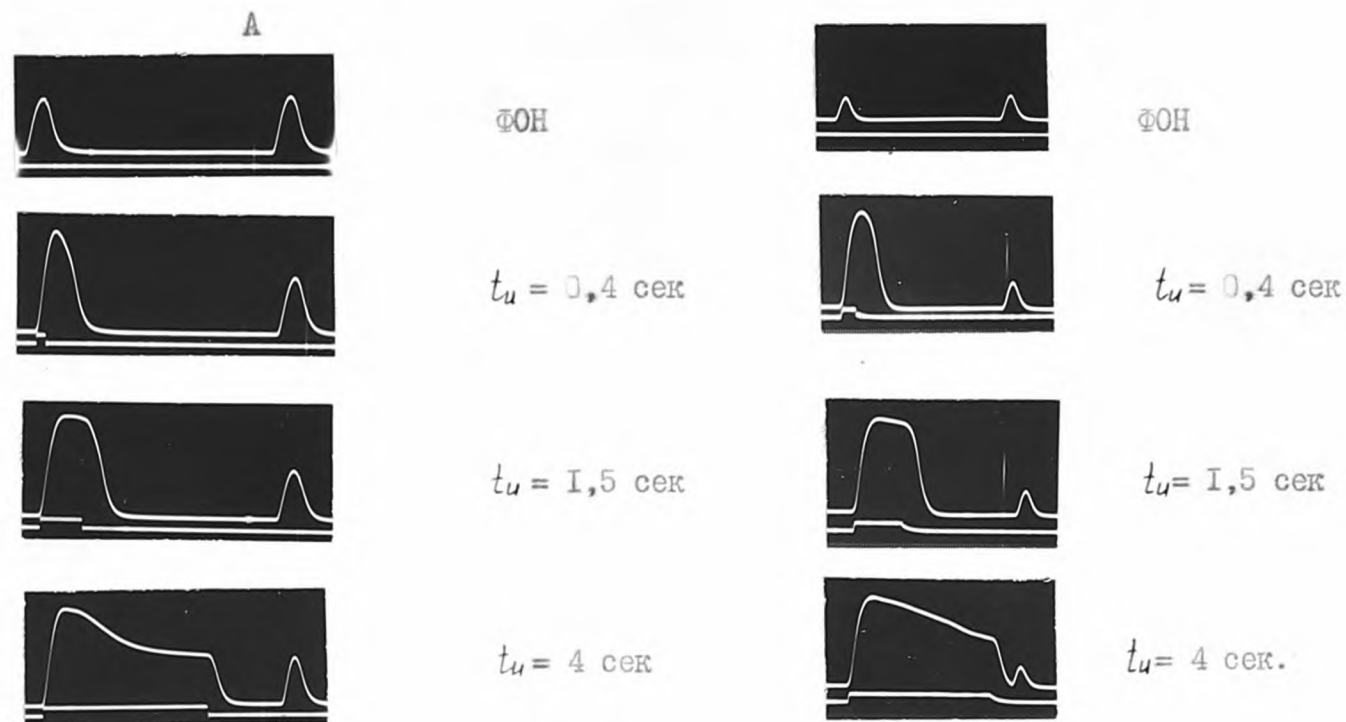
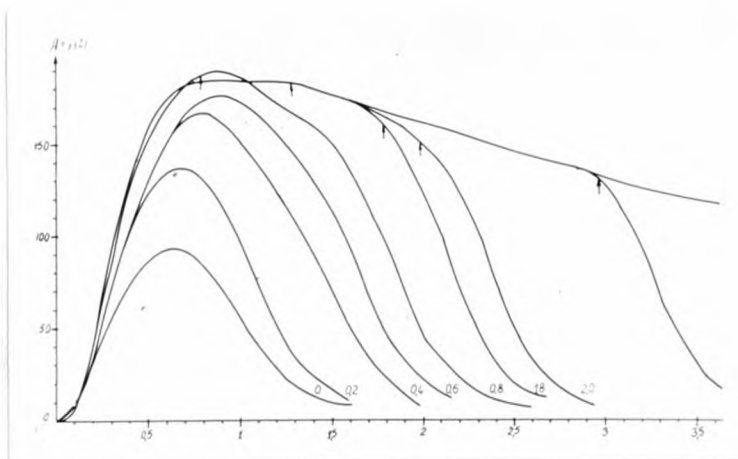
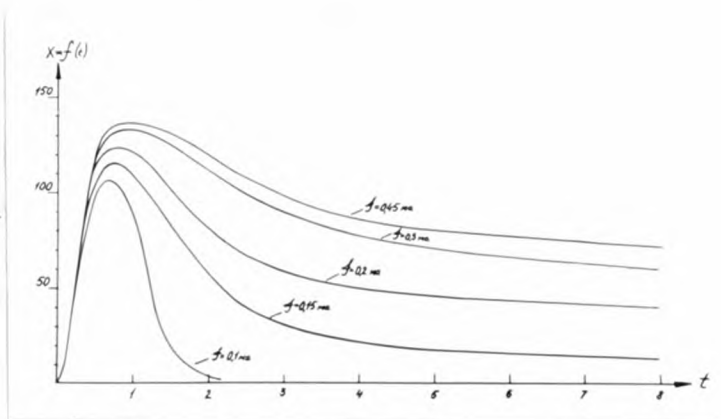


Рис.12. Сокращения в зависимости от силы деполяризующих толчков тока.

А - сила тока равна 0,5 ма, Б - сила тока равна 1,2 ма (усиление в 2 раза ниже, чем в А).



А



Б

Рис. 13. Суперпозиция контрактильных ответов миокарда при вариациях силы и длительности деполяризующих толчков тока

А - зависимость от длительности тока, $I_g = 1,2$ ма, стрелками указаны моменты снятия толчков тока;

Б - зависимость от силы деполяризующего тока, $t_w = 10$ сек.

несколько часов находились в работе или подвергались длительному воздействию деполяризующих толчков тока. Данное явление вряд ли можно объяснить ухудшением со временем функционального состояния препарата, поскольку амплитуда сокращений после длительного применения деполяризующего тока не только не падает, но даже возрастает, по сравнению с амплитудой сокращений в начале опыта. Вероятней всего, снижение эффективности деполяризующего тока со временем может быть связано с уменьшением внутриклеточных запасов кальция, высвобождаемых при деполяризации, либо с адаптивными изменениями в поверхностной мембране, что приводит к уменьшению эффективности электромеханического сопряжения.

После действия гиперполяризующего тока не наблюдается снижение чувствительности препарата к действию тока обеих полярностей. Исследования показали, что восстановление чувствительности миокарда к деполяризующим толчкам тока происходит крайне медленно. Гиперполяризующие толчки тока, прикладываемые к такому препарату, восстанавливают эту чувствительность значительно быстрее. Опыты с одновременной регистрацией электрической и механической активности показали, что положительное инотропное действие деполяризующего тока всегда сопровождается той или иной степенью удлинения фазы плато ПД (рис.16). После прекращения действия деполяризующего тока кинетика фазы быстрой конечной реполяризации не отличается от кинетики этой фазы без тока. Как видно из рисунка, гиперполяризующий ток укорачивает ПД за счет уменьшения длительности фазы плато, форма конечной быстрой реполяризации при этом не меняется. Необходимо отметить, что деполяризу-

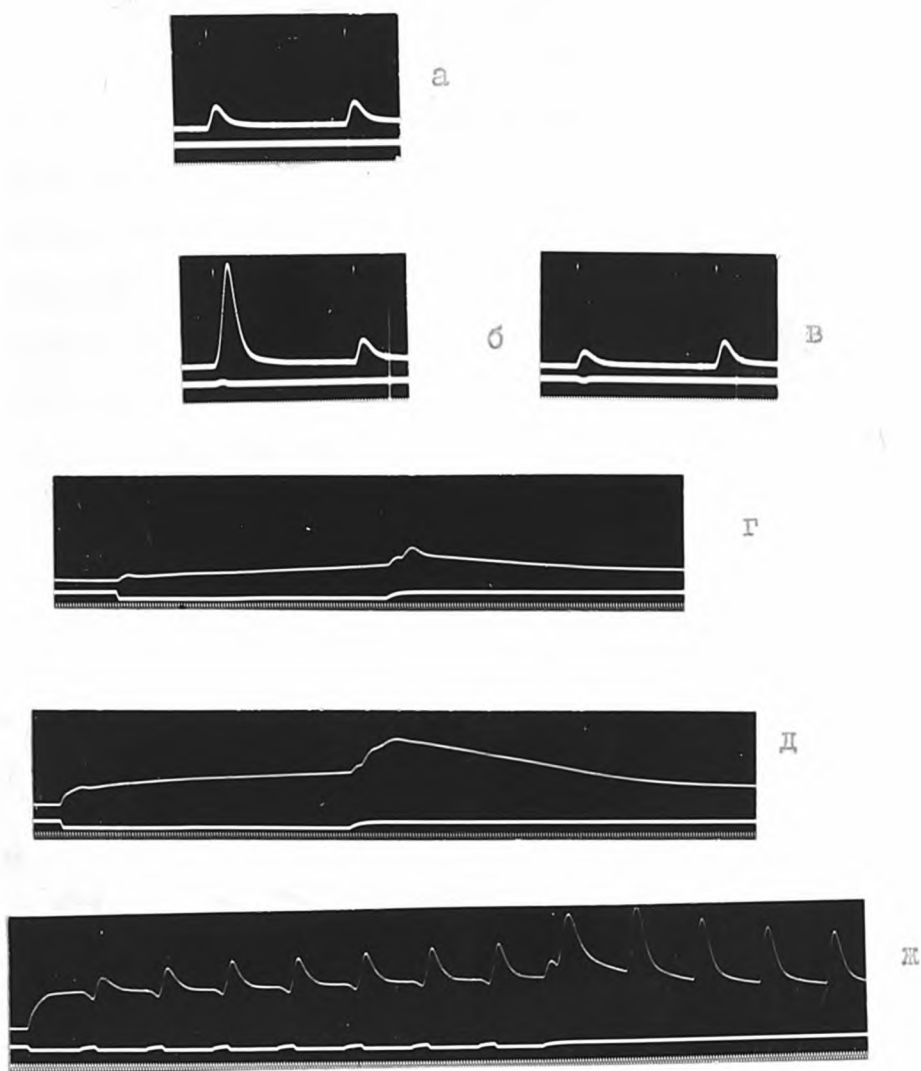


Рис.14. Эффекты гиперполяризующего тока

а - фон; б, в - сокращения при коротких деполяризующих и гиперполяризующих толчках тока, длительность $t_u = 0,4$ сек, $I_g = I_2 = 0,5$ ма;
 г - гиперполяризующая контрактура $I_2 = 1$ ма;
 д - гиперполяризующая контрактура $I_g = 2$ ма;
 ж - ритмическая ($T=2$ сек) стимуляция на фоне сильных ($I_g = 2$ ма) гиперполяризующих толчков тока.

ющий ток, прикладываемый во время фазы плато ПД, во много раз эффективнее, нежели толчки тока той же полярности и интенсивности, которые прикладывались во время диастолы (для того, чтобы на толчок тока не возникал ПД, деполяризующие толчки имели небольшую крутизну нарастания — трапецевидные импульсы). Это, на наш взгляд, свидетельствует о существенной нелинейности функции потенциал-высвобождение кальция и о возможном вкладе в высвобождение кальция ионов натрия, вход которых резко возрастает при развитии регенеративной деполяризации.

Нелинейна также связь длительности ПД с длительностью фиксирующего тока. На рис. 17 представлено изменение длительности ПД и параметров сокращения от длительности деполяризующего толчка. Видно, что вначале длительность ПД растет пропорционально длительности прикладываемых толчков тока. Максимум амплитуды сокращений совпадает с моментом быстрой реполяризации. По мере увеличения длительности прикладываемого толчка указанная пропорциональность нарушается. Максимум сокращения смещается и приходится на фазу плато.

Это явление можно объяснить, если принять во внимание данные по изучению сопротивления мембраны во время фазы плато. Оно наибольшее в начале плато и постепенно падает. Следовательно, толчок деполяризующего тока приведет к большему смещению потенциала в начальной части плато, что удлинит ПД за счет дополнительной инактивации калиевой проницаемости.

Большой прирост потенциала от деполяризующего тока в начальную фазу плато приводит к большему высвобождению

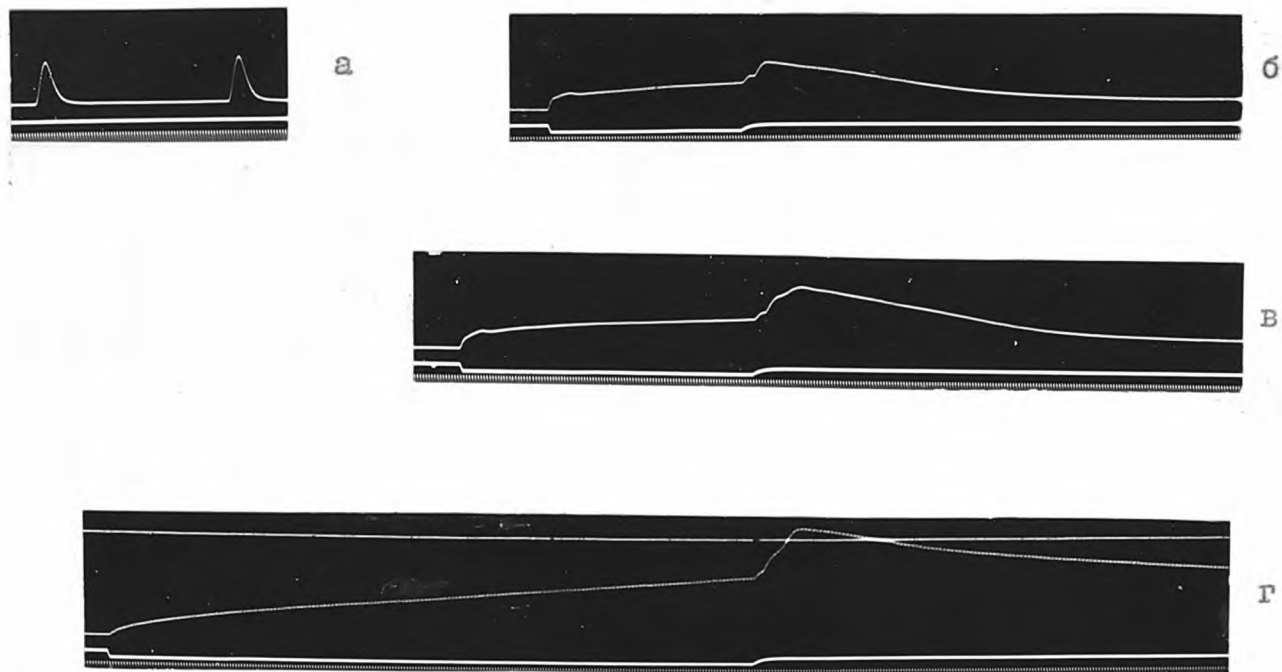


Рис.15. Изменение анодразмыкательной контрактуры в зависимости от длительности предшествующей гиперполяризации (сила тока везде - 2 ма)

а - фон; б - длительность гиперполяризации - 5 сек; в - 7,5 и г - 15 сек.

по сравнению со случаем, когда ток прикладывается в заключительную часть плато. Смещение максимума сокращений при длительных толчках тока можно объяснить "насыщением" сокращений и развивающимся процессом инактивации. Это предположение полностью согласуется с данными экспериментов, которые иллюстрируются на рис.18. Здесь деполяризующие и гиперполяризующие толчки тока прикладывались к мембране одной и той же силы и длительности, но привязка к импульсу стимуляции была различной. Из рисунка видно, что положительный инотропный эффект деполяризующего тока тем ниже, чем дальше фиксирующий импульс расположен от фазы быстрой деполяризации. При дальнейшем увеличении времени привязки фиксирующий импульс вызывает внеочередную генерацию ПД и приводит к появлению второго сокращения. Значительное превышение второго сокращения над первым объясняется действием деполяризующего толчка тока, который в данном случае приходится на фазу быстрой деполяризации и начальную часть плато второго ПД.

Чувствительность к гиперполяризующим толчкам тока также выше, если они задаются в начальную фазу ПД. Подавление выражено значительно сильнее, если время привязки составляет 0,1 сек. При привязке фиксирующего импульса равной 0,4 сек подавления сокращений практически не наблюдается. Если гиперполяризующие толчки тока прикладывать в период быстрой реполяризации, возникает новое возбуждение и сокращений. Прирост амплитуды второго сокращения при этом не отмечается, поскольку в начальную фазу второго ПД действует гиперполяризующий ток.

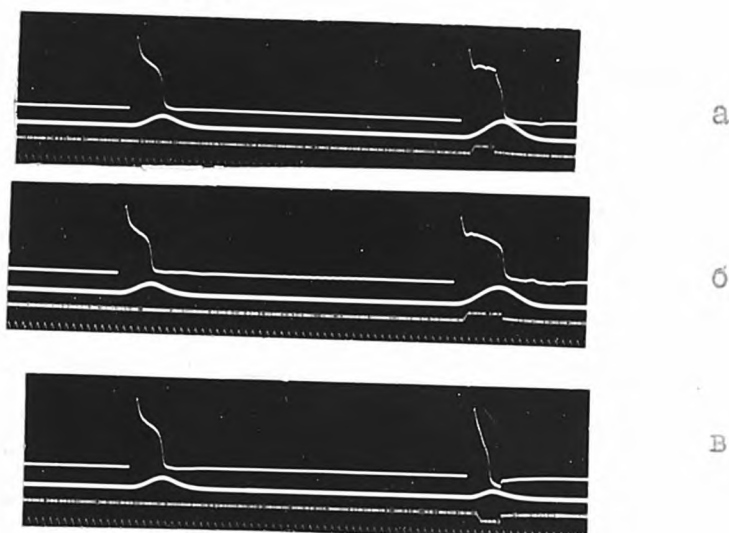


Рис.16. ПД и сокращения при действии деполяризующих и гиперполяризующих толчков тока.

Сверху вниз — кривые ПД, сокращения, отметка тока (вверх — деполяризующий ток, вниз — гиперполяризующий), отсчет времени = 100 мсек.

- а) $I_g = 0,5$ ма; $t_u = 0,3$ сек; б) $I_g = 0,5$ ма, $t_u = 0,6$ сек;
в) $I_z = 0,5$ ма, $t_u = 0,3$ сек.

Характер взаимосвязи между длительностью толчков тока и длительностью ПД, а также между длительностью толчков тока и амплитудой сокращений приведен на рис.19. Пунктирная линия соответствует силе сокращения, сплошная — длительности ПД. На оси абсцисс откладывается длительность фиксирующего тока (сила тока постоянна). Отрицательная область t_u соответствует гиперполяризующему току, положительная — деполяризующему. Видно, что кривые несимметричны по отношению к деполяризующему и гиперполяризующему току, а кривая длительность толчка-амплитуда сокращений имеет S-образный вид, т.е. при некоторой длительности толчка сокращение достигает максимального для данных условий уровня. При увеличении силы толчков тока увеличивается крутизна линейного участка, а так-

же расширяется диапазон линейности. Сказанное иллюстрируется на рис.20. Видно, что большему значению фиксирующего тока при одной и той же длительности соответствует больший прирост амплитуды сокращений и больший прирост длительности ПД.

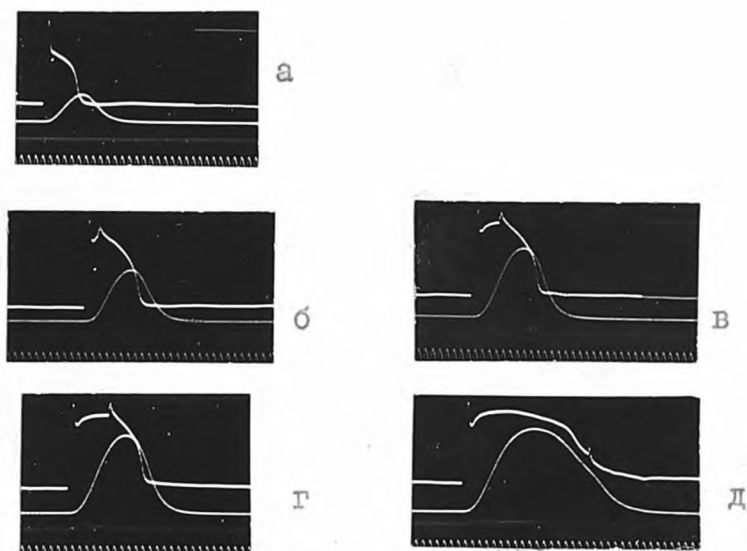


Рис.17. Изменение параметров ПД и сокращений в зависимости от длительности деполяризующих толчков тока.

а) - без тока, б) $t_u = 0,2$ сек, в) $t_u = 0,4$ сек,
г) $t_u = 0,6$ сек, д) $t_u = 1,8$ сек,

Сила тока везде равна 0,5 ма.

Зависимость амплитуды сокращения миокарда от длительности ПД приведена на рис.21. Из рисунка следует, что линейная зависимость наблюдается только при "естественных" длительностях ПД (0,45-0,85 сек). Это указывает на то, что длительность удерживаемой деполяризации является важным фак-

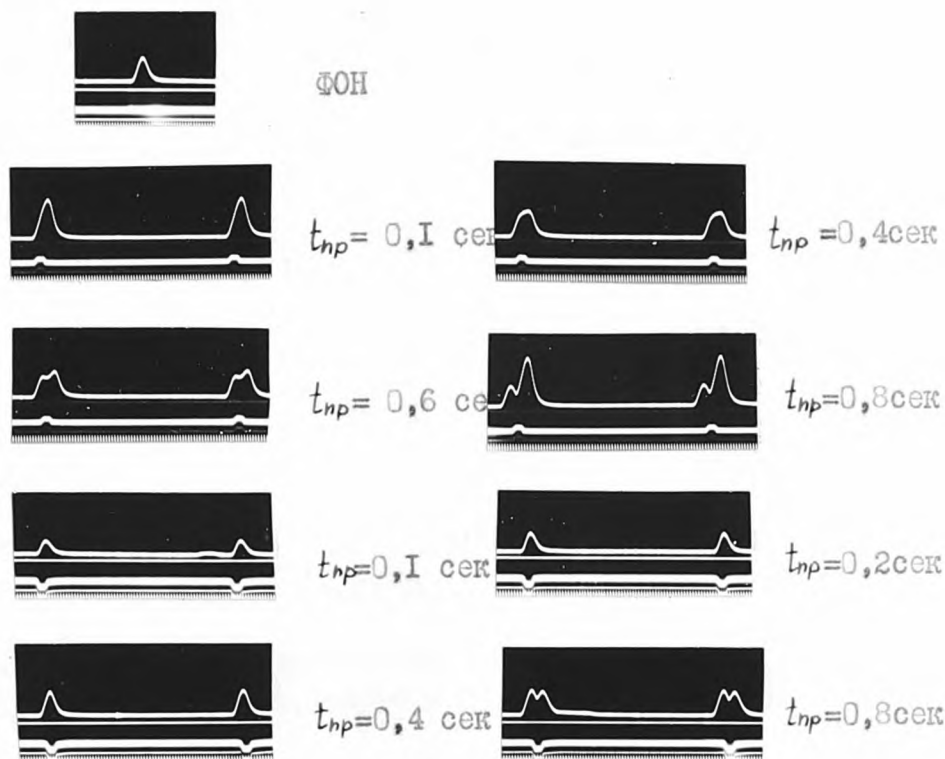


Рис.18. Изменение силы и формы сокращений в зависимости от времени привязки, толчка тока, к импульсу раздражения (длительность и сила толчков тока постоянна, $t_u = 0,4 \text{ сек}$, $U_g = U_z = 0,5 \text{ ма}$).

тором, определяющим сократимость миокарда.

Из результатов приведенных экспериментов следует, что амплитуда и длительность сокращений являются функцией длительности ПД, генерируемых на мембране. Этот момент является особенно важным, если учесть, что длительность ПД подвержена существенным изменениям при вариациях ритма сердцебиений, которое сопровождается хроноинотропными сдвигами сократимости. Можно считать, что сократимость миокарда при различных рит -

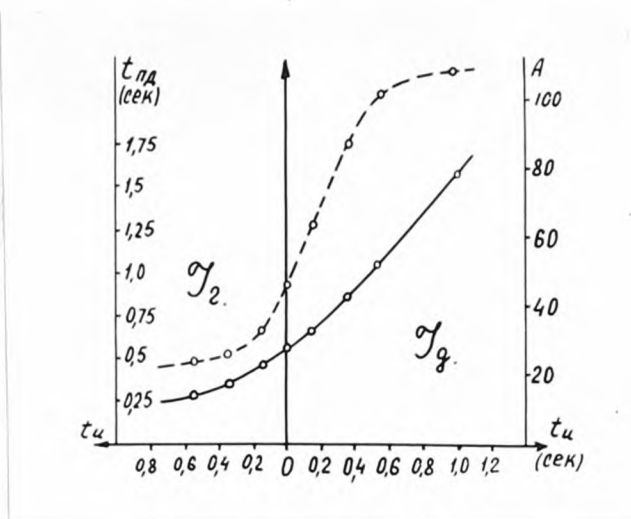


Рис.19. Зависимость длительности ПД и амплитуды сокращения от длительности толчков тока.

По оси абсцисс — длительность толчков тока (справа от нуля — деполяризация, слева — гиперполяризация).

По оси ординат — длительность ПД (шкала слева) и амплитуда сокращений в относительных единицах (шкала справа). Пунктирная кривая — сокращения, сплошная — длительность ПД.

мах сердцебиений регулируется через изменение длительности ПД. Приведенные опыты еще раз подтверждают, что в миокарде ПД не только триггер для возникновения сокращений, но и их регулятор. ПД осуществляют свое регулирующее действие на сокращения, вероятно, через количество ионов натрия и кальция, которые поступают в клетку при возбуждении из внеклеточной жидкости и/или высвобождаются из мест хранения внутри клетки (для миокарда лягушки, вероятней всего, из мест связывания у внутренней поверхности мембраны).

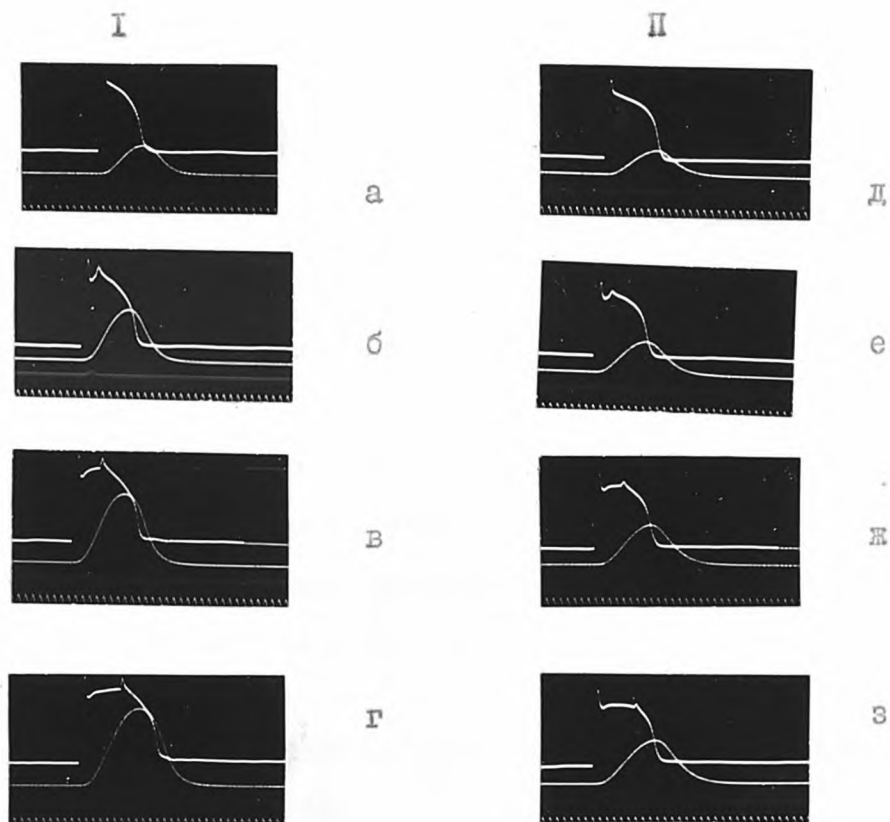


Рис.20. ПД и сокращения при деполяризующих толчках тока различной силы.

I - сила тока 0,75 ма, II - сила тока 0,25 ма
а, д - без тока; б, е - длительность тока $t_u = 0,2$ сек;,
в, ж - $t_u = 0,4$ сек; г, з - $t_u = 0,8$ сек.

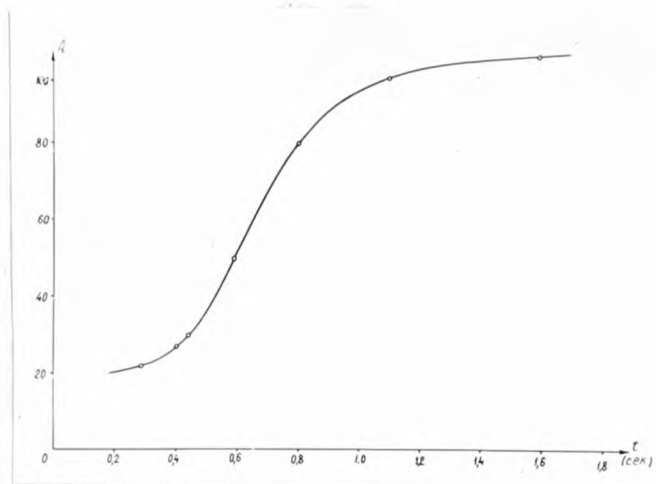


Рис.21. Зависимость максимальной амплитуды сокращений от длительности ПД.

Выводы

1. Пропускание деполяризующих толчков тока через мембрану во время потенциала действия увеличивает длительность фазы плато и одновременно длительность и амплитуду сокращений.
2. Гиперполяризующий ток укорачивает потенциал действия и подавляет сократимость.
3. Связь между длительностью потенциала действия и максимальной амплитудой сокращений в клетках миокарда S-образна.
4. Чувствительность миокарда к пропускаемому току во время потенциала действия значительно выше, чем во время диастолы. Причем чувствительность к току в первой фазе потенциала действия (0,1-0,4 сек после регенеративной деполяризации) значительно выше, чем в последующих фазах.

5. Чувствительность сокращений к деполяризующему току значительно выше, чем чувствительность к гиперполяризующим толчкам тока.

6. Постоянный деполяризующий ток вызывает контрактильный ответ подобный контрактуре при калиевой деполяризации с выраженной инактивацией.

7. Сильный гиперполяризующий ток приводит к возникновению контрактуры, в которой процесс инактивации выражен значительно слабее, чем при деполяризующих контрактурах. Более того, при больших токах и большой длительности наблюдается усиление контрактуры.

8. На снятие сильного гиперполяризующего тока возникает анодразмыкательная контрактура, параметры которой определяются длительностью и величиной предшествующей гиперполяризации.

ГЛАВА IV

ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ И МЕХАНИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РИТМИЧЕСКИ РАБОТАЮЩЕГО МИОКАРДА ПРИ ФИКСАЦИИ ТОКА НА МЕМБРАНЕ

Илотропные явления, возникающие в волокнах миокарда, при различных режимах стимуляции в значительной мере связаны с кумулятивными явлениями (Изаков В.Я. — 1971). Основным элементом, из которого складывается частотнозависимая потенция, посттетаническое облегчение и иные виды хроно-иотропной зависимости (Орлов Р.С., Изаков В.Я., Шевелев В.М. — 1971) является облегчение после одиночного сокращения. Как и в ряде других работ (Шевелев В.М. — 1971) под облегчением понимается прирост амплитуды тестирующего (второго) сокращения по отношению к фоновому (первому). Величина облегчения P выражается отношением амплитуды тестирующего сокращения к фоновому за вычетом единицы, так что при равенстве сокращений облегчение равно нулю. Анализ механизмов облегчения показывает, что клетки миокарда обладают механизмом, поддерживающим оптимум механического напряжения при различных частотах стимуляции и управление силой сокращения сердца при разных частотах, повидимому, производится посредством изменения параметров ПД и является важнейшим фактором саморегуляции клеток миокарда. Будучи автономной структурой с собственными пейсмекерными центрами, миокард как составной элемент, способный к саморегуляции сердечно-сосудистой системы,

в целом управляется влияниями, идущими к водителям ритма.

Можно полагать, что в структуре ПД закладывается информация для управления сократительной активностью, причем параметр (или параметры) ПД, через которые реализуются управляющие действия, должен быть функцией частоты генерации в запускающем устройстве.

Мнение большинства исследователей, занимающихся этой проблемой (*Kupka* , *Braveny* - 1961, *Koch - Weser* - 1971, *Naufel* - 1961), сходится на том, что влияние интервала стимуляции на силу сокращений происходит вследствие накопления некоторых химических факторов (гипотетические тормозящие и возбуждающие инотропные факторы, катехоламины, продукты метаболизма). Справедливость этого суждения вряд ли вызовет возражения, так как в основе сокращения лежат химические процессы и колебания концентраций физиологически активных веществ будут сказываться на характере сократительной деятельности миокарда.

Поскольку метод фиксации тока на мембране позволяет непосредственно влиять на параметры электрической и механической активности, в ходе естественного электрогенеза (здесь производятся только некоторые смещения в тех или иных ионных потоках, но не подменяется их природа), то изучение хронотропных явлений при помощи данной методики представляется особенно интересным.

Методом парных стимулов (Израков В.Я. - 1971) для миокарда желудочка лягушки было показано, что после одиночного ПД в течение 1,5-2 сек возникает так называемая "зона послед-
ствия", при попадании в которую параметры тестирующего ПД и

сокращения претерпевают значительные изменения. Задавая различные режимы фиксации тока, можно получить дополнительную информацию о природе процессов последствия и их роли в электромеханическом сопряжении. С этой целью было изучено:

1) изменение кривой облегчения сокращений при различных режимах фиксации тока на мембране (вариациях длительности и силы фиксирующего импульса, вариациях времени фиксации в фоновом импульсе, в тестирующем или в том и другом одновременно);

2) изменение параметров и формы переходных характеристик сокращения при разных частотах стимуляции на фоне постоянного деполяризующего и гиперполяризующего токов;

3) изменение параметров и формы переходных характеристик сокращений на разных частотах при разной силе и длительности фиксирующих толчков тока и кумулятивные явления, к которым приводит фиксация тока на мембране в различных режимах фиксации и стимуляции. Материал главы основан на 30 опытах.

I. Влияние фиксации тока на хроноинотропию миокарда

Как и в случае одиночных сокращений деполяризующие толчки тока небольшой длительности приводят к устойчивому увеличению амплитуды сокращений в ритмическом ряду (см. рис. 22). Гиперполяризующие толчки тока устойчиво подавляют амплитуду сокращений. При увеличении длительности толчков деполяризующего тока сначала растет амплитуда сокращений, а затем изменяется и форма сокращений (увеличивается длительность).

Толчки тока, прикладываемые синхронно с импульсами стимуляции, принципиально изменяют ход переходных характеристик. Характерной лестницы Боудича, которую мы привыкли видеть в ряду сокращений в нормальном растворе без тока, здесь не наблюдается (рис.23).

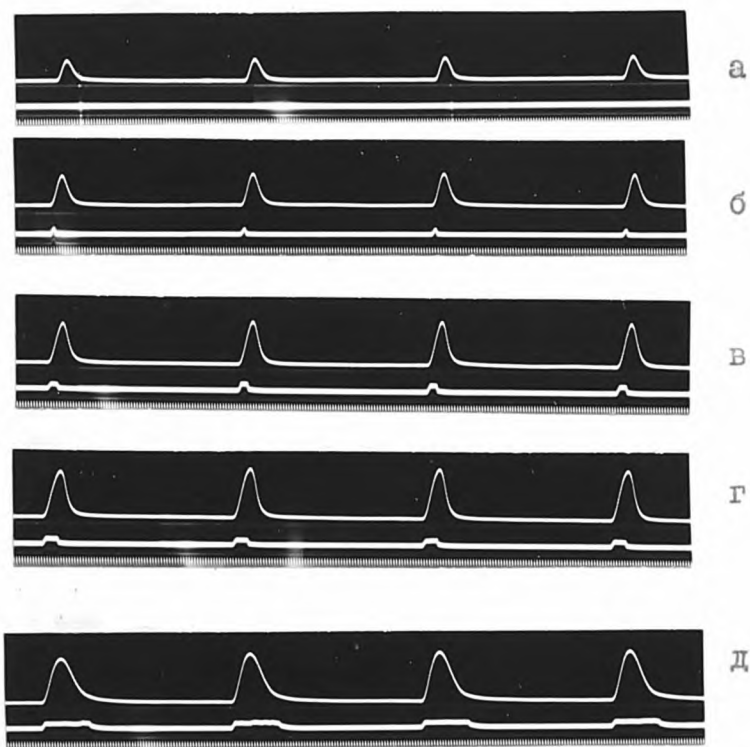


Рис.22. Изменение амплитуды сокращений ритмичност работающего миокарда при деполяризующих толчках тока различной длительности ($T=5$ сек, $\gamma_g = 0,3$ ма).

а - без тока, б, в, г, д - длительность толчков тока соответственно 0,2; 0,4; 0,6 и 1,2 сек.

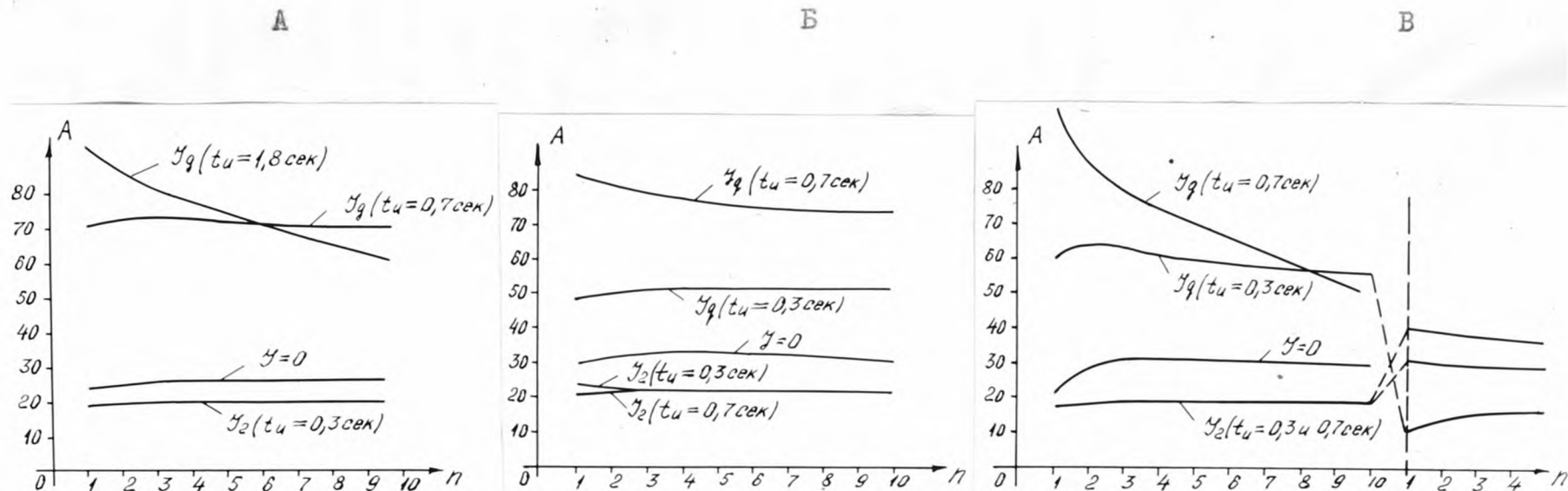


Рис.23. Зависимость переходных процессов амплитудных сокращений при различных толчках тока и частотах стимуляции.

А - период стимуляции 5 сек, Б - 2,5 сек; В - 1,6 сек.

Длительность и направление толчков тока указана над кривыми. Сила тока везде 0,8 ма. По оси абсцисс-номер сокращения, по оси ординат - амплитуда сокращений.

При деполяризующих толчках тока амплитуда сокращений в первом импульсе максимальна, а затем с повышением номера сокращений, постепенно падает и стремится к некоторому, характерному для каждой частоты стимуляции, значению. При редкой стимуляции ($T=5+10$ сек) и небольших значениях фиксирующего тока ($I < 0,2$ ма, $t_u \leq 0,4$ сек) процесс падения сокращений в ритмическом ряду выражен слабо. Амплитуда сокращений при этом может быть значительно больше исходной.

С повышением частоты стимуляции или увеличением силы или длительности фиксирующего тока процесс падения амплитуды сокращений в ритмическом ряду усиливается. (рис.23).

При действии гиперполяризующих толчков тока в ритмическом ряду сила установившихся значений сокращений падает. Причем, в зависимости от силы и длительности гиперполяризующих толчков тока вместо положительной лестницы Боудича может наблюдаться спад амплитуды с повышением номера сокращений (отрицательная лестница).

Изменения сократимости выражены значительно сильнее, если ритмическую стимуляцию производить на фоне постоянного гиперполяризующего или деполяризующего тока. (Рис.24). Падение сокращений при деполяризующем токе может быть настолько сильным, что установившееся значение сокращений может стать ниже исходных (в отсутствии тока), или даже ниже амплитуды при гиперполяризующем токе. Сравнение сокращений при воздействии коротких импульсных толчков и постоянного деполяризующего тока, приводится на рис.25.

Из приведенных данных вытекает, что деполяризующий ток оказывает два эффекта. С одной стороны, вызывает увеличение

амплитуды сокращений, с другой стороны ведет к дополнительному снижению амплитуды последующих сокращений.

Процесс "утомления" выражен тем сильнее, чем больше длительность деполяризующих толчков и максимален при постоянном токе. Увеличение силы деполяризующего тока также приводит к ускорению процесса утомления сокращений в ритмическом ряду. Интересно отметить, что процесс инактивации в контрактурах при увеличении степени деполяризации уменьшается в то время, как утомление в ритмическом ряду на фоне контрактуры увеличивается.

Вероятно, наличие деполяризации во время диастолы тормозит процессы восстановления ионного равновесия, характерного для исходного состояния. Уменьшение длительности диастолы наблюдаемое при повышении частоты стимуляции, приводит к аналогичному явлению.

Эффект последствия фиксирующего тока иллюстрируется данными, приведенными на рис.26. Из рисунка видно, что после снятия постоянного гиперполяризующего тока сокращения, которые первоначально были подавлены, резко возрастают. Причем, абсолютная величина первых сокращений может быть выше установившегося значения фоновых сокращений. Если стимуляция миокарда продолжается, амплитуда сокращений постепенно приходит к исходному уровню. Постоянный деполяризующий ток вызывает, как уже было показано, увеличение силы сокращений выше фоновых, а затем постепенное их падение. Чем больше длительность постоянного удерживаемого тока, тем сильнее происходит утомление сокращений. На снятие деполяризующего тока первоначально наблюдается еще большее снижение амплитуды

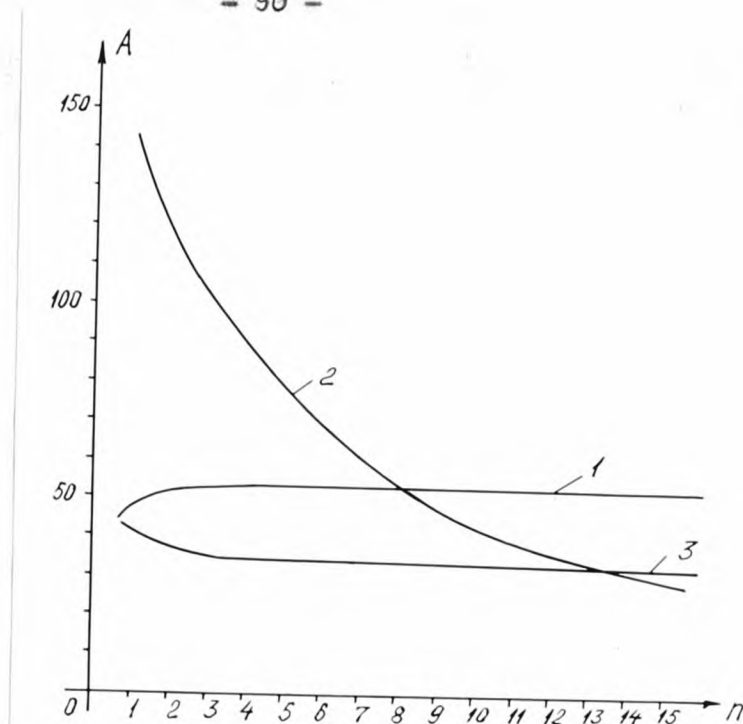


Рис.24. Изменение динамики сокращений при действии постоянного тока

Период раздражений 105 сек, 1 - без тока, 2 - деполяризующий ток, 3 - гиперполяризующий ток; сила тока везде постоянна $\gamma = 0,2$ ма.

сокращений, которые затем очень медленно возвращаются к своему исходному уровню (установившемуся уровню фоновых сокращений). Процессы восстановления в зависимости от длительности и силы деполяризующего тока могут протекать от десятков секунд до нескольких минут. Из рис.26 видно, что чем больше величина деполяризующего тока, тем процесс утомления сокращений и эффекты последствия выражены сильнее. Интересным является то, что влияние деполяризующего тока на процессы последствия выражено значительно (в 2-4 раза) сильнее чем аналогичные влияния гиперполяризующего тока. Процессы подавления и/или активации сокращений после снятия тока носят,

явно, выраженный кумулятивный характер. На рис.27 показан эффект последствия постоянного деполяризующего тока одной и той же силы, но разной длительности.

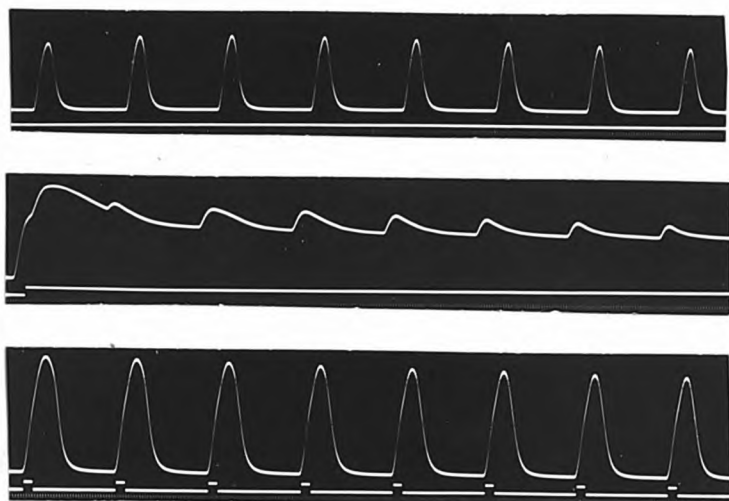


Рис.25. Сравнение влияния постоянного и импульсного деполяризующего тока на сократимость миокарда при ритмической стимуляции.

а) - без тока, б - $\mathcal{Y} = 0,3$ ма, в - $\mathcal{Y} = 0,3$ ма,
 $t_u = 0,4$ сек, на верхних кривых показаны сокращения,
 на нижних - фиксирующий ток).

Суперпозиция эффектов последействия постоянного тока приведена на рис.28. На рисунке пунктиром обозначен момент снятия тока, пропускаемого через мембрану. Видно, что процессы восстановления, после снятия α деполяризующего тока, протекают значительно медленнее по сравнению с процессом восстановления после снятия гиперполяризующего тока.

Исследования с одновременной регистрацией механической и электрической активности и приложении деполяризующих толчков тока показали, что сила сокращений в ритмически работа-

ющем миокарде, аналогично единичным сокращениям регулируется посредством изменения длительности ПД. На рис.29 представлены ПД и сокращения при действии толчков деполяризующего тока. Верхние кривые - ПД, средние - сокращения, нижние - форма деполяризующего тока. Отметка времени - 0,1 сек, калибровка - 100 мв.

При деполяризующих толчках тока малой длительности наблюдается устойчивое, хотя и не очень большое увеличение длительности ПД и силы сокращения. Толчкам тока большей длительности соответствует больший прирост длительности ПД и соответственно этому больший прирост силы сокращений.

Как и следовало ожидать, эффекты последствия фиксирующего тока очень тесно связаны с изменением длительности ПД. (рис.30). В первом ПД деполяризующий толчок тока не прикладывался, а затем в течение нескольких (около 5-10 импульсов) к препарату, наряду с импульсами раздражения, прикладывались короткие импульсы, деполяризующие мембрану. После снятия фиксирующего тока регистрировался тестирующий ПД и сокращение. Как видно из рисунка, после снятия деполяризующих толчков тока длительность ПД наряду с амплитудой сокращений становится значительно меньше фоновых. Причем при большей длительности толчков тока эффект сужения ПД после его снятия выражен сильнее (на рис.30 а и б - соответствуют длительности импульсов 0,4 сек, в - 0,2 сек. На верхних кривых приведены ПД, на средних - сокращения, на нижних - форма деполяризующих толчков тока. Отметка времени 0,1 сек, калибровка амплитуды 100 мв).

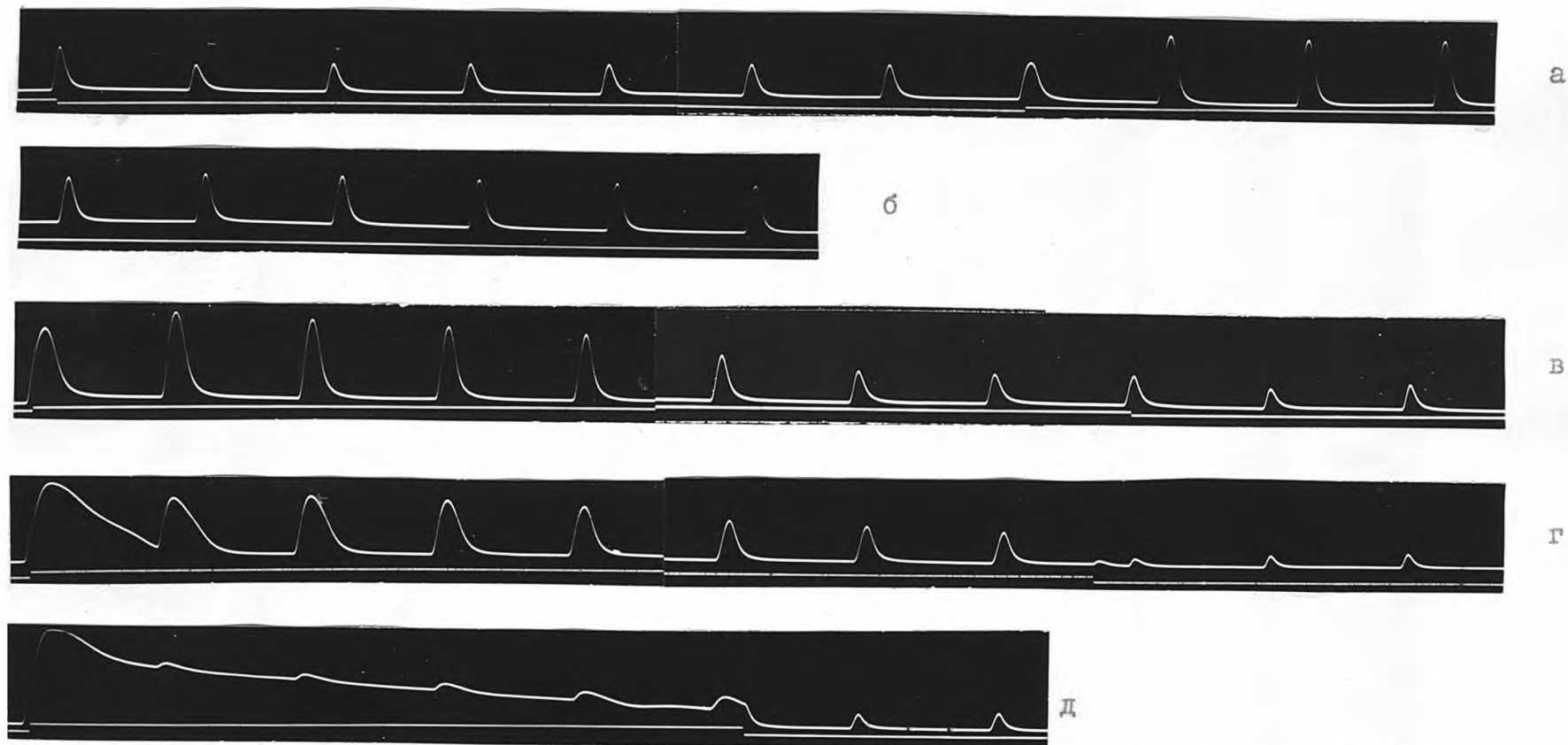


Рис.26. Эффекты последствия постоянного деполяризующего и гиперполяризующего тока во время ритмического раздражения. Период раздражения 5 сек.

а - гиперполяризующий ток (40 сек), 0,2 ма, б- фон, в - деполяризующий ток 50 сек, 0,1 ма, г - деполяризующий ток, 40 сек, 0,2 ма, д - деполяризующий ток 25 сек, 0,35 ма.

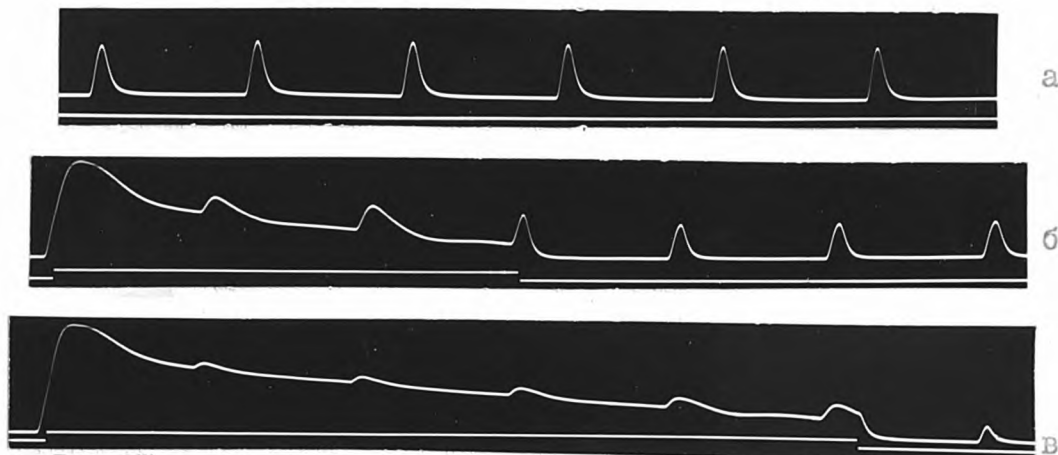


Рис.27.

Влияние длительности приложения постоянного деполяризующего тока на восстановление сократимости.

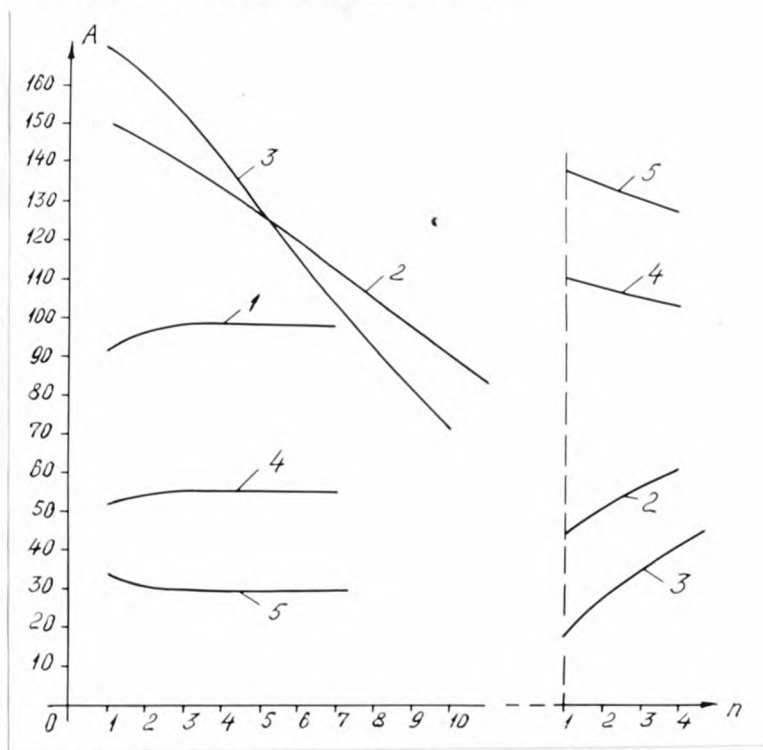


Рис.28. Суперпозиция эффектов последствия постоянного тока (период раздражения $T=5$ сек).

1 - без тока, 2 - деполяризующий ток 0,2 ма, 3 - деполяризующий ток 0,4 ма, 4 - гиперполяризующий ток 0,2 ма, 5 - гиперполяризующий ток 0,4 ма, Пунктиром отмечен момент снятия тока.

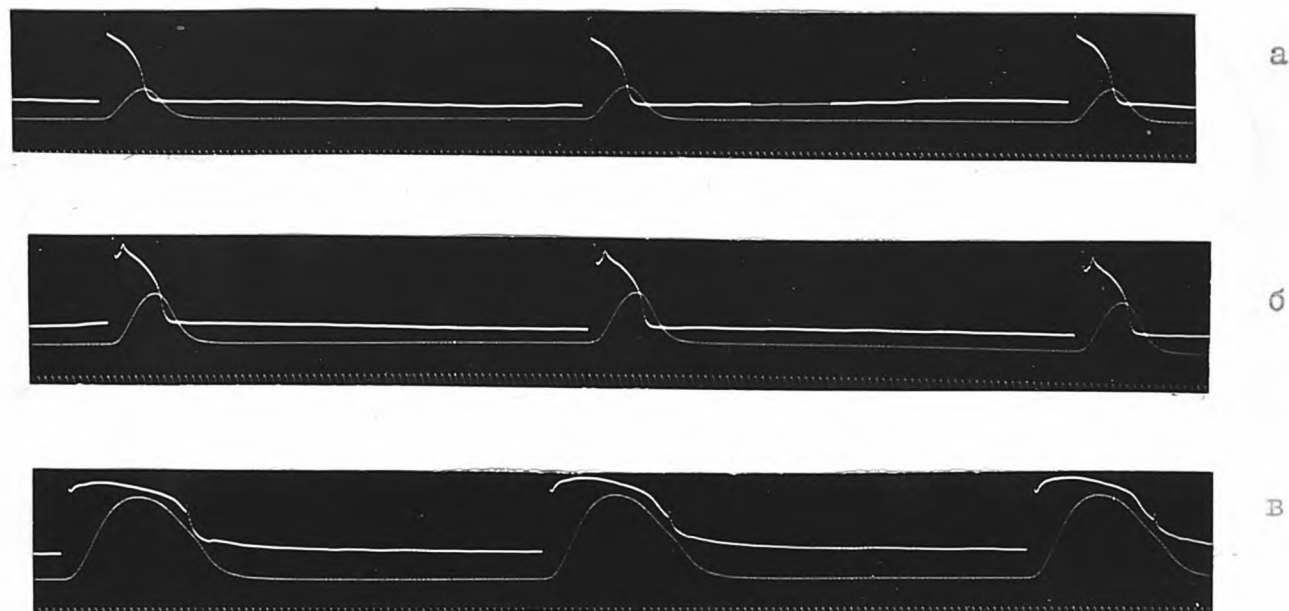


Рис.29. Электрическая и механическая активность миокарда при наличии деполяризующих толчков тока.

(а - без тока, б - $t_u = 0,2$ сек, в - $t_u = 1,7$ сек, сила тока в обоих случаях равна $\gamma_g = 0,2$ ма, остальные пояснения в тексте).

2. Исследование облегчения сокращений при действии деполяризующих и гиперполяризующих толчков тока

Исследование облегчения xxx x в нормальном растворе дает, как и у ряда авторов, зависимость, которая достаточно хорошо описывается формулой

$$\rho(t) = A(1 - e^{-\alpha t})e^{-\beta t}$$

где t - время (расстояние между фоновым и тестирующим импульсами);

α, β - параметры облегчения;

A - константа.

С ростом t облегчение вначале резко растет, а затем медленно, почти экспоненциально уменьшается. Максимум облегчения наблюдается при расстоянии между стимулами 0,8-1 секунды. Облегчение приближается к нулю при $t = 20+30$ сек (т.е. фоновое и тестирующее сокращение становятся равными по амплитуде). Предлагая эту формулу, авторы (Орлов Р.С., Изаков В.Я., Шевелев В.М. - 1971) исходили из того, что облегчение является следствием остаточных явлений предшествующего возбуждения, а параметр $1/\beta$ они связали с постоянной выкачивания натрия из клетки во время диастолы. Параметр α характеризует уменьшение длительности тестирующего ПД.

Основная трудность получения количественных оценок в изменении облегчения при воздействии тех или иных режимов

фиксации тока связана с тем, что длительность и амплитуда сокращений, как уже было показано, сами значительно зависят от величины и длительности фиксирующего тока. Применение типовой формулы для оценки величины облегчения

$\rho = \frac{A_{II}}{A_I} - 1$ становится неприемлемым, так как амплитуда (A_I) значительно изменяется при воздействии тока. Пересчет облегчения вторых импульсов по отношению к первым импульсам контрольной партии также затруднителен, поскольку амплитуда первого импульса от опыта к опыту также может значительно варьировать.

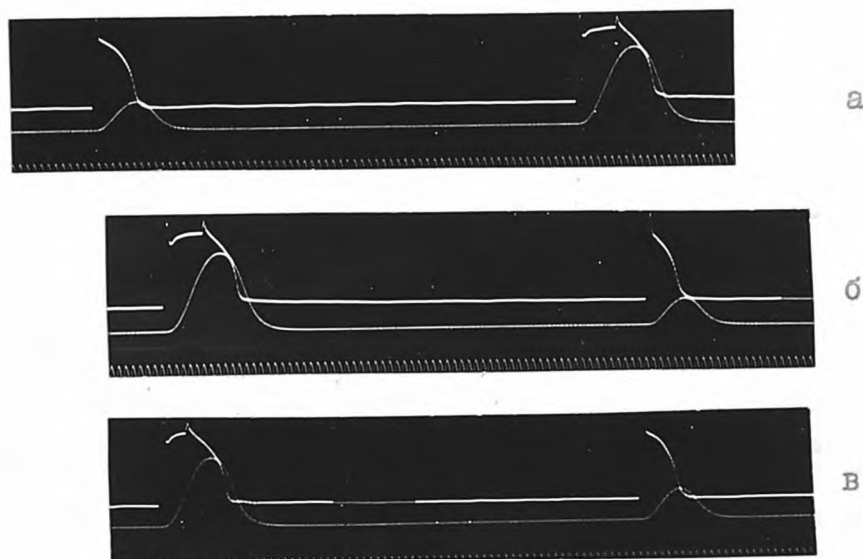


Рис.30. Эффекты последствия деполяризующего тока (пояснения в тексте).

Для качественной оценки изменения облегчения при действии только в первом импульсе, или в первом импульсе и во время диастолы можно поступить следующим образом. При вариациях амплитуды фонового (первого) сокращения при подсчете

облегчения проводилось нормирование полученных данных согласно формуле

$$P_i = \frac{A_{2i} - (A_{1i} - A_n)}{A_n} - 1 = \frac{A_{2i} - A_{1i}}{A_n}$$

где P_i - облегчение при некотором расстоянии между фоновым и тестирующим импульсом;

A_{2i} - амплитуда тестирующего сокращения;

A_{1i} - амплитуда фонового сокращения;

A_n - амплитуда фонового сокращения, относительно которого ведется нормирование. Обычно это амплитуда первого импульса в первом (при $T = 10$ сек) испытании.

Поскольку применение фиксирующего тока изменит абсолютное значение A_n , то кривые облегчения для разных воздействий как бы будут заданы в другом масштабе и сравнение кривых будет неудобным. Для удобства сравнения кривых облегчения при том или ином воздействии мы подбирали такие масштабы, чтобы облегчение при некотором значении расстояния между тестирующим и фоновым импульсами ($T=1,5$ сек) принимало одно и то же значение для всех кривых.

Допустим в фоновой двойке импульсов при $T=1,5$ сек величина облегчения равна некоторому значению

$$P_k = \frac{A_{2\phi}}{A_{1\phi}} = 1$$

Для того, чтобы в тестирующей двойке величина облегчения при $T=1,5$ сек (назовем эту точку нормируемой) равнялась этому же значению,

$$P_k = \frac{A_{2H}}{A_{1H}} - 1$$

необходимо вместо значения $A_{1н}$ взять некоторое новое расчетное значение амплитуды сокращения $A'_{1н}$, которое было бы в случае отсутствия фиксирующего тока. Его найдем из соотношения

$$A'_{1н} = \frac{A_{2н} \cdot A_{1ф}}{A_{2ф}}$$

где $A_{2ф}$ и $A_{1ф}$ соответственно амплитуды второго и первого сокращений в контрольной точке облегчения без воздействия тока;

$A_{1н}$ и $A_{2н}$ амплитуды фоновых и тестирующего сокращения в контрольной точке двоек при наличии фиксирующего тока.

В данном случае облегчение при действии различных видов фиксации тока на мембране можно найти по формуле:

$$\rho_i = \frac{A_{2i} - (A_{1i} - A_{1н})}{A'_{1н}} - 1$$

Если облегчение при действии фиксирующего тока не изменилось, то кривая облегчения при действии тока должна совпасть с кривой облегчения в случае отсутствия токового воздействия. Если придерживаться положения, что облегчение связано с остаточными явлениями от предшествующего возбуждения, то можно предположить, что воздействие тока во время возбуждения должно значимо сказаться на ходе облегчения.

Исследования в различных режимах фиксации тока показали, что такие сдвиги имеются. На рис.31а представлены нор-

мированные кривые облегчения для случая фоновых двоек (фиксирующий ток отсутствует) и для двоек, когда в каждом ПД имеется короткий толчок тока через мембрану. Здесь же для сравнения проводится кривая облегчения, когда толчок деполяризующего тока дается только в фоновом сокращении. Длительность деполяризующих толчков тока 0,4 сек, гиперполяризующих - 0,2 сек. Сила тока во всех случаях одинакова. Длительность гиперполяризующих толчков тока не могла быть увеличена, так как это приводило к возникновению "паразитных" катодоразмыкательных контрактур.

Обращает внимание принципиальная разница хода кривых в случае, и если толчки деполяризующего тока даются только при первом возбуждении, и когда толчки тока даются как в фоновом, так и в тестирующем сокращении. Если толчки тока через мембрану даются в первом ПД, то кривая облегчения идет ниже фоновой. Это свидетельствует о том, что при действии деполяризующего тока произошло расходование кальция, из которого внутреннего резерва клетки, который в приходе следующего импульса раздражения не восстановился. Поэтому во время второго возбуждения, когда деполяризующего толчка тока нет, амплитуда сокращения становится меньше фоновой, т.е. той, которая была в контрольной двойке импульсов. Изменение длительности тестирующего ПД при подаче деполяризующего толчка тока в первом импульсе представлено на рис.32. Видно, что изменение тестирующего сокращения связано с изменением длительности ПД.

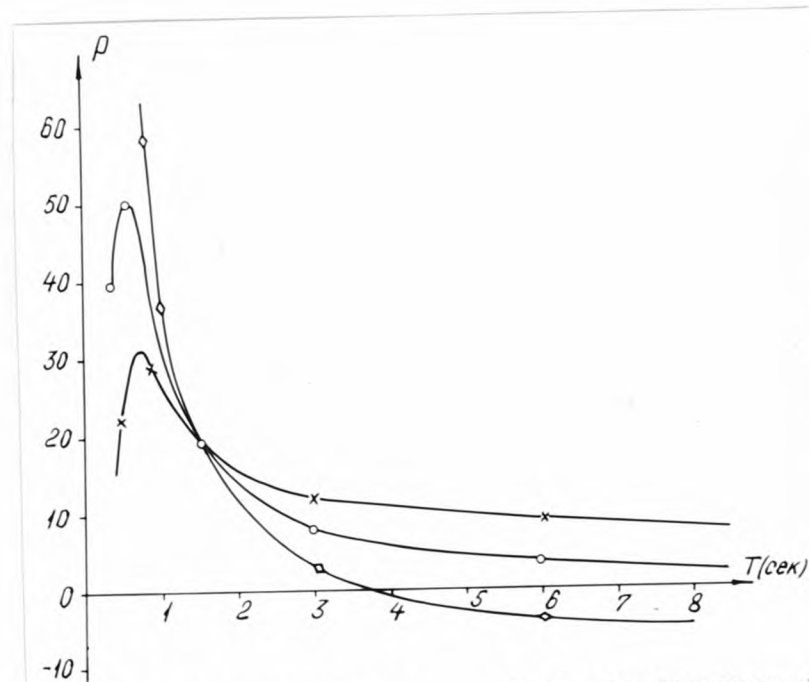
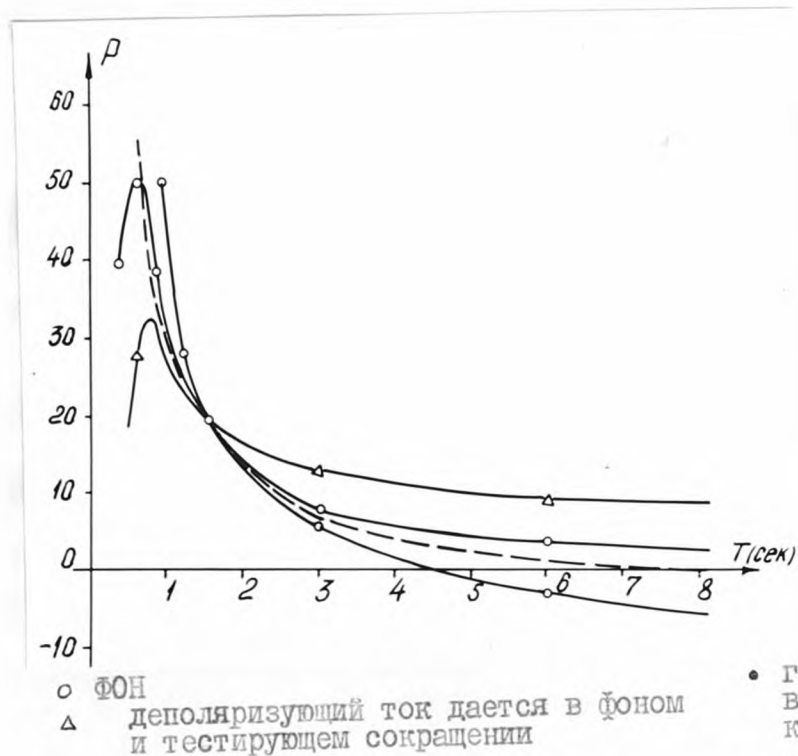


Рис.31. Кривые облегчений при различных режимах фиксации тока (сила тока везде 0,8 ма).

^{пер}Гиполяризующий ток обладает противоположным действием. Если толчки гиперполяризующего тока прикладываются в каждом сокращении, кривая облегчения смещается вниз. (рис. 31А). Если гиперполяризующий толчок дается только в первом ПД - вверх (на рисунке не показано). (На рисунке 31А кривые облегчения слева от нормируемой точки смещения при действии деполяризующих и гиперполяризующих толчков тока в противоположном направлении. Это связано с наложением друг на друга фонового и тестирующего ответов).

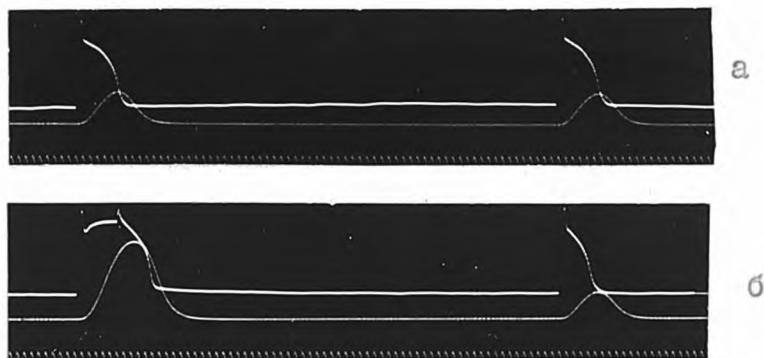


Рис.32. Изменение длительности тестирующего ПД при пропускании деполяризующего толчка тока в (первом) импульсе ПД.

(а - фон, $T=7$ сек, б - $I_d = 0,3$ ма $t_u = 0,4$ сек, отметка времени 0,1 сек, калибровка ПД - 100 мВ).

На рис.31Б приведены кривые облегчения сокращений, когда деполяризующий и гиперполяризующий толчки тока даются во время первого ПД и во время диастолы. Видно, что ток через мембрану во время диастолы тоже оказывает свое влияние на ход кривой облегчения. Кривая облегчения смещена несколько вверх по отношению к случаю, когда ток пропусклся

только во время первого ПД.

В ы в о д ы

1. Деполяризующие и гиперполяризующие толчки тока, пропускаемые через мембрану во время ритмической стимуляции, оказывают значительное влияние на хроноинотропные явления.

2. Деполяризующий ток оказывает двойное влияние на сократимость миокарда:

- увеличивает силу сокращений в момент его приложения;
- увеличивает скорость падения сокращений в ритмическом ряду.

Оба эффекта увеличиваются при возрастании длительности и/или интенсивности деполяризующего тока. Гиперполяризующий ток подавляет сократимость в ритмическом ряду.

3. Деполяризация мембраны во время диастолы увеличивает скорость падения сокращений в ритмическом ряду.

4. По прекращению действия деполяризующего тока на фоне ритмической стимуляции наблюдается падение сократимости миокарда, которая медленно восстанавливается. По прекращению действия гиперполяризующего тока амплитуда сокращений возрастает, а затем возвращается к исходному уровню.

5. Последствие деполяризующего тока наряду с подавлением сократимости проявляется в уменьшении длительности потенциалов действия. Влияние деполяризующего и гиперполяризующего тока на процессы последствия выражено уже после однократного воздействия тока.

ГЛАВА У

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ И НАТРИЯ В ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКОМ СОПРЯЖЕНИИ МИОКАРДА

І. Влияние концентрации ионов кальция в растворе на сократительную активность при фиксации тока на мембране

Стимулирующее действие внеклеточного кальция на сокращения миокарда было установлено *Ringer* (1883) и впоследствии неоднократно подтверждено целым рядом исследователей: *Howell*, 1901; *Mines* 1913; *Loewi* 1917. Зольникова Н.К. — 1938 и позднее *Reiter*, 1968; *Naulez*, 1961 и др. (см. Сальманович В.А. — 1966). Уменьшение содержания кальция в растворе снижает амплитуду сокращений, увеличивает длительность фазы плато ПД и повышает возбудимость миокарда. Обычно считается, что изменение содержания ионов кальция в среде практически не влияет на ПП и амплитуду ПД, однако длительность ПД значительно изменяется. Однако, *Niedergercke* и *Orkand* (1966) показали значительные вариации овершута при изменениях внеклеточной концентрации кальция (Онищенко Н.А., 1967). Увеличение кальция в среде приводит к укорочению ПД, главным образом, за счет уменьшения длительности фазы плато. Однако, амплитуда сокращений при этом значительно возрастает. Подобные явления характерны также для гладкой и скелетной мускулатуры (*Creese*, *Roberts*, 1955; *Bozler*, 1960; *Briggs*, 1961 и др.). Было показано, что присутствие кальция в растворе

усиливает инотропное действие различных агентов, в том числе гликозидов. Усиление кальцием ацетилхолиновой контрактуры наблюдал на сердце лягушки Емченко А. (1941), контрактуры от гипертонического раствора сазарозы на сердце жабы - *Nayler* (1961a), контрактуры, вызванной избытком калия, на сердце лягушки - *Niedergerke* (1956a) и на предсердиях кроликов - *Walker* и *Weatheral* (1963), а контрактуры от дефицита калия на предсердиях крысы - *Paradise* (1963). Опытами с мечеными атомами (Ca^{45}) было показано, что кальций внешней среды входит внутрь клетки и участвует в генерации сокращений. *Holland* и *Sekul* (1959) установили, что оубаин вызывает увеличение поглощения Ca^{45} миокардом, причем наблюдается хорошая корреляция между накоплением кальция и увеличением напряжения предсердий. Такой же эффект наблюдали *Thomas*, *Jolley*, *Grechman* (1958) в условиях контрактуры сердечной мышцы, вызванной оубаином. Из этих данных можно предположить, что обмен Ca^{45} внутри клетки происходит во время возбуждения клетки, когда внутри ее образуются свободные ионы кальция, вызывающие сокращение. Учитывая, что гликозиды усиливают поглощение кальция миокардом, можно полагать, что повышение сократительной способности сердца под влиянием гликозидов сопряжено с накоплением кальция в миокарде, за счет уменьшения скорости его движения из клетки. Однако, как показали более поздние исследования, *Winegrad* (1961 а,б) и *Winegrad*, *Shanes* (1962), содержание общего кальция в миокарде при длительном раздражении не меняется. Это же подтверждается опытами *Niedergerke* (1963), который показал, что активность миокарда ускоряет скорость

движения кальция в клетку в 10-20 раз по сравнению с движением его в состоянии покоя, причем одновременно с ускорением поступления кальция в миокард в период его активности наблюдается и ускорение его выхода.

Beelez, Reiter (1970) показали, что при деполяризации - 60 мВ (это пороговый потенциал для натриевого тока) наблюдалось очень малое сокращение, дальнейшая деполяризация не изменяет силы сокращений вплоть до потенциала - 35 мВ. При дальнейшем увеличении катодического воздействия отмечается значительный прирост амплитуды сокращений. Максимальное нарастание силы сокращений было при мембранном потенциале от -30 до +10 мВ. При мембранном потенциале +55 мВ и выше сокращение вновь падало. Следует отметить, что связь максимума контрактильного ответа с потенциалом на мембране

S -образна и подобна той, которая была показана нами ранее (гл. III) для связи "длительность гиперполяризующих и деполяризующих толчков тока - амплитуда сокращений" или для связи "длительность ПД - амплитуда сокращений". Увеличение внеклеточной концентрации кальция сдвигает кривую в область более отрицательных потенциалов так, что кальциевый ток, а следовательно, и сокращение, возникает при более отрицательных потенциалах на мембране.

Из приведенных данных следует, что ионы кальция, наряду с целым рядом других факторов, оказывают решающее влияние на параметры мышечных сокращений.

Целью настоящего раздела - изложить результаты исследования механической активности миокарда в условиях фиксации

тока на мембране при вариациях концентрации ионов кальция в растворе. Изучалось влияние ионов кальция на связь амплитуды сокращений с параметрами фиксирующего тока, изменение переходных процессов сокращений в гиперкальциевом растворе на фоне постоянного тока и импульсных толчков, а также эффекты последствия. Кроме того, было просмотрено изменение формы сокращений в гиперкальциевом растворе, а также феномен гиперполяризующей контактуры^Р. Результаты данной главы основаны на 26 опытах.

В наших опытах увеличение ионов кальция в растворе (до 2 мМ) приводило к увеличению силы сокращений и более сильному изменению этих сокращений при действии деполяризующих и гиперполяризующих толчков тока. Дальнейшее увеличение концентрации кальция (5 мМ и более) приводит к еще большему увеличению амплитуды сокращений, однако однократные деполяризующие толчки тока той же силы становятся малоэффективными. Гиперполяризующие толчки тока могут подавлять сокращения до тех же величин, что и в нормальном растворе.

На рис.33 приведена зависимость амплитуды сокращений от длительности толчков гиперполяризующего и деполяризующего тока в нормальном растворе и в растворе, где концентрация ионов кальция увеличена вдвое (2 мМ). Видно, что эта связь и в том и другом случае S-образна, причем для гиперкальциевого раствора абсолютная амплитуда сокращений и производная $\frac{dA_{max}}{dt_{имп}}$ (где A — амплитуда сокращения, а $t_{имп}$ — длительность толчков тока) для линейного участка значительно больше, чем в нормальном растворе.

Увеличение ионов кальция в растворе действует на связь длительность толчков тока — максимальная сила сокращений подобно тому, как ее изменяет увеличение силы деполяризующего и гиперполяризующего тока, с той лишь разницей, что указанные кривые при вариациях силы тока пересекают ось ординат в одной точке. В гиперкальциевом растворе точка пересечения кривой с осью ординат смещена вверх, ибо кальций активирует сокращения и в отсутствии толчков тока.

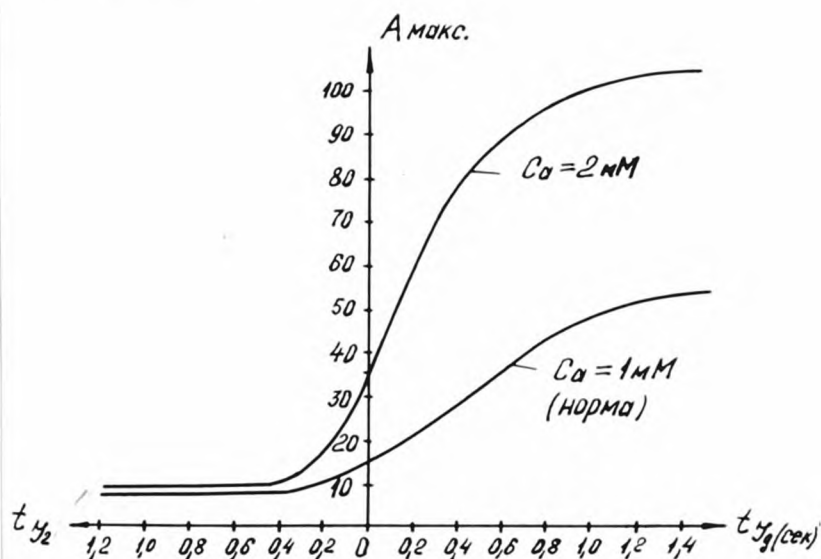


Рис.33. Зависимость амплитуды сокращений в нормальном и гиперкальциевом растворе от длительности толчков тока.

Сила тока везде 2 ма; справа от оси ординат — деполяризующий ток; слева — гиперполяризующий; по оси ординат — амплитуда сокращений; по оси абсцисс — длительность толчков тока в сек.

На рис.34 приведена форма сокращений ритмически работающего миокарда при вариациях силы постоянного деполяризующего

щего и гиперполяризующего тока в нормальном и гиперкальциевом растворах. Видно, что амплитуда сокращений в гиперкальциевом растворе значительно выше сокращений в нормальном растворе. Как и в нормальном растворе, в гиперкальциевом растворе деполяризующий ток увеличивает амплитуду сокращений, а гиперполяризующий подавляет ее. Эти изменения тем заметнее, чем больше величина фиксирующего тока. Однако, из рисунка следует, что постепенное увеличение силы деполяризующего тока в нормальном растворе приводит сначала к увеличению только амплитуды быстрых контрактильных ответов на фоне постоянного тока, а затем и к появлению ответа типа контактуры^Р, на фоне которой просматриваются сокращения, возникающие в ответ на раздражения. В гиперкальциевом растворе ток той же силы приводит к еще большему увеличению амплитуды сокращений; в то время как контрактура практически не наблюдается. Контрактура от гиперполяризующего тока в гиперкальциевом растворе также значительно ниже, чем в нормальном растворе. Из рис.34 также следует, что влияние деполяризующего тока на одиночные сокращения в гиперкальциевом растворе значительно ниже, чем в растворе с нормальным содержанием кальция. В противоположность этому эффективность гиперполяризующего тока на амплитуду ритмических сокращений при увеличении концентрации ионов кальция в растворе значительно повышается. Из рис.34 видно, что падение амплитуды сокращений в ритмическом ряду при постоянном деполяризующем токе значительно меньше, если концентрация ионов кальция в растворе повышена.

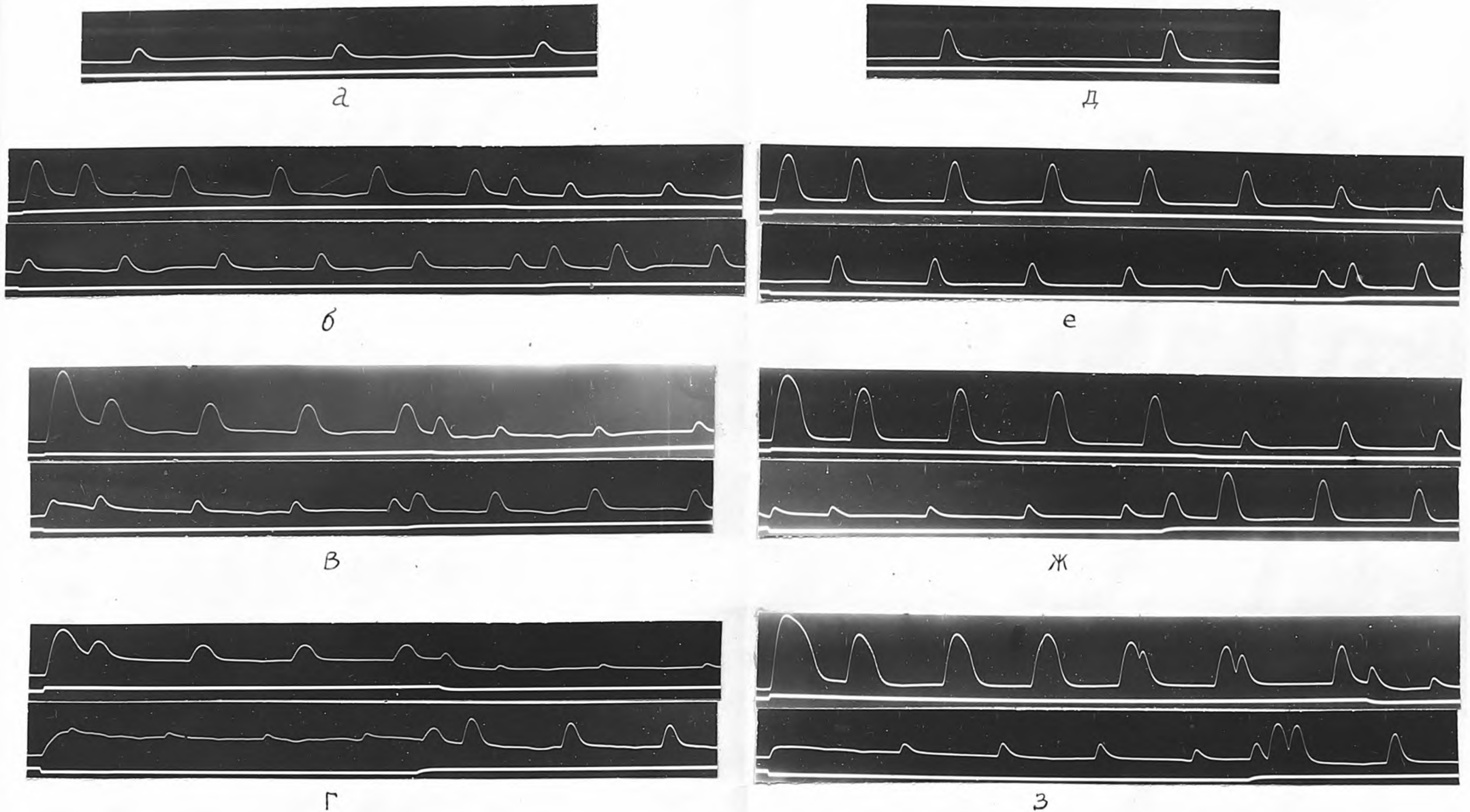


Рис 34. Сокращения миокарда при периодической стимуляции в нормальном и гиперкальциевом растворах на фоне постоянного деполяризующего и гиперполяризующего токов.

Верхние кривые - сокращения; нижние - отметка тока; период раздражения - 5 сек; а, д - 10 сек.
 а, б, в, г - соответственно для $I = 0$, $I_q = I_z = 0,2$ ма; $I_q = I_z = 0,4$ ма; $I_q = I_z = 2$ ма в нормальном растворе.
 д, е, ж, з - соответственно для $I = 0$, $I_q = I_z = 0,2$ ма; $I_q = I_z = 0,4$ ма; $I_q = I_z = 2$ ма в гиперкальциевом растворе 5 мм; в "г" усиление уменьшено в 2 раза.

Представляет интерес также изменение последствия постоянного тока в гиперкальциевом растворе. На рис.34ж видно, что в ответ на снятие гиперполяризующего тока амплитуда сокращений резко увеличивается, а затем стремится к исходной для данного раствора величине. Этот эффект в нормальном растворе (34в) выражен значительно слабее.

Накопление кальция внутри клетки при гиперполяризующем токе происходит, повидимому, во время диастолы. Данный вывод аргументируется данными, приведенными на рис.35. Здесь показан эффект постонодического воздействия сначала для редкой частоты стимуляции (б), затем для более высокой частоты стимуляции и для случая, когда раздражение во время гиперполяризующего тока не подается (г). Из рисунка видно, что активирующий эффект последствия самый большой, когда раздражение миокарда во время фиксации тока отсутствует, и минимальный (даже наблюдается некоторая инактивация сокращений) в случае, когда частота стимуляции достаточно высока.

На рис.36 представлена суперпозиция переходных характеристик сокращений в нормальном и гиперкальциевом растворах при действии деполяризующих толчков тока различной длительности. Здесь, как и в случае постоянного тока, деполяризующие толчки приводят к увеличению амплитуды сокращений. Причем в гиперкальциевом растворе относительный и абсолютный прирост амплитуды сокращений несколько ниже, чем в нормальном растворе. Большей длительности толчков тока соответствует и большая инактивация сокращений.

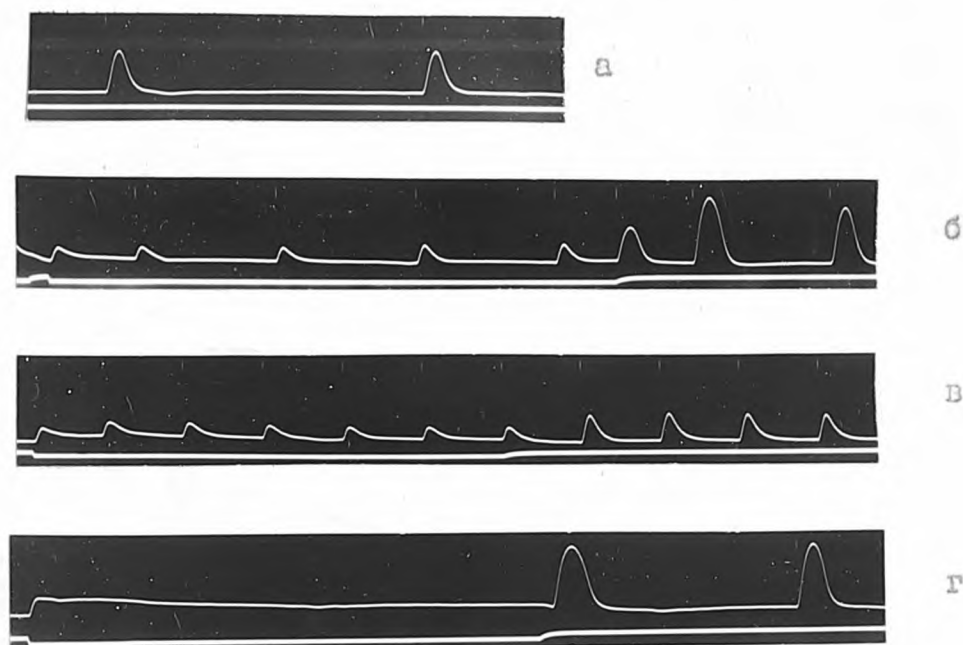


Рис.35. Эффект последствия гиперполяризующего тока в гиперкальциевом растворе ($Ca_0 = 5$ мм) в зависимости от частоты стимуляции.

Сила тока для всех случаев постоянна.

а — без тока, б-г — постоянный гиперполяризующий ток, б — период раздражения 5 сек; в- 2,5 сек; г — во время гиперполяризации раздражение отсутствует, а затем период раздражения 5 сек.

В главе III показано, что гиперполяризующий ток достаточно большой величины, прикладываемый к препарату, вызывает контрактурное сокращение, ход которого в значительной степени отличается от деполяризующей контрактуры или контрактуры, вызванной хлористым кальцием или фармакологическими агентами. Характерным является то, что гиперполяризую-

щая контрактура не инактивируется со временем, как это бывает обычно при других воздействиях, а постепенно увеличивается. На снятие тока возникает быстрая анодразмыкательная контрактура еще большей величины, которая затем крайне

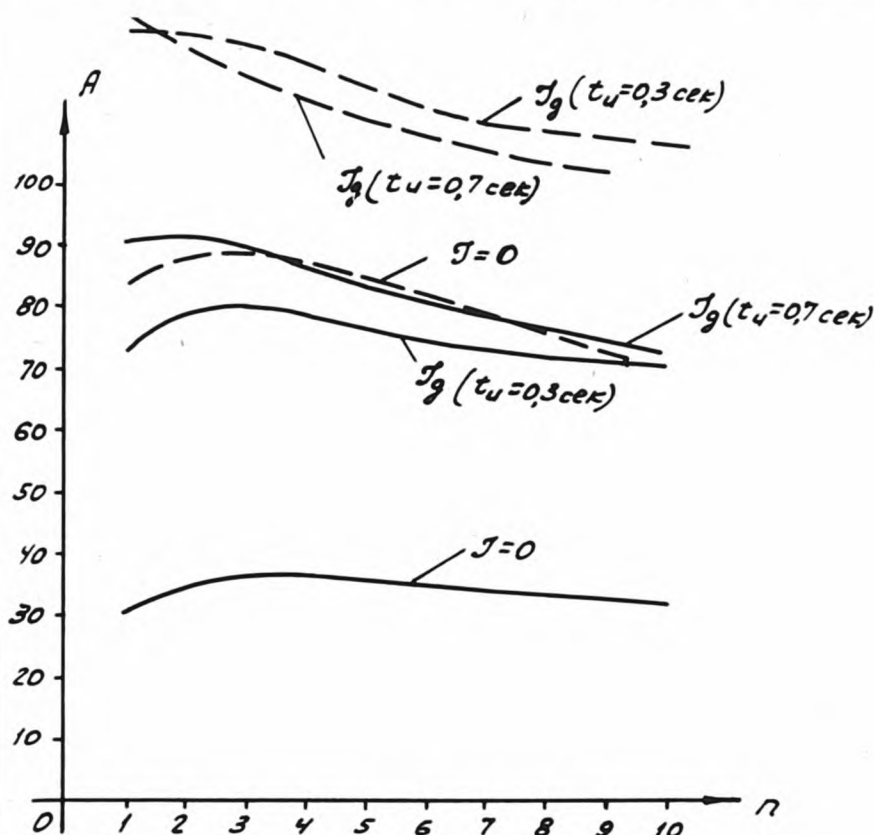


Рис. 36. Переходные характеристики сокращений при действии деполяризующих толчков тока различной длительности в нормальном и гиперкальциевом растворах.

Сплошная линия — для нормального раствора,
пунктирная — для гиперкальциевого ($Ca^{++}_0 = 2$ мм).

Сила тока — 1 ма, $T = 5$ сек.

По оси абсцисс — номер сокращения;

По оси ординат — амплитуда.

медленно расслабляется (рис.15). Следует отметить, что форма гиперполяризующей контрактуры в значительной степени зависит от предыстории сократительной деятельности (времени покоя, частоты и длительности предшествующей стимуляции, предшествующего гиперполяризующего или деполяризующего воздействия). На рис.37 представлены две кривые контрактильного ответа, вызванного гиперполяризующим током. В случае "а" предварительно, за две минуты до тестирующего воздействия, к препарату прикладывался гиперполяризующий ток одной и той же силы и длительности. В случае "б" к препарату за две минуты до тестирующего воздействия прикладывался деполяризующий ток той же длительности и величины. Видно, что гиперполяризующая контрактура после деполяризующего тока имеет значительно большую величину.

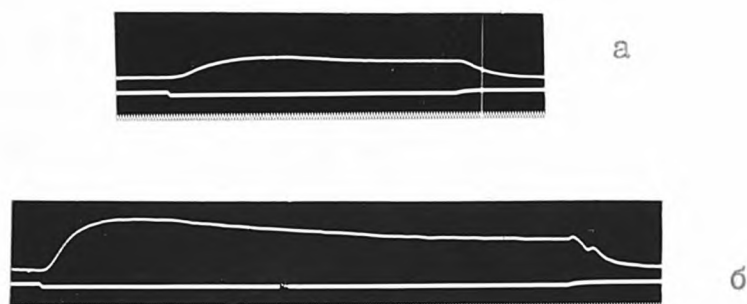


Рис.37. Контрактура под действием гиперполяризующего тока.

Сила тока в обоих случаях равна 0,6 ма.

- а - предварительно был дан гиперполяризующий толчок тока той же величины и длительности;
- б - предварительно был дан деполяризующий толчок тока той же силы и длительности.

В гиперкальциевом растворе предистория препарата сказывается в еще большей степени на эффекты гиперполяризующего тока. Как мы уже отмечали, увеличенная концентрация ионов кадмия в омывающем растворе затрудняет развитие контрактурного ответа, вызванного гиперполяризующим или деполяризующим токами. В связи с этим сила тока была несколько увеличена по отношению к нормальному раствору.

На рис.38 представлены гиперполяризующие контактуры в гиперкальциевом ($Ca^{++}_o = 5$ mM) растворе. В случае "б" гиперполяризующее воздействие нанесено после помещения препарата в гиперкальциевый раствор и двухминутного вбавывания с периодом раздражения 10 сек. Видно, что форма анодразмыкательной контактуры не отличается от таковой в нормальном растворе. Если затем к препарату приложить деполяризующее воздействие (рис.38в), эффект гиперполяризующего тока, в особенности анодразмыкательная контактура, при последующих воздействиях значительно изменится (показано на рис.38г) — гиперполяризующая контактура становится больше, чем в первом случае, Снятие гиперполяризующего тока сопровождается развитием обычного анодразмыкательного сокращения. Данный эффект гиперполяризующего тока является характерным для гиперкальциевых растворов.

Дальнейшие исследования показали, что анодразмыкательное возбуждение в гиперкальциевом растворе возникает только при достаточно больших токах. Величина анодразмыкательного сокращения тем выше, чем больше величина гиперполяризующего тока. На рис.39 показана гиперполяризующая контактура в

растворе с концентрацией кальция 5 мМ. Видно, что при токе $\bar{I}$ 0,8 ма анодразмыкательная контрактура не развивается, хотя имеется ответ на раздражение. При токе гиперполяризации равном 2 ма имеется как анодразмыкательное возбуждение, которое развивается с некоторой задержкой, так и возбуждение в ответ на очередное раздражение.

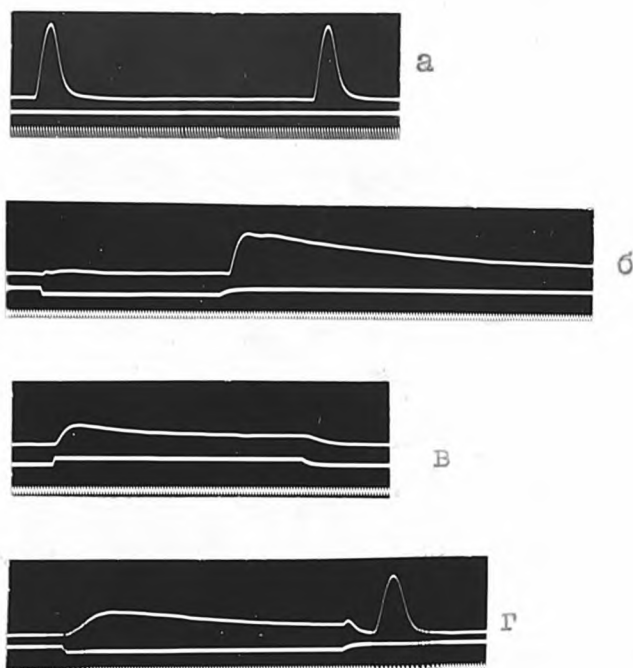


Рис.38. Контрактивные ответы на гиперполяризующий ток в гиперкальциевом растворе.

Сила тока везде одинакова; концентрация $Ca_0 = 5$ мМ.

а — фон, б — гиперполяризующая и анодразмыкательная контрактуры до нанесения предварительных токовых воздействий; в — деполяризующая контрактура (усиление 1:10); г — гиперполяризующая контрактура после воздействия тока.

Исследования показали, что амплитуда анодразмыкательного сокращения значительно варьирует от силы тока и незна-

чительно изменяется в зависимости от времени его действия (рис.40). Интересным представляется также зависимость анод-размыкательной контрактуры от времени задержки по отношению к фоновому раздражению. На рис.41 приводится изменение анод-размыкательной контрактуры от времени задержки фиксирующего тока по отношению к фоновым стимулам. Видно, что чем больше эта задержка, тем амплитуда и длительность анодразмыкательной контрактуры, как впрочем и амплитуда первого фонового сокращения, выше.

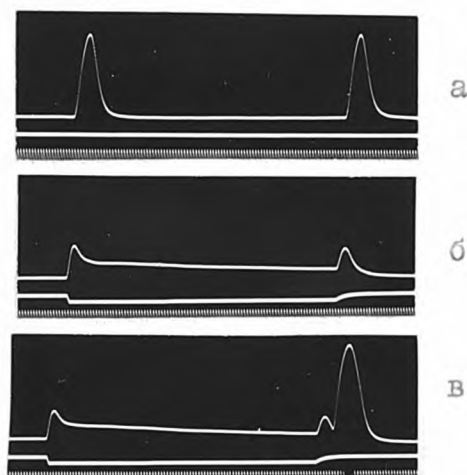


Рис.39. Зависимость анодразмыкательной контрактуры в гиперкальциевом растворе от силы тока

а - фон, б - $I_2 = 0,8$ ма, в - $I_2 = 2$ ма.

2. Исследование влияния ионов натрия на сократимость миокарда при действии деполяризующего и гиперполяризующего тока

Необходимость ионов натрия для сокращений миокарда была установлена *Lingle* (1902). Помещение полоски желудочка черепахи в изотонический раствор сахарозы приводило к

исчезновению сокращений. Добавление нормальных количеств калия и кальция не восстанавливало сократимость миокарда. Сокращения возникали только после добавления к раствору какой-либо соли натрия. Этот факт заставил Лёба приписать ионам натрия решающее значение в генерации сокращений. С другой стороны еще *Howell* (1901) установил, что ионы натрия вызывают сокращения лишь в случае, если в растворе имеется достаточное количество ионов кальция. Если полностью осадить кальций оксалатом, сокращения в присутствии одних только ионов натрия не возникают. Результаты этих работ сохраняют свое значение и по настоящее время, получив развитие в теории сопряженного действия ионов натрия и кальция на мышечное сокращение.

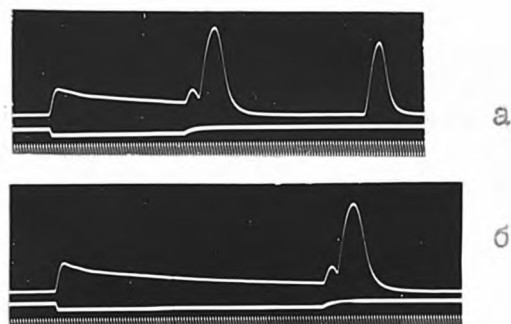


Рис. 40. Зависимость анодразмкательной контрактуры от времени предшествующей гиперполяризации ($Ca = 5$ мМ).

а - $t_u = 5$ сек, б - $t_u = 10$ сек.

Работами последних лет установлено, что повышение концентрации натрия мало сказывается на потенциале покоя, но

увеличивает амплитуду потенциала действия (*Brady, Woodbury* - 1957, *Изаков В.Я.*, 1968). Увеличение концентрации натрия в растворе сопровождается удлинением потенциала действия и замедлением реполяризации. Механический ответ сердечной мышцы в гипертонических средах, содержащих избыток натрия, вообще может не развиваться, хотя электрическая активность сохраняется. В гипонатриевом растворе наблюдается обратная картина (*Изаков В.Я.*, 1968).

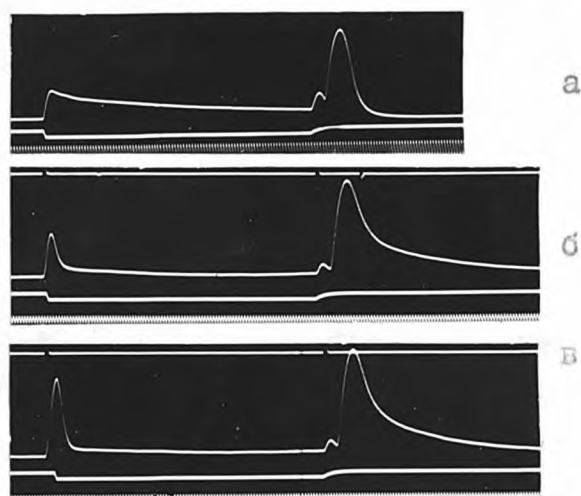


Рис. 41. Зависимость анодразмыкательной контрактуры от привязки фиксирующего тока к фоновому раздражению.

а - задержка составляет 0,1 сек; б - задержка - 0,2 сек; в - задержка 0,4 сек.

Уменьшение содержания натрия во внеклеточном пространстве усиливает сократительную способность сердца и увеличивает амплитуду сокращений. Это наблюдали *Daly и Clark* (1921), *Niedergerke, Lüttgan* (1957), *Mayle*

(1961), Шевелев В.М. (1971). Снижение концентрации натрия не меняет потенциал покоя, а амплитуда потенциала действия при этом по данным большинства авторов уменьшается.

Однако в некоторых экспериментах снижение амплитуды потенциала действия было меньше величины, предсказываемой теорией Ходжкина или совсем не наступало. Длительность потенциала действия при уменьшении натрия укорачивается в основном за счет увеличения крутизны ПД в фазе плато (Изаков В.Я., 1968). *Niedergerke* и *Orkand* (1966) объяснили это тем, что при снижении мембранного градиента для натрия облегчается поступление в клетку ионов кальция, которые ускоряют обратную диффузию ионов калия из клетки и одновременно увеличивают амплитуду сокращения. *Wilbrandt* и *Koller* (1948), а затем *Niedergerke*, *Lüttgen* (1958) обнаружили $Ca-Na$ конкуренцию на уровне мембраны. Суммируя приведенные данные, можно заключить, что ионы натрия наряду с ионами кальция имеют решающее значение в осуществлении электромеханической активности миокарда и регуляции сокращений, природа которых изучена пока слабо.

До последнего времени электрическая активность миокарда объяснялась с позиций теории Ходжкина-Хаксли. Применение методы фиксации напряжения (*Beeler*, *Reüter*, 1970 а,б; *Deck*, *Trautwein*, 1965; *Dudel*, *Rüdel* и др., 1970) выявило участие ионов кальция в генезе потенциала и позволило выдвинуть гипотезу о существовании в мембране клеток миокарда быстрых натриевых и медленных натрий-кальциевых каналов, ионные токи через которые обуславливают фазу плато потенциала действия. Впоследствии эта гипотеза была раз-

вита целым рядом авторов и использована для объяснения хроноинотропных явлений (Орлов Р.С., Изаков В.Я., Шевелев В.М., 1971). Авторы полагали, что регулирование сократимости миокарда при разных частотах стимуляции происходит за счет накопления ионов кальция и натрия, которые входят внутрь клетки во время возбуждения и не успевают рассасываться во время диастолы.

Ввиду сказанного, представляет определенный интерес изучение влияния ионов натрия на параметры сократительной активности миокарда в условиях фиксации тока и различных ритмических воздействий. Описанию этих экспериментов посвящен настоящий раздел. Данные основаны на результатах 53-х экспериментов на 24-х препаратах.

Lüttgan, *Niedergerke* (1958) показали, что уменьшение концентрации натрия в наружном растворе на 50% сдвигает кривую мышечное сокращение — мембранный потенциал на 30 мВ так, что порог для контрактуры становится равным 85 мВ. Они же установили, что удаление всего натрия из раствора приводит к возникновению контрактуры, хотя потенциал покоя при этом практически не изменяется. Ранее нами было показано, что для миокарда наблюдается S-образная связь между длительностью потенциала действия и амплитудой вызванного сокращения, а также между максимумом сокращения и длительностью толчков деполяризующего и гиперполяризующего тока. Было рассмотрено своеобразное смещение кривой длительность толчка—амплитуда сокращения в гиперкальциевом растворе. Любопытно отметить своеобразное изменение этой зависимости в гипонатриевом растворе.

На рис. 42 представлена зависимость амплитуды сокращений от длительности толчков тока в нормальном растворе и в том случае, когда концентрация натрия была уменьшена в два раза (Na 50 мМ). Видно, что снижение концентрации натрия сместило эту зависимость в сторону увеличения амплитуды сокращений и в сторону гиперполяризующих токов. Производная dA/dt_v в отличие от гиперкальциевых растворов, остается практически без изменений. Это указывает на то, что в основе регулирования сокращений при вариациях количества ионов натрия и кальция в растворе лежит более сложная зависимость, чем конкуренция типа

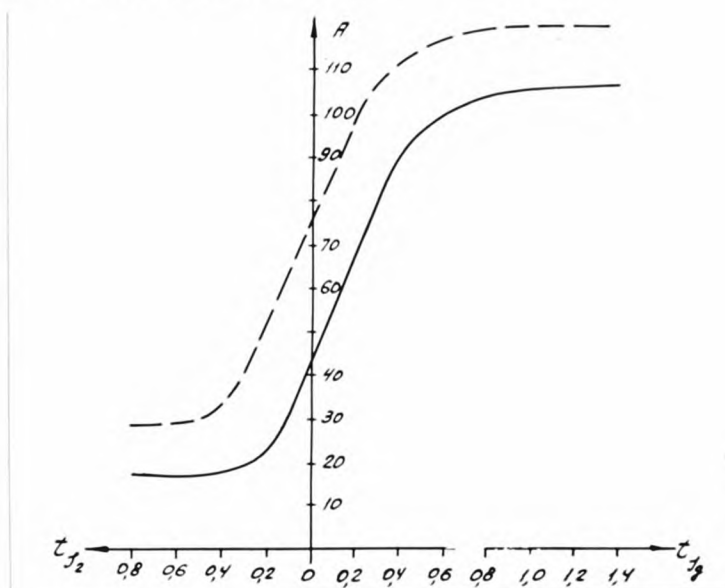


Рис. 42. Связь длительность толчка тока-амплитуда сокращения в нормальном и гипонатриевом растворах.

Сплошная линия для нормального раствора (Na -110 мМ)
пунктирная концентрация Na - 50 мМ.

ва В.М. (1970) с вариациями концентрации ионов натрия во внешней среде указывалось, что эти ионы оказывают решающее воздействие не только на изменение амплитуды сокращений, но и на механизмы активации и инактивации сокращений-хроноинотропию. Было показано, что в гипонатриевых растворах лестница Боудича становится менее выраженной, причем (утомление) инактивация сокращений с увеличением частоты стимуляции увеличивается. В гипернатриевом растворе наблюдается усиление лестничного эффекта, амплитуда сокращений и инактивация становится меньше.

В наших экспериментах при низких частотах стимуляции ($T > 10+5$ сек) снижение натрия в растворе до 50 мМ повышало амплитуду сокращений и мало влияло на лестничный эффект Боудича. Максимум сокращения, как и ожидалось, наблюдается через 5-6 сокращений. Деполяризующие толчки тока становятся более эффективными (см.рис.43), однако, инактивация сокращений происходит значительно быстрее, чем в тех же условиях в нормальном растворе. Эффекты последствия толчков тока практически не изменяются. Кривые смещаются как бы параллельно.

На рис.44 представлена суперпозиция переходных процессов сокращений в нормальном и гипонатриевом растворах с периодом стимуляции 2,5 сек. Видно, что при прочих равных условиях в гипонатриевом растворе, при гиперполяризующих толчках тока, инактивация сокращений меньше. Увеличение длительности деполяризующих толчков тока ведет к увеличению амплитуды сокращений и одновременному усилению их инактивации во времени. За исключением гиперполяризующего тока

лестничный эффект в гипонатриевом растворе уменьшен.

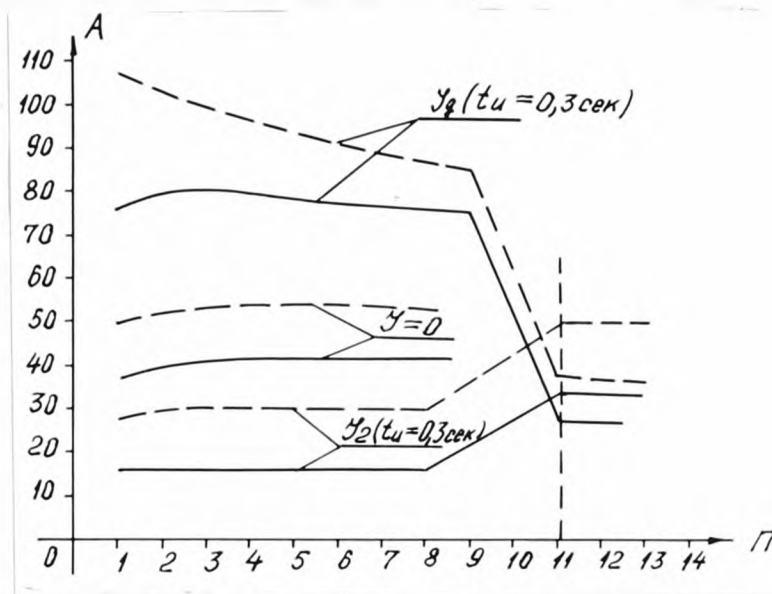


Рис. 43. Переходные процессы при действии толчков тока в нормальном и гипонатриевом растворах. (по оси абсцисс - номер импульса, по оси ординат - амплитуда сокращений).

Сплошная линия - для нормального раствора, пунктирная - для гипонатриевого ($Na = 50 \text{ mM}$), сила тока $y = 0,5 \text{ ма}$, период стимуляции - 5 сек.

Интересные данные приведены на рис. 45. Здесь а - сокращения в нормальном растворе; б и в - сокращения в гипонатриевом растворе, в конце дан толчок деполяризующего тока с целью тестирования сократительной способности миокарда.

Из рисунка видно, что несмотря на то, что в ходе естественного электрогенеза произошло утомление (инактивация сокращений), в клетке существуют факторы, способствующие развитию сокращений, которые могут быть активированы прину-

дительно при помощи толчков деполяризующего тока. Деполяризующее воздействие, нанесенное после некоторого отдыха, вызывает несколько большую величину контрактильного ответа, но также с быстро развивающейся инактивацией. Гиперполяризующий ток, как видно из рис. 45 д, в гипернатриевых растворах мало эффективен.

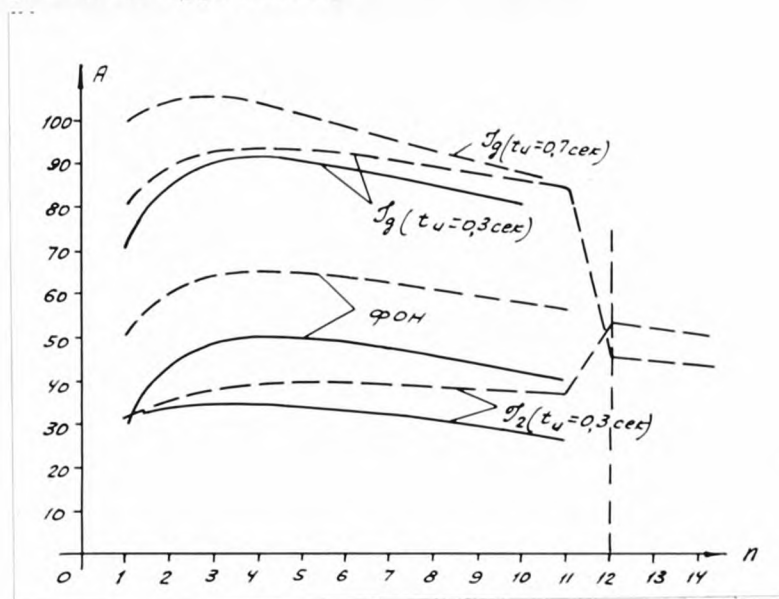


Рис. 44. Переходные кривые сокращений в нормальном и гипонатриевом растворах при действии толчков тока.

$T=2,5$ сек. Сплошная линия для нормального раствора, пунктирная — для гипонатриевого ($Na=50$ мм).

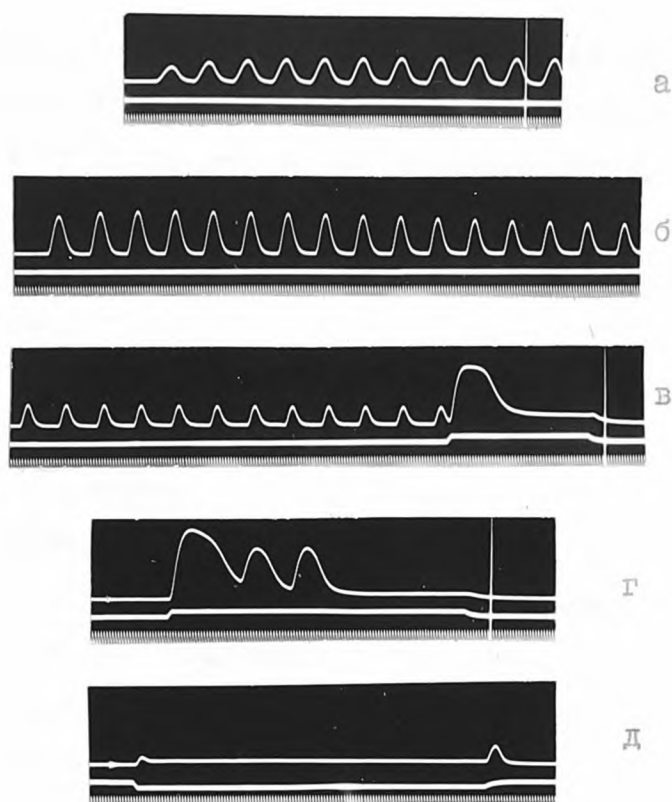


Рис. 45. Сокращения в гипонатриевом растворе.

а - фон (нормальный раствор), $T = 1,6$ сек,
 б, в - гипонатриевый раствор ($Na = 50$ мМ), после
 инактивации сокращений дан толчок тока $I_g = 2$ ма,
 $T = 5$ сек;
 г - деполяризующая контрактура, $I_g = 2$ ма,
 д - гиперполяризующая контрактура $I_2 = 2$ ма.

3. Влияние тетродотоксина и строфантина на электромеханическое сопряжение миокарда

Известно, что тетродотоксин обладает специфическим
 действием по отношению к натриевому каналу, не изменяя
 проницаемости ионов по другим каналам гетерогенных мембран.

Hagiwara, Nakajima (1965), Masher, Perez (1969), Hagiwara, Nakajima (1966) показали, что тетродотоксин^{ТТХ} блокирует быстрый натриевый канал, а строфантин уменьшает скорость выхода натрия из клетки, что способствует изменению процессов накопления ионов внутри клетки и оказывает существенное воздействие на электрическую и механическую активность миокарда. Ввиду сказанного, эти вещества могут быть хорошим инструментом при изучении механизмов электромеханического сопряжения, в том числе и при использовании метода фиксации тока.

В настоящее время ПД миокарда представляется как последовательное соединение двух компонент, где быстрая компонента ПД (активность быстрого натриевого канала) запускает ее медленную составляющую, обусловленную деятельностью натрий-кальциевого канала (фаза плато). P. de Carvalho, Hoffman, Paula Carvalho^{показали, что} - 1969 в определенных условиях, в частности при действии ионов никеля, электрогенез связан исключительно с деятельностью медленного канала (Гнистько Р.В., Орлов Р.С., Изаков В.Я., Ведерников Ю.П. - 1972. В этой же работе было выдвинуто представление о типах доминирующего электрогенеза и их смене в зависимости от внутриклеточной концентрации ионов. Вероятно, в клетках миокарда роль быстрой натриевой компоненты заключается не только в запуске последующей медленной компоненты ПД, но и в регуляции ее параметров через концентрацию ионов натрия в некоторых участках внутри клетки.

Представляет интерес изучение действия ТТХ на электрическую и механическую активность ритмически работающего

миокарда с целью выяснить взаимосвязь быстрой и медленной компонент ПД, роль медленной компоненты в регуляции сократимости, влияние сдвига внутриклеточных концентраций на последующие возбуждения и сокращения. Исследование проведено при вариациях частоты сердечбиений, поскольку последняя является важным фактором регуляции сократимости миокарда, за счет изменений концентраций ионов внутри клетки. Ввиду того, что чувствительность препарата к раздражающим импульсам в растворе с тетродоксином несколько падала, брались супрамаксимальные стимулы длительностью 50 мсек. Тетродоксин использовался в концентрации 1×10^{-7} г/мл, строфантин - 1×10^{-5} г/мл. В опыте использовался также адреналин в концентрации 1×10^{-6} г/мл. Данные опытов основаны на 40 экспериментах.

Следовые процессы выявляются уже после одиночной волны возбуждения. Временной ход потенциации после одиночного сокращения, определяемый при парной стимуляции, в нормальном растворе представлен на рис. 46. Видно, что потенцияция с увеличением периода стимуляции возрастает, достигает максимума при периоде 2,0 сек ($2,03 \pm 0,12$ сек) и затем медленно падает. Через 30-40 сек еще можно выявить небольшой прирост амплитуды тестирующих сокращений. На этом же рисунке отражено действие ТТХ. На графике видно, что в исследованном диапазоне частот не наблюдается перегиба кривой потенциации; а временной ход конечной части кривой мало меняется по сравнению с нормальным раствором. Вычисление параметров, характеризующих временной ход потенциации после одиночного сокращения по формуле:

$$P(t) = A(1 - e^{-\alpha t})e^{-\beta t}$$

показало, что $\alpha = 1,60 \pm 0,04 \text{ сек}^{-1}$, $\beta = 0,18 \pm 0,03 \text{ сек}^{-1}$. Тогда как в нормальном растворе $\alpha = 1,23 \pm 0,01 \text{ сек}^{-1}$, $\beta = 0,20 \pm 0,02 \text{ сек}^{-1}$. Различий между параметрами β в нормальном растворе и растворе с ТТХ практически не наблюдается в то время как различие между α в соответствующих случаях статистически достоверно ($P=0,05$).

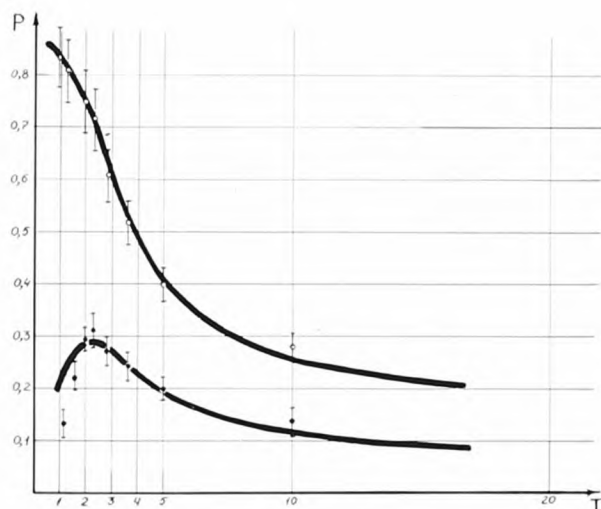


Рис. 46. Ход кривых потенциации сокращений в нормальном растворе (••••) и в растворе с ТТХ (ooo). По ординате — величина потенциации в относительных единицах, по абсциссе — период стимуляции в сек. Вертикальные столбики — удвоенная среднеквадратичная ошибка.

В рамках модели, описанной в работе Изакова В.Я. (1971), $1/\beta$ интерпретируется как константа скорости выхода натрия из клетки, а α характеризует степень уменьшения длительности

ПД при тестировании. Следовательно, приведенные данные означают, что ТТХ не влияет на скорость оттока натрия из клетки, но действует на его поступление при возбуждении.

В растворе с ТТХ амплитуда фоновых сокращений значительно падает, и это приводит к кажущемуся приросту потенциации. В действительности приведение к одинаковой исходной амплитуде сокращений показало, что абсолютная величина потенциации при добавлении ТТХ падает.

В наших экспериментах начальным эффектом ТТХ было подавление сокращений при неизменности электрической активности, а затем проявление его действия на ПД: уменьшение времени плато, падение овершута (рис. 47). Подавление ПД приводит к дальнейшему уменьшению амплитуды сократительного ответа — оно тем более выражено, чем больше подавлены ПД. Время проявления и выраженность эффекта ТТХ зависит от частоты стимуляции. При редкой частоте стимуляции влияние ТТХ невелико: уменьшается длительность фазы плато (до 10%), замедляется фаза быстрой деполяризации, уменьшается овершут ПД (на 5–10 мВ). Потенциал покоя при действии ТТХ не изменяется. При периоде стимуляции 2 сек уже на третьей минуте действия ТТХ наблюдается выраженное снижение амплитуды ПД, фаза плато постепенно исчезает, уменьшается скорость деполяризации. Эффект ТТХ прогрессирует во времени. На пятой–шестой минутах ПД становятся абортивными, резко падает возбудимость, сокращения практически исчезают.

Еще более выраженные изменения наблюдались при периоде стимуляции порядка 1–1,2 сек. Подавляющее действие может наступить через 30–40 сек и менее. На низкой частоте

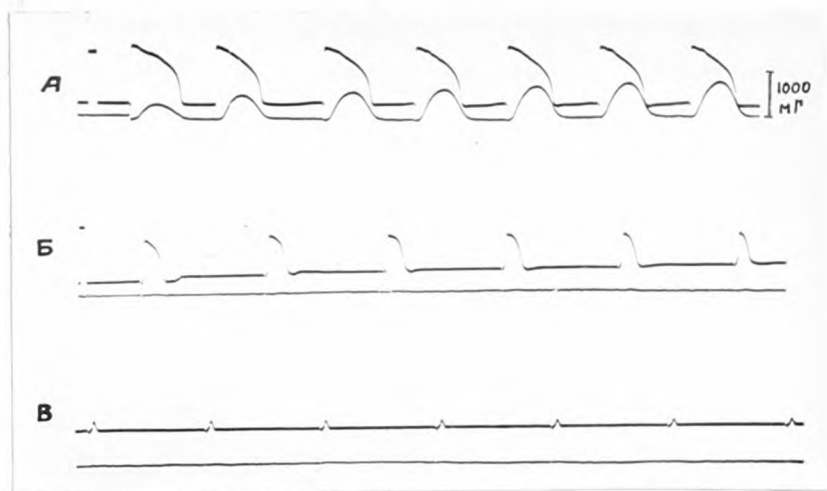


Рис.47. Действие ТТХ на электрическую и механическую активность сердечной мышцы при ритмической стимуляции (частота 0,5 1 /сек).

А - нормальный раствор, Б - третья минута действия ТТХ, В - шестая минута действия ТТХ. Верхние кривые - внутриклеточнорегистрируемые ПД, нижние - сокращения.

Калибровка амплитуды - ПД -100 мв, калибровка для сокращений - 1000 мг, отметка времени- 100 мсек.

стимуляции длительная диастолическая пауза в растворе с ТТХ приводит к почти полному восстановлению исходных параметров ПД и в меньшей степени сокращений. С ростом частоты стимуляции временной интервал, необходимый для восстановления электрической и механической активности, возрастает. При периодах 2 сек восстановление никогда не бывает полным, при еще меньших - отсутствует. Влияние ТТХ зависит не только от частоты стимуляции, но и от ее продолжительности. Подавление электрической и механической активности тем сильнее, чем больше число предшествующих стиму-

лов на данном периоде раздражений имело место.

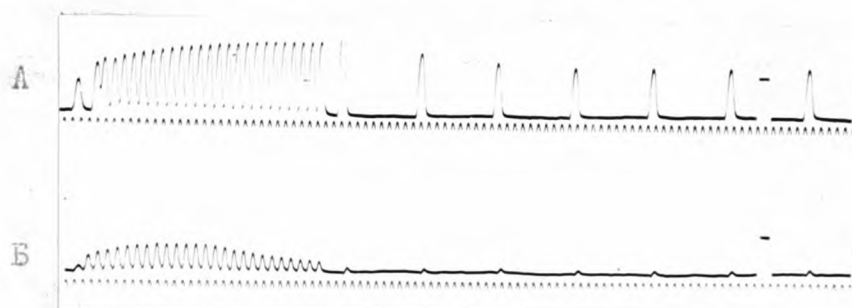


Рис. 48. Изменение сократительной активности миокарда под влиянием ТТХ при кратковременной высокочастотной стимуляции (частота 0,9 1/сек, длительность стимуляции 30 сек (с последующим переходом на низкую частоту (0,1 1/сек).

А — нормальный раствор, Б — раствор с ТТХ. Калибровка амплитуды сокращений 1000 мг, отметка времени 1 сек.

Влияние ТТХ (10^{-7} г/мл) на сократительную активность при высоких ритмах стимуляции представлено на рис. 48 Б. Для сравнения показан эффект того же частотного воздействия в нормальном растворе (рис. 52 А). Видно, что в нормальном растворе наблюдается потенциация сокращений (прямая лестница Бодича), которая удерживается на некотором постоянном уровне и медленно падает при длительной стимуляции. В растворе с ТТХ вначале так же наблюдается феномен положительной лестницы, а затем происходит значительное падение амплитуды сокращений. Переход с высокой частоты стимуляции на более низкую в нормальных условиях ведет к уменьшению силы сокращений, которая приходит к уровню, соответствующему стационарной зависимости частота-сила сокращений. В растворе с ТТХ это явле-

ние отсутствует — амплитуда сокращений не достигает даже исходного уровня. При отмывании в нормальном растворе параметры сократительного ответа и ПД полностью восстанавливаются.

В нормальном растворе деполяризующий ток, прикладываемый во время фазы плато ПД, вызывает, как мы видели, увеличение амплитуды сокращений, которое тем больше, чем больше длительность катодического воздействия. (рис. 49 А, Б, В). При длительностях толчков более 0,4 сек ток помимо амплитуды влияет на время сокращений, удлиняя их. ТТХ настолько подавляет сократимость, что деполяризующий ток становится мало эффективным (рис. 49 Д, Е). Даже в тех случаях, когда достаточно сильный и длительный ток активировал сократимость, при ритмической стимуляции последняя падала и все более сильный ток был необходим для поддержания амплитуды сокращений на постоянном уровне. ПД при этом были abortивными, но приложение деполяризующих толчков удлиняло их (рис. 50 Д, Е).

Интересно, что увеличение концентрации ТТХ до $(5 \div 10) \times 10^{-7}$ г/мл приводит к тому, что влияние деполяризующих толчков тока исчезает практически после первого импульса. Это демонстрируется на рис. 51. На этом же рисунке показано, что несмотря на то, что сократимость миокарда в растворе с ТТХ подавлена, сильный деполяризующий ток достаточно большой длительности способен вызвать контрактильный ответ. Характерным является то, что гиперполяризующая контрактура при обычных значениях тока не возникает. Деполяризующая конт-рактура имеет меньшую величину и не содержит быстрой фазы инактивации, что обычно наблюдается в нормальном растворе.

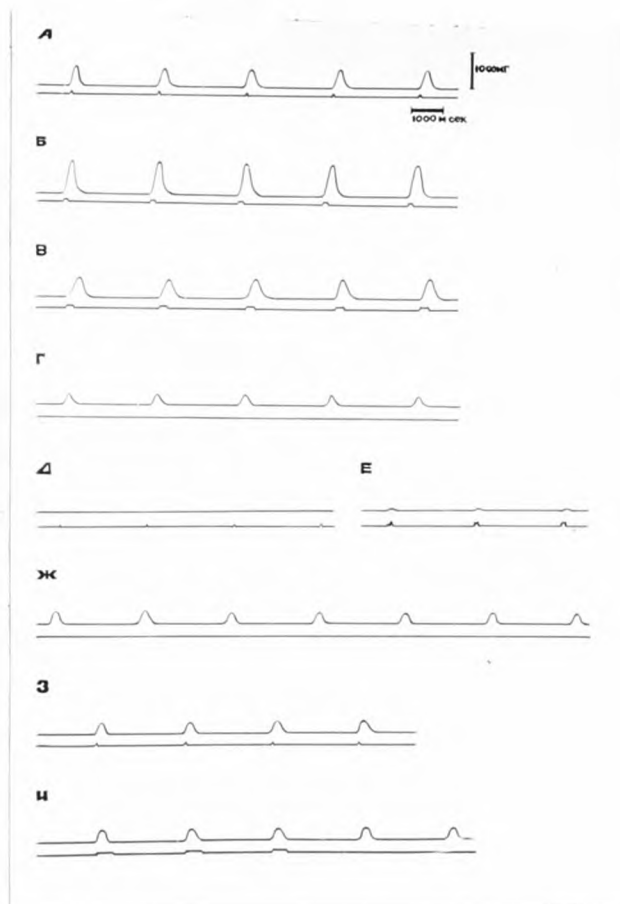


Рис. 49. Влияние деполяризующих толчков тока, прикладываемых во время возбуждения, на сократимость миокарда. А-Г - нормальный раствор, Д-Е - действие ТТХ, Ж-И - раствор ТТХ + адреналин.

Верхние линии - сокращения, нижние - отметки тока (0,2 ма).

Калибровка сокращений 1000 мг, отметка времени 1 сек.

В записи - В - усиление уменьшено в 2,5 раза.

Адреналин в растворе ТТХ, где электрическая и механическая активность полностью подавлены, восстанавливает ПД и сократимость. Часто амплитуда сокращений превышает даже исходные значения в нормальном растворе. Деполяризующие толч-

ки тока в растворе ТТХ + адреналин удлиняют ПД (рис.50), но практически не влияют на механическое напряжение (рис.49ж, в, и). Восстанавливающее действие адреналина выражено значительно сильнее, если опыт производится на фоне повышенной концентрации натрия. При концентрации ТТХ 10×10^{-7} г/мл адреналин даже в повышенной концентрации не оказывает своего действия.

Ионы кальция (5 мМ), добавленные в раствор с ТТХ, не восстанавливают активности миокарда, а в ряде случаев еще более подавляют ее. На фоне гипернатриевого раствора +ТТХ кальций приводит к частичному восстановлению сокращений. Препарат в этих условиях становится более "устойчивым" к высокочастотной стимуляции и выдерживает длительную стимуляцию. Зависимости параметров электрической и механической активности от амплитуды раздражающего стимула не наблюдается. Адреналин, добавленный в раствор ТТХ + Са, резко активизирует сократимость (в 2-3 раза выше амплитуды сокращений в нормальном растворе). Однако эффект адреналина кратковремен. При среднем ритме стимуляции (0,2-0,5 1/сек) сокращения через некоторое время падают. Длительные паузы или переход на низкую частоту приводят к восстановлению сократимости. Здесь как бы наблюдается потенциация покоем. Увеличение амплитуды раздражающего стимула временно приводит к увеличению сокращений, но в последующем они еще более подавляются и все более длительные паузы необходимы для достижения прежней амплитуды сокращений. Подавление идет по типу "все или ничего".

В ряде опытов на фоне ТТХ добавлялся строфантин, который в нормальном растворе обладает выраженным инотропным действием. В растворе с ТТХ строфантин усиливает ингибирующее действие ТТХ на электрическую и механическую активность. Любопытно, что если к раствору с ТТХ, в котором была полностью подставлена механическая активность и чувствительность миокарда к толчкам тока (рис.51 г), добавить строфантин, чувствительность к току той же силы частично восстанавливается. Из рис.51и видно, что в этом случае возникают незначительные сокращения, пропорциональные длительности катодного воздействия. По достижении определенной амплитуды сокращения изменяют только свою длительность и напоминают контрактильный ответ с несколько затянутым фронтом нарастания. Адреналин, добавленный к такому раствору, не только восстанавливал возбудимость и сократительную активность миокарда, но и частично его чувствительность к деполяризующим толчкам тока (рис.51 к, л).

Специфическим действием строфантина в нормальном растворе является активация сократительной активности, которая в последующем подавляется. Инактивация сокращений при высокой частоте наступает через 4-5 минут после введения строфантина в раствор и значительно усиливается при повышении частоты стимуляции или при условии, когда к препарату прикладывать деполяризующие толчки тока. Складывается впечатление, что инактивация пропорциональна количеству предшествующих возбуждений миокарда. Сказанное иллюстрируется на рис.52. Кривые 1,2 соответствуют сократительной активности миокарда в нормальном растворе, причем в случае 2 действуют деполя-

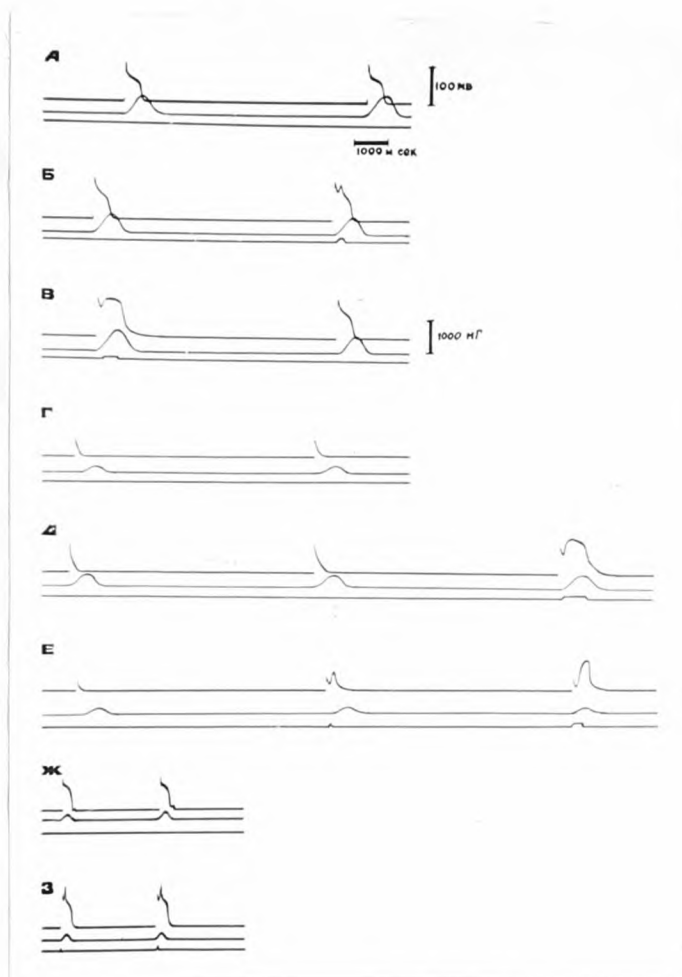


Рис.50. Влияние деполяризующих толчков тока на ПД и сокращения желудочка лягушки.

А-В - нормальный раствор, Г-Е - раствор с ТТХ, Ж-З - ТТХ+адреналин. Верхние кривые - ПД, средние - изометрическое напряжение, нижние - отметка тока ($\gamma = 0,15$ ма). Калибровка амплитуды ПД - 100 мв, сокращений - 1000 мг, отметка времени 1 сек.

ризирующие толчки тока $t_u = 0,3$ сек. Период стимуляции 5 сек. Кривая 3 иллюстрирует сокращения, которые наблюдаются через две минуты после добавления строфантина в раствор. Кривая 4 - через четыре минуты после добавления

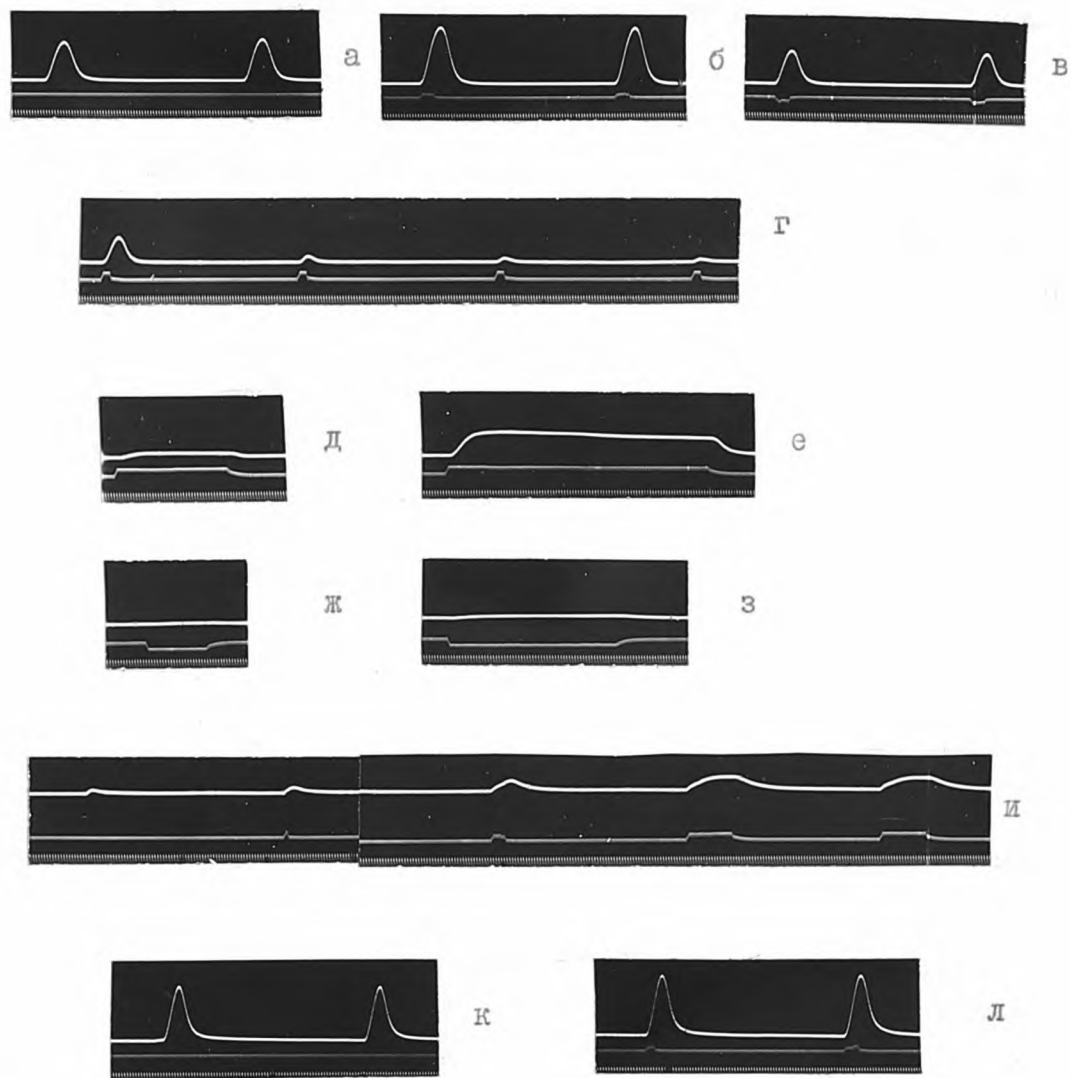


Рис.5I. Влияние тетродоксина и строфангина на сократимость миокарда при действии тока.

а,б,в - нормальный раствор, г - ТТХ = 5×10^{-7} г/мл.
и - раствор ТТХ + строфантин, дж - ТТХ, $\gamma = 0,7$ ма,
е,з - ТТХ, $\gamma = 1,8$ ма, к,л - раствор ТТХ+строфантин+адреналин.

строфантина. Спустя еще две минуты к препарату прикладывались деполяризующие толчки тока длительностью 0,3 сек (кривая 5), а затем, после двухминутного перерыва, деполяризующие толчки тока длительностью 0,5 сек (кривая 6). Видно, что деполяризующие толчки тока приводят к еще более быстрому утомлению миокарда в растворе со строфантином и не обладают активирующим свойством.

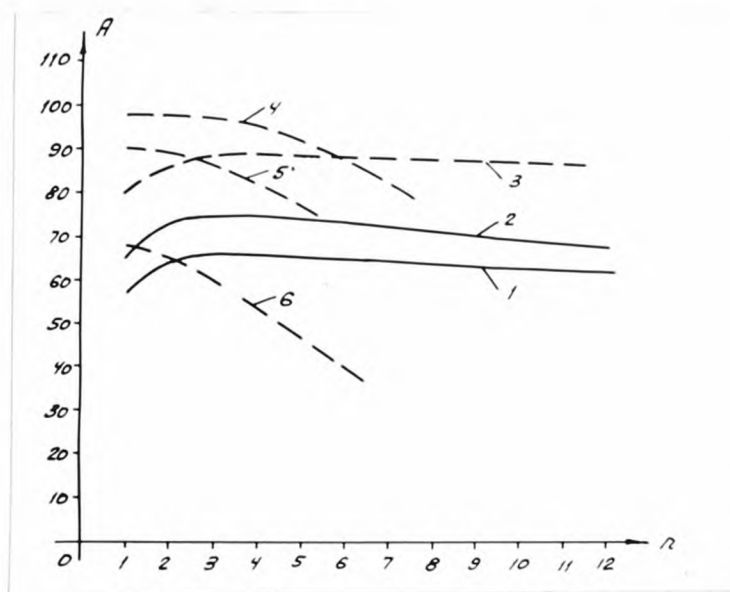


Рис. 52. Переходные характеристики при действии деполяризующих толчков тока в растворе со строфантином (10^{-5} г/мл).

1 — нормальный раствор, 2 — деполяризующие толчки тока ($t_u = 0,3$ сек) в нормальном растворе, 3 — действие строфантина через 2 мин, 4 — строфантин через 4 мин, 5, 6 — деполяризующие точки тока в растворе со строфантином (в 5 — $t_u = 0,3$ сек, 6 — $t_u = 0,6$ сек).

В ы в о д ы

1. Увеличение концентрации кальция в наружном растворе приводит к активации сокращений миокарда. Зависимость длительность толчков тока — сила сокращений S —образна и претерпевает значительные изменения при увеличении концентрации кальция.

2. В гиперкальциевом растворе влияние деполяризующих толчков тока на амплитуду сокращений падает, а гиперполяризующих — возрастает. Способность к развитию контрактурного ответа при действии постоянного деполяризующего и гиперполяризующего тока падает.

3. Постановодическая сократимость ритмически работающего миокарда в гиперкальциевом растворе возрастает. Она зависит от частоты стимуляции и является максимальной, если раздражение миокарда во время гиперполяризующего тока отсутствует.

4. Анодразмыкательная контрактура в гиперкальциевом растворе менее выражена, чем в нормальном растворе. Причем амплитуда анодразмыкательного сокращения в этом случае пропорциональна силе гиперполяризующего тока и практически не зависит от длительности его воздействия.

5. Снижение концентрации ионов натрия в растворе увеличивает силу сокращений миокарда. Короткие деполяризующие толчки тока в гипонатриевом растворе вызывают больший прирост амплитуды сокращений, чем в нормальном растворе. Зависимость "длительность толчков тока — сила сокращений" сдвигается вверх.

6. Способность деполяризующего и гиперполяризующего тока вызывать контрактуру в гипонатриевом растворе меньше, чем в нормальном.

7. Тетродотоксин в дозе 1×10^{-7} г/мл во время ритмической деятельности сердца уменьшает длительность фазы плато ПД, скорость начальной деполяризации и овершут. Параллельно ТТХ подавляет сократимость. Тетродотоксин оказывает слабое влияние на электрическую и механическую активность клеток миокарда при одиночных стимулах. Действие ТТХ выражено тем заметнее, чем выше частота стимуляции. Длительные диастолические паузы приводят к частичному восстановлению параметров ПД и механического ответа. Восстановление сократимости определяется режимом предшествующей деятельности.

8. Деполяризующие толчки тока в растворе с тетродотоксином удлиняют ПД, но не влияют на сократимость. Способность деполяризующего тока вызывать контрактуру в растворе с тетродотоксином минимальна, гиперполяризующего — отсутствует.

9. Добавление строфантина в раствор, где сократимость миокарда полностью подавлена тетродоксином, приводит к появлению контрактурных ответов в ответ на действие деполяризующих толчков тока, которые не сопровождаются генерацией ПД.

10. Адреналин, добавленный в раствор с тетродотоксином, восстанавливает электрическую и механическую активность, но не восстанавливает чувствительность миокарда к току. Совместное влияние адреналина и строфантина в растворе с тетродотоксином полностью восстанавливают сократимость миокарда и его чувствительность к току.

II. Строфантин активизирует сократимость миокарда при одиночных раздражениях, но ведет к быстрой ее инактивации в ритмическом ряду при высоких частотах стимуляции. Деполаризующие толчки тока при действии строфантина ускоряют подавление сокращений.

ГЛАВА VI

ОБСУЖДЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

Общезвестна роль ионов кальция в формировании контрактильного ответа в клетках миокарда и скелетных мышц. Хорошо изучено действие свободных ионов кальция на уровне контрактильного аппарата (*Ebashi* , *Endo* - 1968, *Ebashi* , *Endo* , *Ohtsuki* - 1969, *Sadow* - 1970, *Sonnenblick* , *Stam* - 1970). Достаточно четко определены общие черты механизма электромеханического сопряжения и основные его этапы в скелетной мышце. Однако детали функционирования внутриклеточных контролирующих систем миокарда до сих пор не вполне ясны. Это прежде всего касается роли внутриклеточных катионов в регулировании электрической активности и сократимости миокарда, изменении электромеханического сопряжения в зависимости от предьстории деятельности препарата, регулирующей роли ПД в отношении контролирующих клеточных систем и т.д. Применение методов фиксации тока и напряжения на саркоплазматической мембране позволили прийти к одному фундаментальному положению - параметры ПД (в особенности в миокарде холоднокровных) являются регуляторами сокращений, определяя количество кальция, поступающего в клетку или высвобождающегося из некоторых внутриклеточных запасов. Наши данные еще раз подтверждают это положение. Такие исследования показывают, что также большую сложность ионных взаимоотношений внутри клетки и высокую лабильность аппарата элект-

ромеханического сопряжения в миокарде. Общая картина электрогенеза в малых клетках миокарда до сих пор также не ясна. До сих пор неясно, например, принимают ли ионы натрия участие в электромеханическом сопряжении или их роль заключается только в деполяризации мембраны и генерации начальной части ПД. Не ясна природа регулирования длительности потенциалов действия, особенно при ритмической деятельности миокарда и как происходит регулирование силы сокращений длительностью ПД. Недостаточно четко изучены процессы инактивации сократимости при удерживаемой деполяризации и природа следовых процессов и целый ряд других явлений. Нет даже единого мнения какой кальций идет на сокращение в миокарде: наружный, внутренний или оба одновременно.

Как показано нами в гл. III, наиболее характерным эффектом деполяризующих толчков тока, которые прикладывались во время ПД, является увеличение амплитуды и длительности сокращений, а иногда и изменение формы сокращений. Влияние деполяризующих толчков выражено тем сильнее, чем больше величина тока и его длительность. Гиперполяризующий ток, задаваемый во время ПД, обладает противоположным действием. Инотропное действие деполяризующего тока весьма значительно, и сила сокращений в некоторых препаратах увеличивалась в 4-6 раз. Увеличение силы сокращений сопровождается увеличением длительности ПД. Гиперполяризующие толчки тока обладают инактивирующим действием на силу сокращений и укорачивают ПД. Аналогичные явления при действии деполяризующего и гиперполяризующего тока на миокарде недавно были продемонстрированы *Goto, Brooks* - 1970. Эти авторы показали, что

мембрана клеток миокарда желудочка лягушки обладает аномальным выпрямлением, т.е. чем выше деполяризующий мембрану потенциал, тем выше ее сопротивление, и именно этим они объяснили влияние деполяризующих и гиперполяризующих толчков тока на длительность ПД. Однако механизм увеличения сопротивления мембраны во время деполяризации остается неясным.

Мы полагаем, что действие деполяризующих и гиперполяризующих толчков тока можно объяснить и другим способом.

В работе Изакова В.Я. (1968) было выдвинуто представление, что фазу плато ПД можно объяснить наличием дополнительного сопротивления, которое включается в калиевом канале при деполяризации. Высокая чувствительность этого дополнительного сопротивления к ингибиторам метаболизма, строфантину, изменению температуры, а также к увеличению следования раздражающих стимулов может явиться, по мнению автора, косвенным доказательством метаболической природы данного явления. Иными словами длительность ПД определяется скоростью работы натриевого насоса ($K-Na$ - АТФ-азы). Предполагалось также, что электрогенное выталкивание натрия во время ПД доводит мембранный потенциал до критического уровня, при котором начинается регенеративный процесс реполяризации. Чем быстрее работает этот механизм, тем уже ПД. Рядом авторов показано, что скорость работы этой ферментной системы является функцией внутриклеточной концентрации натрия и кальция. Увеличение содержания натрия в цитоплазме активирует $K-Na$ АТФ-азу, кальция - блокирует ее. Можно предположить, что вход натрия, который

имеется во время регенеративной деполяризации мембраны активирует *K-Na* АТФ-азу и определяет скорость и длительность реполяризации в фазу плато. При ритмической стимуляции имеется накопление некоторого количества натрия в при-слое у внутренней поверхности мембраны, что должно суживать ПД. Можно полагать, что в регуляции длительности ПД принимают участие также ионы кальция, которые кратковременно могут оказывать свое влияние. Однако, после завершения сокращения миокарда их концентрация внутри клеток падает и влияние свободных ионов кальция на последующие ПД должно оказываться лишь при достаточно малых периодах стимуляции. Таким образом, примембранные концентрации ионов натрия и кальция могут быть регуляторами длительности ПД.

Деполяризующие толчки тока смещают мембранный потенциал, так что уровень, с которого начинается электрогенное выталкивание натрия, повышается, а уровень срабатывания регенеративной реполяризации остается постоянным. Это должно увеличивать длительность ПД.

Кроме того, как было нами показано, даже кратковременные толчки деполяризующего тока, прикладываемые во время начальной части фазы плато, способны удлинять ПД. Смещение потенциала мембраны в сторону натриевого равновесного потенциала уменьшает количество входящих ионов натрия и создает в клетке относительный (по отношению к ПД без тока) дефицит натрия, что замедляет скорость работы *K-Na*-АТФ-азы и удлиняет ПД. Конечная регенеративная фаза реполяризации практически не зависит от того прикладывался ток или нет. Об-

ратная ситуация наблюдается при действии гиперполяризующих толчков тока, прикладываемых во время ПД. Изменение потенциала ускоряет наступление регенеративной деполяризации, но после возбуждения относительное содержание ионов натрия повышено. Приведенные рассуждения — это только один аспект регулирования длительности ПД. Второй — выявляется при рассмотрении влияния тока на сократимость миокарда и анализе роли ионов кальция в этих феноменах.

Повышение механического напряжения при действии деполяризующих толчков тока свидетельствует об увеличенном входе внутрь клетки при возбуждении ионов кальция из внеклеточной среды и/или высвобождении ионизированного кальция из некоторых внутриклеточных мест связывания. Как было отмечено в обзоре, такими участками связывания могут быть саркоплазматический ретикулум (СР) и сарколема. Для желудочка лягушки, где имеются лишь рудименты СР, основной внутриклеточный кальций, повидимому, находится в субсарколемальном депо, в виде некоторого комплекса CaR (R^{--} обратимо связывает не только кальций, но и другие катионы). Основной постулат, который мы принимаем, состоит в следующем. При "нормальном" возбуждении входящие ионы кальция частично идут к миофиламентам, а частично связывается с рецептором R у внутренней поверхности мембраны. Высвобождение кальция при деполяризации определяется концентрацией ионов натрия у мест связывания кальция. При недостатке натрия комплекс CaR диссоциирует хуже, при наличии натрия (и при одновременной деполяризации) высвобождение кальция из комплекса облегчается.

Каким же образом происходит регулирование сократимости миокарда при действии тока? Денополяризующий ток, увеличивая длительность ПД, приводит к увеличенному входу кальция из внеклеточной жидкости за счет большего времени открытия кальциевого канала. Одновременно он приводит к повышенному высвобождению и внутриклеточного кальция (при естественном электролизе этому способствуют внутриклеточные ионы натрия), например, через изменение константы связывания кальция в комплексе CaR и смещение реакции в сторону распада комплекса CaR . Однако при длительном действии денополяризующего тока количество комплекса CaR внутри клетки увеличивается и соотношение $\frac{Ca_i}{Na_i}$ смещается в сторону кальция.

В главе III было показано, что амплитуда токовой контрактуры и ее инактивация значительно зависят от величины денополяризующего тока. Инактивация контрактурного ответа в миокарде, и на скелетных мышцах была продемонстрирована также в том случае, если денополяризация мембраны создается при помощи различных концентраций хлористого калия в омывающем растворе (*Niedergerke* - 1956, *Hodgkin, Horowicz* 1960). Природа этого процесса до сих пор остается неясной, хотя трудно предположить, что при длительной денополяризации мембраны возможен кальциевый ток, неограниченный во времени. Можно предположить, что при удерживаемой денополяризации со временем за счет кинетики процессов, которая, по всей видимости, изменяется от уровня напряжения на мембране, происходит превышение выхода кальция над входом. Как показали *Ash-*

Lee, Baker - 1971, Hodgkin, Baker, Ridgway, 1971, при длительно удерживаемой деполяризации мембраны вход ионов кальция в клетку инактивируется. Не исключено, что регулятором входа кальция является сам мембранный комплекс

CaR , так что его увеличение уменьшает кальциевый вход. Эти явления могут объяснить наблюдающуюся инактивацию сокращений при длительно удерживаемой деполяризации. Таким образом, причиной инактивации сократимости по нашему мнению является увеличение количества мембранного комплекса CaR и относительное уменьшение внутриклеточной концентрации ионов натрия. После прекращения действия деполяризующего тока в клетке некоторое время также будет наблюдаться указанный сдвиг, что скажется на последующих потенциалах действия и сокращениях.

Гиперполяризующий ток вызывает противоположные сдвиги в системе электромиофибриллярной связи. Если гиперполяризующий ток прикладывается во время ПД, то его действие можно объяснить укорочением длительности ПД, а следовательно, и меньшим забросом в клетку ионов натрия и кальция (или меньшим высвобождением кальция). С другой стороны, гиперполяризующий ток может увеличивать кальций-поглощающую емкость внутриклеточных мест связывания; при этом меньше кальция высвободится из мест хранения, и больше входящего кальция свяжется с соответствующим рецептором у внутренней поверхности мембраны. Данный вывод вытекает из того, что после прекращения действия гиперполяризации ритмические сокращения миокарда в течение некоторого времени больше нормальных.

Повышенную чувствительность миокарда к действию толчков тока, прикладываемых в начальную часть ПД по отношению к действию этого тока в заключительную фазу ПД или во время диастолы, можно объяснить изменением сопротивления мембраны во времени.

Приложение гиперполяризующего тока без предварительного запускающего стимула (т.е. когда ПД не развивается) увеличивает электродвижущую силу для ионов натрия и кальция. При достаточно сильном гиперполяризующем токе возникает как бы "пробой" мембраны и ионы кальция поступают в клетку. Большая часть входящего кальция связывается у внутренней поверхности мембраны, другая поступает к миофиламентам, вызывая контрактуру. Снятие гиперполяризующего тока приводит к высвобождению избытка кальция, связанного с рецептором, что объясняет анодразмыкательную контрактуру с её относительно медленной инактивацией. Контрактура от гиперполяризующего тока значительно отличается от контрактуры при деполяризующем токе (меньше, а иногда совсем отсутствует инактивация), меньше последней по величине и возникает только при достаточно больших его значениях. Отсутствие инактивации и даже некоторое нарастание контрактуры при сильном гиперполяризующем токе объясняется тем, что в клетку во время "пробоя" входят только ионы кальция. Здесь, по видимому, как и в случае деполяризующего тока, по мере накопления комплекса вход кальция в клетку инактивируется. Однако, поскольку фактор, выталкивающий кальций из клетки в этом случае отсутствует, инактивации сокращений не наблюдается. Об этом же свидетельствует уменьшение длительности ПД, но повышение

амплитуды сокращений при снятии гиперполяризующего напряжения. Данное объяснение согласуется с известным фактором (*Niedergerke*, *Lüttgan* - 1957), что в безнатриево-растворе развивающиеся контрактуры (без деполяризации) также не инактивируются.

В обсуждении нуждаются явления, возникающие при действии тока на фоне ритмической стимуляции. В гл. IV было показано, что постоянный деполяризующий ток, прикладываемый к мембране во время ритмической деятельности миокарда, обладает двойным действием. С одной стороны, он активизирует сокращения, так что амплитуда первых сокращений после его приложения может быть значительно выше фоновых, а с другой - подавляет их в ритмическом ряду так, что амплитуда сокращений может стать со временем даже ниже сокращений, которые регистрируются без тока. На снятие деполяризующего тока амплитуда сокращений еще более подавлена. Длительность потенциалов действия при этом, как мы видели, становится значительно меньше длительности фоновых ПД. В этой же главе было показано, что короткие толчки деполяризующего тока, прикладываемые во время плато ПД, также значительно повышают амплитуду сокращений миокарда, однако наблюдаемая инактивация сокращений в ритмическом ряду значительно ниже, чем при действии постоянного деполяризующего тока. Эти данные показывают, что в регулировании сократимости миокарда при ритмической стимуляции принимают участие два фактора. С одной стороны, регулирование силы сокращений осуществляется через изменение длительности ПД, которые в свою очередь зависят от

содержания ионов натрия и комплекса CaR в примембранном слое. С другой стороны, имеет место потенциация и инактивация сокращений при неизменной длительности ПД.

Накопление натрия внутри клетки активирует вход кальция во время возбуждения (Baker - 1968, Baker, Blaustein, Hodgkin, Steinhardt - 1969, Blaustein, Weismann - 1970, Blaustein, Hodgkin - 1969, Reuter, Seitz 1968) и этим можно объяснить активацию сокращений. Кроме того, натрий может обеспечить высвобождение кальция из комплекса CaR за счет конкуренции при очередном возбуждении. Активация сокращений может быть объяснена также, если принять во внимание, что входящий кальций частично поглощается рецептором CaR у поверхности мембраны и не достигает миофиламентов. По мере заполнения рецептора R ионами кальция и натрия, входящими при возбуждении, все большая часть ионов кальция будет достигать миофиламентов, вызывая потенциацию сокращений. Таким образом, потенциация сокращений (лестница Боудича) при ритмической стимуляции миокарда после некоторого периода покоя объясняется динамикой накопления CaR и натрия в примембранном слое.

Накопление комплекса CaR в свою очередь, должно приводить к уменьшению входа кальция в клетку и инактивации сокращений при повышенных частотах сердцебиений. Так как после прекращения действия деполяризующих толчков тока, что сопровождается накоплением комплекса CaR в клетке и относительным уменьшением натрия в клетке по отношению к кальцию, длительность ПД становится значительно меньше фоновых, можно полагать, что комплекс CaR непосредственно уменьша-

ет длительность ИД. Такой механизм регуляции сократимости ритмически работающего миокарда хорошо согласуется с данными целого ряда авторов.

Еще *Moulin* и *Wilbrandt* 1955, а впоследствии *Niedergerke* (1956) обнаружили, что повышенная концентрация ионов кальция в растворе снимает эффект лестницы Боудича в миокарде, который мы обычно наблюдаем при раздражении сердца после некоторого периода покоя. В опытах с фиксацией напряжения (*Beeler*, *Reuter* - 1970) было показано, что пороговый потенциал для потенциации сокращений совпадает с пороговым потенциалом кальциевого тока. При последовательных деполяризующих толчках с определенной частотой кальциевый ток остается постоянным, а сила сокращений в серии значительно нарастает и достигает стационарного значения на 5-8 возбуждении. Ими же было обнаружено, что, если мембранный потенциал между двумя сокращениями поддерживается на уровне покоя (или с гиперполяризацией), то два последовательных сокращения идентичны. Когда мембранный потенциал между двумя сокращениями смещен в сторону деполяризации, амплитуда второго сокращения падает. В безнатриевых растворах сокращения возникают только в ответ на толчок, который активизирует кальциевый ток. Увеличения механического напряжения (или активации сокращений) при повторных деполяризациях в этом случае не наблюдалось. Это указывает на то, что механизм облегчения сокращений, повидимому, является более сложным, чем просто потеря кальция из клетки в состоянии покоя, как это считали *Moulin* и *Wilbrandt* или,

скажем, с изменением содержания этого иона преимущественно в примембранном наружном слое клетки, как это объясняли *Niedergerke* (1956) и позднее *Koch-Weser, Blinks* 1963.

Мы полагаем, что активация сокращений при ритмическом возбуждении миокарда связана с изменением концентрации комплекса CaR и NaR , а также ионов натрия в примембранном слое внутри клетки.

Таким образом, электромеханическое сопряжение в миокарде представляется нам следующим образом. При возбуждении кальций наружной среды проходит через плазматическую мембрану и входит в клетку. Определенная его часть диффундирует к миофиламентам, а другая связывается у внутренней поверхности мембраны некоторым рецептором, который обладает способностью связывать и другие катионы, в особенности, натрий. При наличии кальций-натриевой конкуренции в этих участках, входящий при возбуждении ион натрия будет высвобождать кальций из мест связывания и давать свой вклад в сокращение. Кроме того, деполяризация может прямо высвобождать кальций из внутриклеточных мест связывания изменяя, например, константы связывания или распада комплекса кальций-рецептор за счет конформационных сдвигов в молекулах рецептора. Деполяризующий ток, действующий во время ПД, увеличивает поступление внешнего кальция через увеличение длительности поддерживаемой деполяризации, а увеличенный вход ионов натрия способствует высвобождению кальция из внутриклеточных мест хранения, как бы забивая кальций-поглощающие рецепторы.

При ритмической стимуляции после завершения одиночного цикла возбуждения внутриклеточные концентрации ионов и их соотношение, а также пропорция $CaR-NaR$ не приходят к своему исходному состоянию. Именно эти сдвиги обуславливают сдвиги в ПД и сократимости при последующих возбуждениях. Значительные послеэффекты деполяризующего и гиперполяризующего токов, а также то, что последствие от токовых воздействий проявляется уже после однократного приложения тока, свидетельствует о высокой лабильности внутриклеточных ионных взаимоотношений. Об этом же свидетельствуют эффекты, наблюдаемые в гиперкальциевом и гипонатриевом растворах.

Увеличение концентрации ионов кальция во внешнем растворе приводит к увеличению силы сокращений, уменьшению лестницы Боудича и более выраженной инактивации сокращений в ритмическом ряду. Инактивация сокращений в ритмическом ряду при действии как постоянного тока, так и коротких толчков деполяризующего тока выражена значительно сильнее. Это объясняется более быстрым накоплением комплекса CaR в примембранном слое и меньшим количеством входящего натрия внутрь клетки во время возбуждений (за счет кальций-натриевой конкуренции) по *Niedergerke*). В гипонатриевом растворе наблюдаются аналогичные явления с той лишь разницей, что инактивация сокращений при ритмической стимуляции выражена относительно меньше особенно при действии деполяризующего тока.

Высказанные соображения о механизме регуляции сократимости иллюстрируются данными, приведенными в гл.У.

Из работ, посвященных действию ТТХ на сердце (*Hagiwara, Nakajima*, 1965, 1966) известно, что одиночные ПД и сокращения изменяются незначительно под влиянием ТТХ, в отличие от нерва и скелетной мышцы, где наблюдается полный блок проведения (Ходоров Б.И., Варновицкий Е.Г. - 1967, *Narahashi, Deguchi, Uzakawa, Ohkubo* - 1960, *Narahashi, Moore, Scott* - 1964, *Narahashi, Anderson, Moore* - 1966). В своих исследованиях мы также отметили, что одиночные ПД и сокращения в растворе с ТТХ изменяются мало, но при ритмической стимуляции подавляется и электрическая, и сократительная активность. Вывод о низкой чувствительности миокарда к ТТХ представляется несколько удивительным, поскольку ряд исследований свидетельствует о существовании в мембране клеток миокарда быстрых натриевых каналов (*Besseau, Gargouil* - 1969, *Rudel, Pepeg, Rudel, Trautwein* 1966, *Giebisch, Weidmann* - 1971, *Haas, Kegn, Einwachter* 1970, *Ochi* - 1970, *Reuter* - 1967, 1968) (по свойствам аналогичных классическим натриевым каналам в аксоне кальмара.

Слабый эффект ТТХ на одиночные ПД и сокращения, по-видимому, объясняется тем, что медленный натрий-кальциевый канал достаточно эффективно компенсирует выключение быстрого канала, что и создает впечатление о слабой эффективности действия ТТХ. Однако, уже сравнительно редкая стимуляция выявляет недостаточность функционирования на фоне ТТХ только одних медленных натрий-кальциевых каналов и свидетельствует о том, что в клетках миокарда для нормальной их де-

тельности необходимо взаимодействие обоих каналов (быстрых и медленных). Вероятно, взаимодействие между быстрым и медленным каналами необходимо для обеспечения нормальной ритмической активности клеток сердца. Мы полагаем, что изменение параметров ПД в среде с ТТХ является не следствием частичной блокады быстрого натриевого канала, а результатом проявления свойств медленной компоненты при ингибировании быстрой. Независимое существование медленного канала выявлено при изучении становления электрогенеза в процессе амбионального развития миокарда. На первых неделях онтогенеза ПД практически не чувствительны к ТТХ, а в последующем все более и более подавляются им (*Bezard, Gargouil* - 1970). Подтверждением, что в растворе с ТТХ ПД обусловлены деятельностью только медленного канала является тот факт, что ПД в растворе с ТТХ возникают только при действии сильных, а главное, достаточно длительных стимулов, что является свойством медленных каналов (*Rougier, Vassort, Gagnier, Gargouil, Coraboeuf* - 1963), (*Rougier, Vassort, Stämpfle* 1968, *Matsubara, Matsuda* - 1969, *Perez, Trautwein* - 1968). Вероятно, регенеративный быстрый канал выполняет роль триггера медленного. Определенную роль в активации медленного канала играют и ионы натрия, входящие по быстрому каналу.

Основным результатом рассмотренных экспериментов было подавление амплитуды и длительности ПД, а также амплитуды сокращений в растворе с ТТХ, возрастающее с ростом частоты стимуляции. Каков механизм этого явления? Первое, о чем можно было думать - это о нарушении баланса между входом

внутри клеток миокарда ионов натрия и кальция. При блоке быстрого натриевого канала накопление ионов кальция у внутренней поверхности мембраны могло бы объяснить падение амплитуды ПД и его длительности в ритмическом ряду, если исходить из гипотезы, что длительность фазы плато ПД обратно пропорциональна концентрации кальция в специфических участках мембраны (*Brady* - 1964). С этим могут быть сопоставлены факты, полученные на мышце *Balanus* с помощью микроинъекций кальция. Показано, что ПД не возникает при концентрации внутриклеточного кальция выше 2×10^{-6} мм (*Hagiwara, Nakajima* - 1966). Однако, против увеличения кумуляции кальция в клетках в растворе с ТТХ по сравнению с нормой в условиях ритмической стимуляции свидетельствует уменьшение или неизменность (но не увеличение) кальциевой проницаемости миокардиальных мембран под влиянием ТТХ (*Beeler, Reuter* - 1970). Кроме того, при повышенном входе кальция должно наблюдаться увеличение амплитуды сокращений или контрактура, тогда как в растворе с ТТХ сократимость неуклонно падает.

Более вероятным объяснением механизма действия ТТХ представляется предположение о конкурирующем взаимодействии ионов натрия и кальция не только на внешней (*Lüttgen, Niedergerke* - 1958), но и на внутренней стороне марколеммальной мембраны. С учетом кальций-поглощающей емкости мембраны, т.е. ее свойств как катионообменной системы (*Carvalho* - 1966), зависящей от потенциала и содержания

ионов натрия у внутренней ее поверхности) ингибирующее действие ТТХ на ПД и сокращения может быть объяснено следующим образом. При ритмической стимуляции в нормальном растворе, входящий при возбуждении кальций идет в кальциевый пул у внутренней поверхности мембраны, и к миофиламентам. Одновременно деполяризация будет высвобождать определенное количество кальция из участков связи в мембране. С уменьшением поступления ионов натрия во время возбуждения под влиянием ТТХ сокращения упадут за счет меньшей доли кальция, переходящего из внешнего раствора к миофиламентам, ибо при дефиците натрия большее количество кальция связывается с мембраной (происходит как бы увеличение кальцийсобирающей емкости мембраны). Кроме того, сокращения могут упасть за счет увеличения силы связи кальция с мембраной из-за недостатка натрия у внутренней ее поверхности, вследствие чего меньше кальция высвобождается из мест связывания в мембране под влиянием деполяризации. Приведенные соображения объясняют слабую эффективность деполяризующих толчков тока на сократимость, несмотря на удлинение фазы плато ПД, и более раннее падение сокращений по сравнению с ПД в начальной фазе действия ТТХ. Дефицит натрия при последовательном поступлении кальция в ритмическом ряду (а главное, более прочное связывание кальция из-за недостатка натрия) приводит к накоплению кальция в кальциевом примембранном депо, к падению возбудимости и подавлению ПД. Изменения выражены тем больше, чем выше частота сердцебиений, и чем больше предшествующих волн возбуждения на данной частоте имело место. Прогрессирующее падение сокращений при ритмическом раздра-

жении связано, в дополнение к сказанному ранее, с ингибированием ПД. Уменьшение абсолютной величины нормированной потенциации в растворе с ТТХ в рамках ранее высказанной модели свидетельствует о меньшем поступлении натрия при возбуждении (Орлов Р.С., Изяков В.Я., Шевелев В.М. - 1971). Нези-
менность β означает, что ТТХ не влияет на скорость работы натриевого насоса, что согласуется с литературными данными (Као - 1967).

Восстанавливающее действие адреналина в растворе с ТТХ довольно сложно для интерпретации. Мало вероятно, чтобы адреналин был прямым антагонистом ТТХ в быстром канале и снимал тетродотоксиновую пробку. Возможно, что адреналин тем или иным образом увеличивает концентрацию натрия внутри клетки, либо увеличивая его поступление по медленным кальций-натриевым каналам во время возбуждения, либо за счет замедления скорости работы натриевого насоса. Увеличение концентрации натрия вблизи мест связывания кальция увеличивает вклад входящего кальция в сокращение и несколько повышает эффективность высвобождения кальция из мест связывания под влиянием деполяризации. Возможно, что адреналин прямо влияет на сорбционную емкость мембраны, уменьшая ее. Уменьшение количества кальция в мембране повышает возбудимость и восстанавливает ПД. Строфантин не обладает таким действием, поскольку он одновременно увеличивает внутри клетки и концентрацию натрия, и кальция,

Таким образом, изложенные данные свидетельствуют о важности внутриклеточных ионов, особенно у внутренней поверхности мембраны в регуляции электрической и механической актив-

ности ритмически работающего сердца.

ГЛАВА УП

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ СОКРАЩЕНИЙ РИТМИЧЕСКИ РАБОТАЮЩЕГО МИОКАРДА

Самая трудная задача исследователя — отобрать наиболее рациональные варианты объяснений того или иного явления. Чтобы найти оптимальное решение, необходимо рассмотреть несколько различных вариантов. При рассмотрении вариантов для лучшего их изучения и понимания прибегают к помощи моделей. Моделями называют абстрактные понятия о реальных процессах, позволяющие получить правильное представление о важных взаимосвязях реальных явлений и на основе анализа некоторых из них вскрыть характер других возможных явлений или процессов. В этом заключается основная ценность моделирования. Лучшей моделью является не самая сложная и не самая похожая на реальность, а та, которая позволяет проверить допущенные гипотезы и сделать наиболее точные предположения о природе рассматриваемых явлений. Известно, что даже несовершенная модель, с помощью которой нельзя полностью предсказать все возможные исходы явления, уже оказывается полезной, если она исключает то, что не должно произойти.

В настоящее время накоплено значительное количество информации для объяснения отдельных этапов электромеханической связи в клетках миокарда. Однако, построение полной модели электромиофибриллярных взаимоотношений связано с большими трудностями из-за сложности авторегуляторных механизмов как

в самой мембране, так и в саркоплазматическом ретикулуме или его эквивалентах. На современном этапе представляется целесообразным упрощенное формализованное описание отдельных моментов электромеханического сопряжения, т.е. создание математических моделей и их исследование на ЭВМ.

Сейчас твердо установлено, что сокращение связано со взаимодействием ионов кальция с контрактильными белками. Считается, что при возбуждении кальций высвобождается из внутриклеточных мест хранения и одновременно за счет увеличения кальциевой проницаемости происходит увеличенное по сравнению с покоем поступление в клетку ионов кальция из внеклеточной среды. Важную роль в процессах электромеханического сопряжения играют и ионы натрия. Как следует из приведенных исследований, они могут способствовать высвобождению ионов кальция внутри клетки за счет конкуренции с ним в некоторых участках. Не исключено, что элементы кальций-натриевой конкуренции существуют и на уровне миофибрилл. Особенно важную роль выполняют ионы натрия и кальция при ритмической деятельности миокарда. Исследование хроноинотропных феноменов показало, что после возбуждения в миокардиальной клетке существуют следовые эффекты, проявляющиеся во влиянии предшествующей электрической и механической активности на последующие сокращения. Эти следовые эффекты проявляются в уменьшении длительности ПД при увеличении частоты сердцебиений, а в сфере контрактильного аппарата миокарда желудочка лягушки в потенциации сокращений. Было показано также, что при ритмической деятельности миокарда происходит последовательное сложение следовых эффектов, связанных

с одиночным возбуждением (Орлов Р.С., Изаков В.Я., Шевелев В.М. - 1971). Нами постулировано, что следовые эффекты в миокарде связаны с остаточными концентрациями ионов натрия и кальция, которые проявляют себя при последующей активности.

Изложенные данные позволяют предложить формализованное описание сердечных сокращений ритмичности работающего миокарда. В данной главе представлены результаты исследований математической модели электромеханической связи в клетках миокарда желудочка лягушки на аналоговой (МН-10М) и цифровой (ЦВМ М-20) машинах.

1. Основные положения модели.

В модель заложены следующие основные положения:

1) заброс ионизированного натрия $\beta(t)$ задается почти ступенчатой функцией, длительность которой не изменяется, поскольку основное количество натрия входит в клетку во время регенеративной деполяризации;

2) заброс и/или высвобождение ионизированного кальция $\alpha(t)$ задается почти ступенчатой функцией, длительность которой зависит от внутриклеточной концентрации натрия и кальция. Источники ионизированного кальция не конкретизируются;

3) величина сокращений прямо связана с числом комплексов CaM в миофиламентах, где M - рецептор, связывающий кальций;

4) кальций и натрий после возбуждения выводятся из поля реакции (с константами K_3 - для кальция и K_6 - для нат-

рия);

5) увеличение внутриклеточной концентрации натрия увеличивает количество кальция, поступающего в клетку при последующем возбуждении;

6) в модель заложена также конкуренция ионов натрия с кальцием за места связывания на уровне миофиламентов. Конкуренция идет по типу 2 иона натрия на один ион кальция. Реакция кальций-рецептор и натрий-рецептор являются обратимыми.

В основе предлагаемой упрощенной модели лежит открытая химическая реакция, схема которой представлена на рис.53.

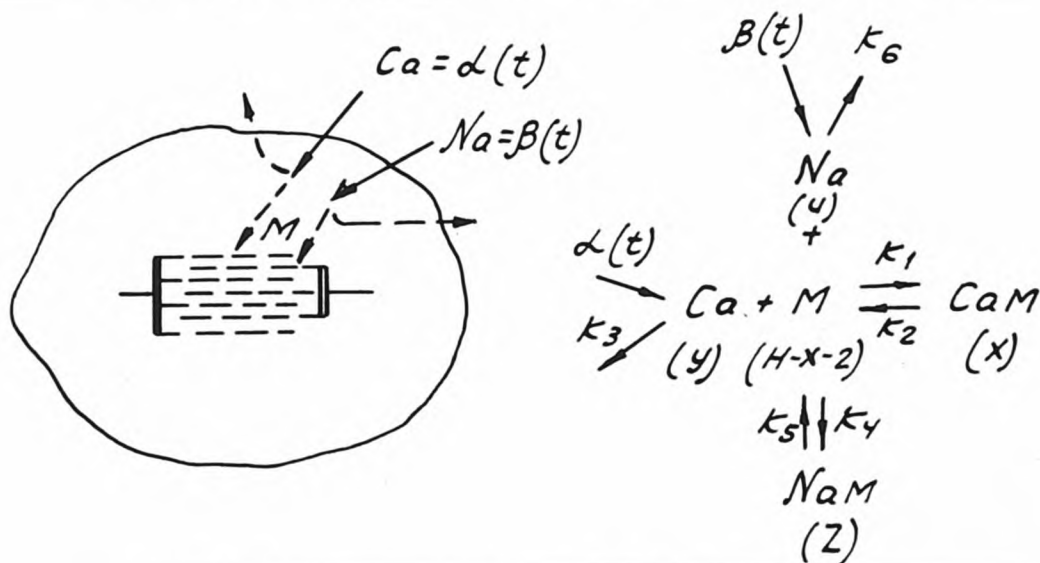


Рис.53. Схема основной химической реакции.

Она описывается следующей системой дифференциальных уравнений:

$$\frac{dx}{dt} = k_1 (H - x - z) y - k_2 x$$

$$\frac{dy}{dt} = \kappa_2 x - \kappa_1 (H - x - z) y - \kappa_3 y + \alpha(t)$$

$$\frac{dz}{dt} = \kappa_4 (H - x - z) y^2 - \kappa_5 z$$

$$\frac{du}{dt} = \kappa_5 z - \kappa_4 (H - x - z) u^2 - \kappa_6 u + \beta(t)$$

$$\alpha(t) = \begin{cases} \kappa_7 (1 - e^{-c_1 t}) & \text{при } t \leq T_1 \\ \kappa_7 e^{-c_1 t} & \text{при } t > T_1 \end{cases}$$

$$T_1 = \kappa_9 - \kappa_{10} y(t') - \kappa_{11} u(t')$$

$$\kappa_7 = \kappa_{12} + \kappa_{13} u(t')$$

$$t' = T_{(n-1)} \left| \begin{array}{l} T - \text{период импульсов раздражения} \\ n - \text{номер импульса} \end{array} \right.$$

$$\beta(t) = \begin{cases} \kappa_8 (1 - e^{-c_2 t}) & \text{при } t \leq T_2 \\ \kappa_8 e^{-c_2 t} & \text{при } t > T_2 \end{cases}$$

где:

- x - количество рецепторов, связанных с кальцием;
- y - количество свободного кальция;
- z - количество рецептора, связанного с натрием;
- y_0 - пороговая концентрация кальция по достижении которой развивается сокращение;
- H - общее количество рецептора;
- κ_1 - скорость образования комплекса CaM ;
- κ_2 - скорость распада комплекса CaM ;
- κ_3 - скорость реабсорбции свободных ионов кальция при-

мембранным рецептором R^{--} и/или скорость выброса его активным транспортом из миоплазмы наружу;

K_4, K_5 - соответственно скорость образования и распада комплекса NqM ;

K_6 - скорость выбрасывания натрия активным транспортом наружу;

K_7 - скорость работы кальциевого канала;

K_{12} - начальная скорость работы кальциевого канала;

K_{13} - коэффициент зависимости входа кальция от концентрации натрия в миоплазме;

K_8 - скорость входа натрия в клетку;

T_1 - длительность работы кальциевого канала (длительность ПД);

K_{10}, K_{11} - соответственно коэффициенты зависимости времени работы кальциевого канала от примембранной концентрации кальция и натрия;

C_1, C_2 - соответственно постоянные нарастания и спада функций $\alpha(t)$ $\beta(t)$;

t' - момент нанесения раздражения при периодической стимуляции;

T_2 - длительность натриевого заброса.

Блок-схема модели ритмического миокарда, набранная на аналоговой машине, представлена на рис.54.

Импульс от стимуляции подавался на вход блока 7-1 для выработки входной функции $\beta(t)$. Этот же импульс запускает ждущий мультивибратор, длительность импульса которого линейно зависит от некоторого напряжения, подаваемого с блока 7-2, работающего в режиме суммирования. Это напряжение является функцией $K_9 - K_{10} y(t) - K_{11} u(t)$. Зависимость

от напряжения для упрощения взята линейной.

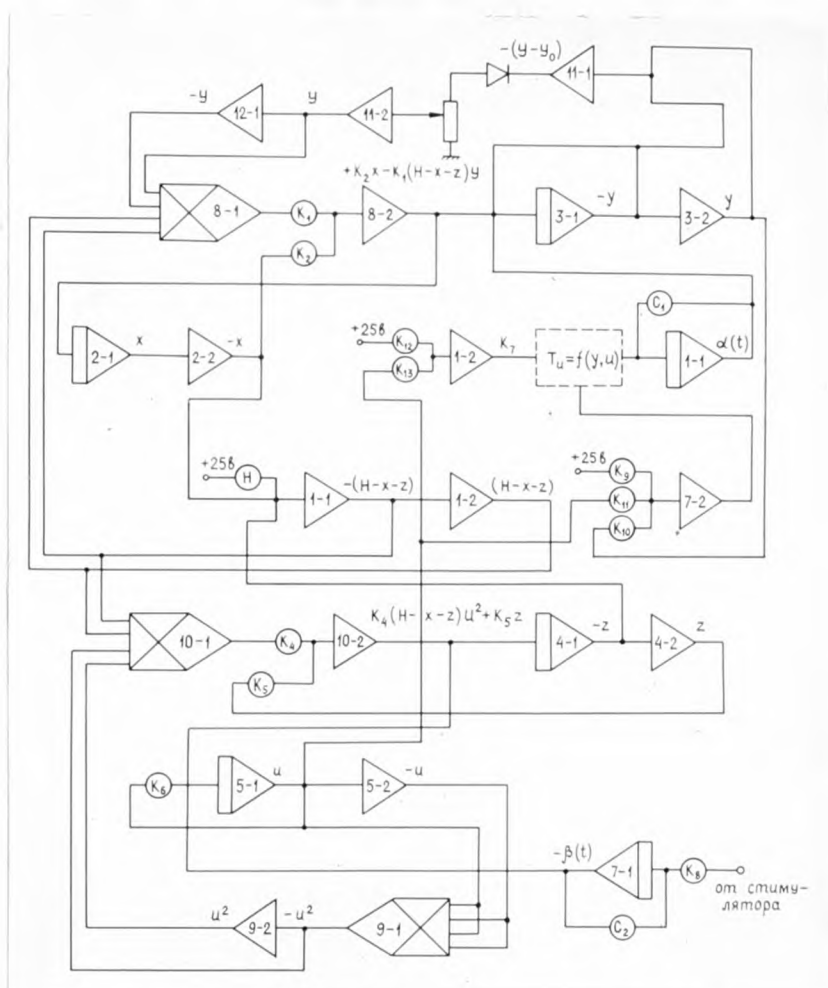


Рис.54. Блок-схема модели ритмически работающего миокарда.

Значения $y(t'')$, $u(t'')$ берутся на момент развития очередного сокращения в точках $t' = T(n-1)$, где $n = 1, 2, 3, \dots$ (номер сокращений). Данная система уравнений должна быть решена при условии, что $X=0$, когда $y \leq y_0$ и $x > 0$, когда $y > y_0$. Где y_0 - некоторая пороговая концентрация кальция, при которой развивается сокращение. Нашей задачей

являлось отыскание таких коэффициентов $K_1, K_2, \dots, K_{13}, H, C_1, C_2$ и T_2 , при которых решение данной системы дифференциальных уравнений наилучшим образом описывает экспериментальные данные по исследованию сокращений ритмически работающего миокарда.

2. Оптимизация параметров и решение системы дифференциальных уравнений на ЦВМ М-20

Поскольку решение полной системы уравнений и подбор всех неизвестных коэффициентов является процессом достаточно трудоемким, вначале на ЦВМ проверялась адекватность аппроксимации заданными уравнениями кривой одиночного сокращения и подбор оптимальных коэффициентов. Коэффициенты редуцированной системы уравнений, т.е. без учета влияния предшествующей активности $\beta(t), z(t), u(t)=0$ определялись так, чтобы функционал, определяемый через расхождение между опытными и теоретическими данными, был минимальным. Иными словами, искомое решение системы, обеспечивающее:

$$\min \{F(\kappa) = \sqrt{\sum_{j=1}^m [\chi(t_j, \kappa) - \chi_p(t_j)]^2}\} = F(\kappa^0)$$

где

$\chi_p(t)$ - функция, заданная таблично при $t=t_j=t_{j-1}+\Delta t$
 $\chi = f_1(t, \chi, y, \kappa); \quad y = f_2(t, \chi, y, \kappa)$ с начальными данными $y(0, \kappa)=0; \chi(0, \kappa)=0; t \in [0, T], \text{ а } \kappa = \kappa \{ \kappa_1, \kappa_2, \kappa_3, H, C_1, y_0 \}$
 и задается следующим образом:

$$f_2' = \begin{cases} \kappa_2 x - \kappa_3 y - \kappa_1 (H-x)/(y-y_0) + \alpha(t) & \text{если } y > y_0 \\ \kappa_2 x - \kappa_3 y + \alpha(t) & \text{если } y < y_0 \end{cases}$$

$$\alpha(t) = \begin{cases} \kappa_1 (1 - e^{-c_1 t}) & \text{при } t \leq T_1 \\ \kappa_1 e^{-c_1 t} & t > T_1 \end{cases}$$

где

T_1 — длительность импульса заброса кальция (отвечает коэффициенту K_9 в полном уравнении для T_1),

Для определения оптимальной комбинации коэффициентов (минимизация функции $F(K)$ приведенной системы уравнений) был применен метод случайного поиска (Растрингин Л.А. — 1969). Сущность метода заключается в том, что точка K (некоторый набор отыскиваемых коэффициентов) n -мерного пространства является исходной и берется произвольно. Из точки K , как из центра, проводится гипербсфера радиуса h . На ней выбираются m случайных точек K_j и вычисляется значение функции $F(K_j)$ в каждой точке $j = 1, 2, \dots$. Пусть $F(K_0) = \min \{F(K_j)\}$. Тогда направление первого рабочего шага определяется по наилучшей из этих " m " проб вектором

$$\vec{W}_1 = \frac{\vec{K}_0 - \vec{K}}{|\vec{K}_0 - \vec{K}|}$$

Вдоль этого направления находится новая точка

$$K' = K + \frac{\vec{K}_0 - \vec{K}}{|\vec{K}_0 - \vec{K}|} h$$

Из точки K^i строится n -мерный конус в направлении W_i и следующие " m " случайных точек выбираются в конусе. Далее направление i -го рабочего шага определяется вектором

$$W_i = \frac{\vec{K}_o^i - \vec{K}_o^{i-1}}{|\vec{K}_o^i - \vec{K}_o^{i-1}|}$$

где $F(K_o^i) = \min F(K_j^i)$; i - номер конуса; $j = 1, 2, \dots, m$. Следовательно, каждый конус определяет точку K_o^i наилучшую из m случайных точек K_j^i , взятых в этом конусе.

Таким образом, находится последовательность точек ($i = 1, 2, \dots, \ell$), из которой выбирается точка K^* , дающая наименьшее значение функции $F(K)$. Выбор величин числа проб в конусе m , пробного шага h , угла раскрытия конуса 2φ , а также шага интегрирования системы дифференциальных уравнений определялись стремлением получить наибольшую точность и соображениями экономии использования дорогостоящего машинного времени. Блок-схема программы приведена на рис. 55.

Программа была составлена для ЦВМ М-20. Для решения системы дифференциальных уравнений была использована стандартная подпрограмма решения дифференциальных уравнений по методу Рунге-Кутты (СП-0045 в системе ИС-2 ЭЦВМ М-20).

При каждом фиксированном значении точки

$K = \{K_1, K_2, \dots, K_7, H, K_{13}, c, y_0\} \in Q$ находилось решение

$$y_i = f_i(t_0, y_1, y_2, \dots, y_5) \quad i = 1, 2, \dots, n$$

с начальным условием

$$y_i(t_0) = y_{i0}$$

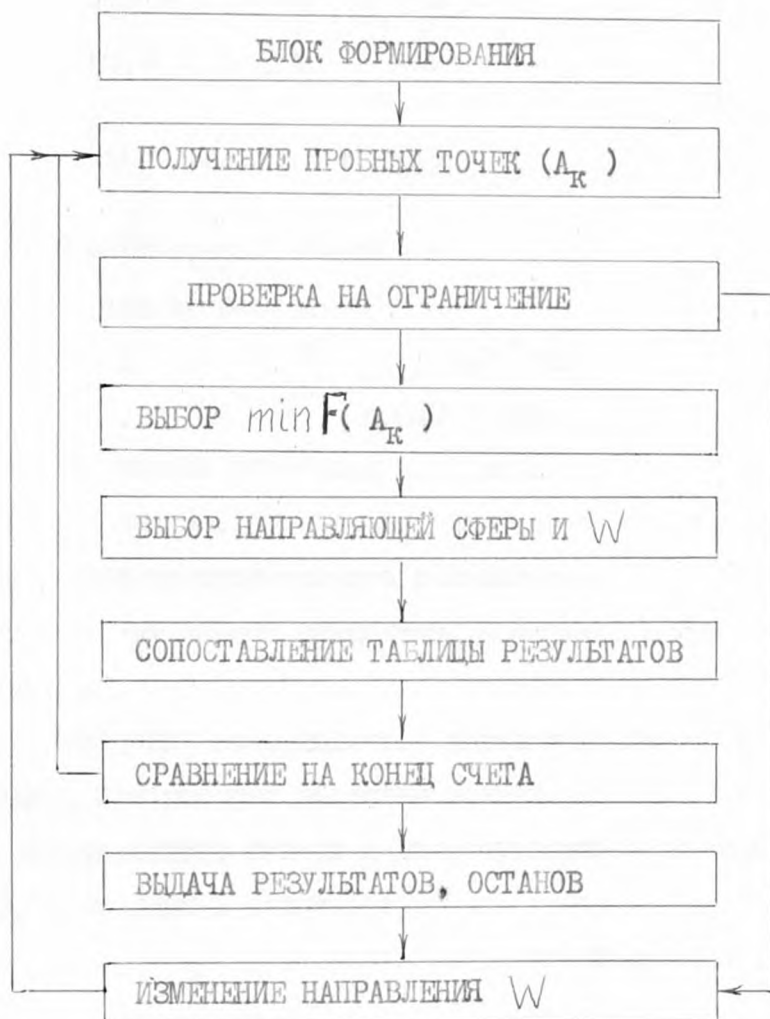


Рис. 55. Блок-схема программы нахождения глобального экстремума функции многих переменных.

По формулам Рунге-Кутты:

$$y_i(t_0 + h) = y_i(t_0) + \frac{h}{6} K_{1i} + \frac{h}{3} K_{2i} + \frac{h}{3} K_{3i} + \frac{h}{6} K_{4i},$$

где

$$\begin{aligned} \kappa_{1i} &= f_i(t_0, y_{10}, \dots, y_{n0}) \\ \kappa_{2i} &= f_i(t_0 + \frac{h}{2}, y_{10} + \frac{h}{2}\kappa_{1i}, \dots, y_{n0} + \frac{h}{2}\kappa_{1n}) \\ \kappa_{3i} &= f_i(t_0 + \frac{h}{2}, y_{10} + \frac{h}{2}\kappa_{2i}, \dots, y_{n0} + \frac{h}{2}\kappa_{2n}) \\ \kappa_{4i} &= f_i(t_0 + h, y_{10} + h\kappa_{3i}, \dots, y_{n0} + h\kappa_{3n}) \end{aligned}$$

с автоматическим выбором шага.

В данной задаче

$$\begin{aligned} t &\in [0, 2] \text{ сек} \\ h &= 0,001 \text{ сек.} \end{aligned}$$

Сравнение расчетных и экспериментальных данных представлено на рис. 56. Параллельно дано изменение во времени концентрации ионизированного кальция — кривая 3. Видно в общем удовлетворительное совпадение расчетных и экспериментальных данных.

Значения коэффициентов системы дифференциальных уравнений, при которых получены приведенные кривые изменения контрактильного ответа и ионизированного кальция во времени, приведены в таблице I.

Т а б л и ц а I

κ_1	κ_2	κ_3	κ_4	H	C_1	y_0	F_{min}
0,3	8	6	677	140	18	24	17,9
сек ⁻¹	сек ⁻¹	$\epsilon_1 = 0,001$ ошибка отсчета по Рунге-Кутты					

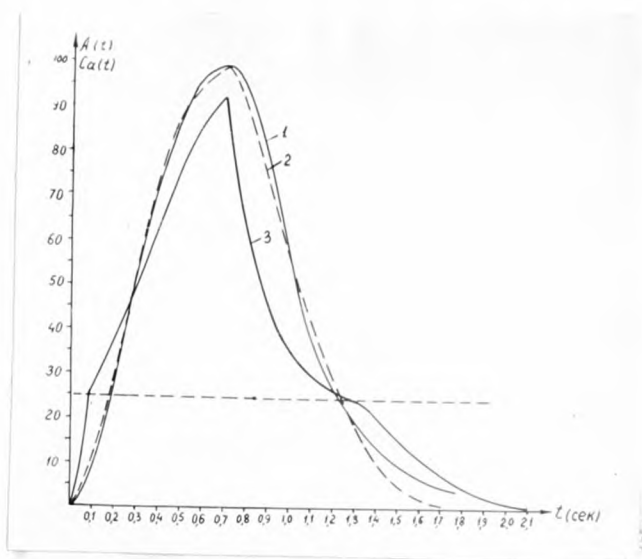


Рис.56. Сравнение опытных (кривая 1) и вычисленных на ЦВМ (кривая 2) кривых одиночных сокращений (кривая 3 - $Ca(t)$), пунктирная прямая параллельная оси - абсцисс-порог по кальцию).

3. Исследование математической модели на ЦВМ М-20

После того, как были найдены оптимальные значения коэффициентов, было проведено исследование влияния отклонений коэффициентов от своих оптимальных значений на параметры сокращений $x(t)$ и поведение свободной концентрации ионов кальция $y(t)$

На рис.57 приведены кривые сокращений при вариации коэффициента K_I , отражающего соединение ионов кальция с контрактильным рецептором.

Видно, что изменение коэффициента K_I оказывает существенное влияние на амплитуду и временной ход сердечных сокращений. Вид функции $A_{\max} = f(K_I)$ дан на рис.58. Из рис.57 следует, что увеличению силы сокращений при возрастании K_I со-

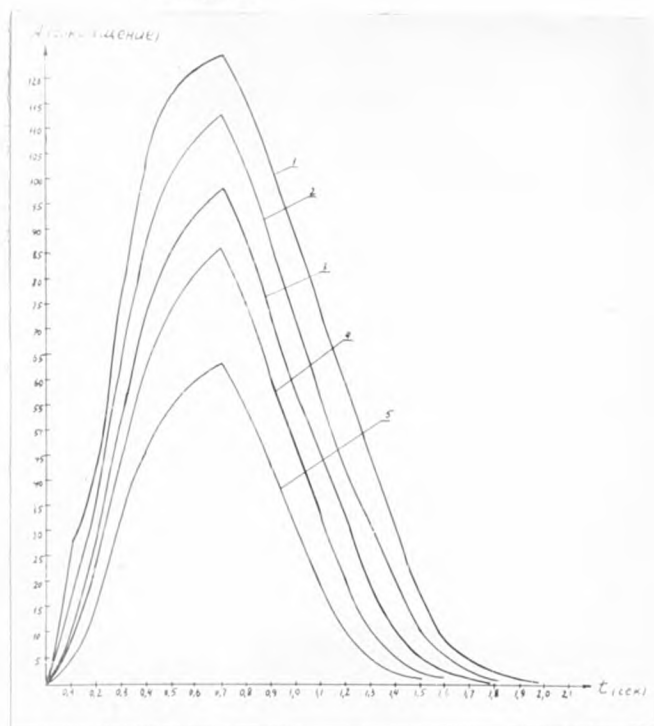


Рис.57. Влияние вариаций коэффициента K_I на параметры сокращений.

1. $K_I = 1,0$; 2. $K_I = 0,5$; 3. $K_I = 0,3$; 4. $K_I = 0,2$;
5. $K_I = 0,1$.

Остальные значения коэффициентов представлены в таблице.

путствует увеличение общей длительности сокращений, причем увеличение длительности идет за счет второй фазы сокращений. Кроме того, скорость укорочения зависит от K_I , тогда как скорость расслабления мало чувствительна к вариациям коэффициента K_I .

Из рис.59, который показывает зависимость $y(t)$ от коэффициента K_I , следует, что динамика кальция в клетке во время сокращения мало чувствительна к вариациям K_I , также как и максимальная концентрация свободного кальция. Однако, остаточная концентрация кальция ($y(t)$ после того, как сокращения

падают до нуля) тем больше, чем выше значение коэффициента K_I . Таким образом, от константы скорости образования комплекса Ca^{+} сократительный белок должны зависеть следовые явления, которые могут проявиться при последующих сокращениях.

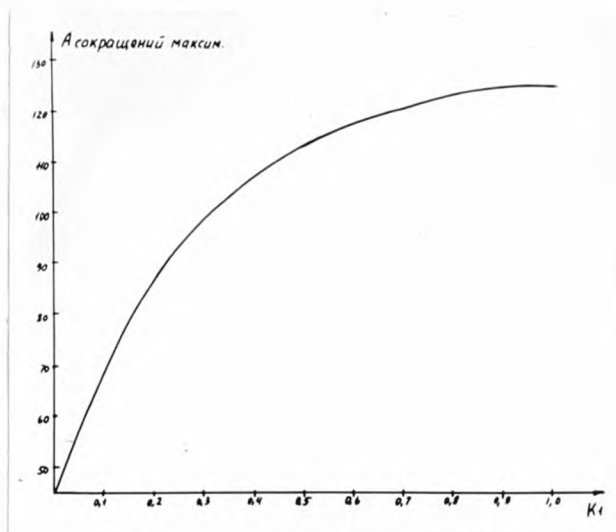


Рис. 58. Зависимость максимальной амплитуды сердечных сокращений от коэффициента K_I .

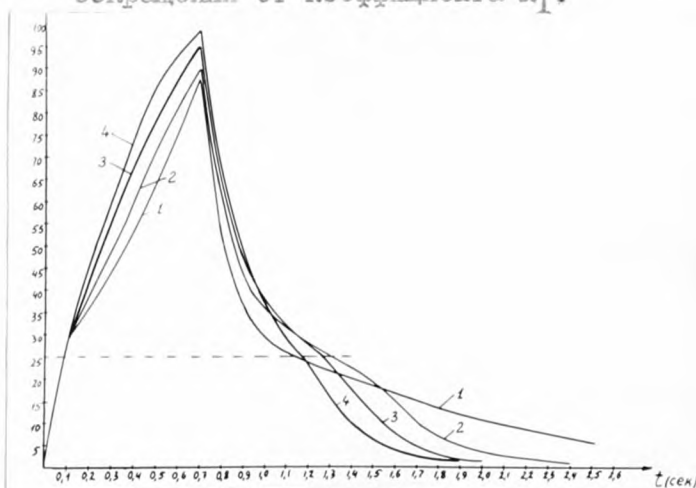


Рис. 59. Функция $y(t)$ при разных значениях коэффициента K_I .

1. $K_I = 0,3$; 2. $K_I = 0,1$; 3. $K_I = 0,5$; 4. $K_I = 1,0$.

Увеличение коэффициента K_2 оказывает противоположное действие на максимальную амплитуду сокращений. По мере его увеличения $A_{\text{макс.}}$ падает.

На рис.60 представлены кривые "сокращений" $\chi(t)$ при разных значениях K_2 . В отличие от K_1 , коэффициент K_2 , характеризующий распад комплекса CaM, относительно меньше влияет на максимальную амплитуду сокращений, но значительно сказывается на их расслаблении. С уменьшением K_2 расслабление сильно затягивается. Однако увеличение K_2 (скажем в 2 раза, с 12 до 24) мало меняет параметры сокращения.

На рис.61 представлены функции $\chi(t)$ при вариации коэффициента K_3 , который характеризует отток ионов кальция из клетки. Видно, что уменьшение K_3 резко замедляет ход расслабления, с другой стороны, увеличение коэффициента K_3 в 4 раза по сравнению с "оптимальным" значением лишь слегка изменяет параметры сокращений.

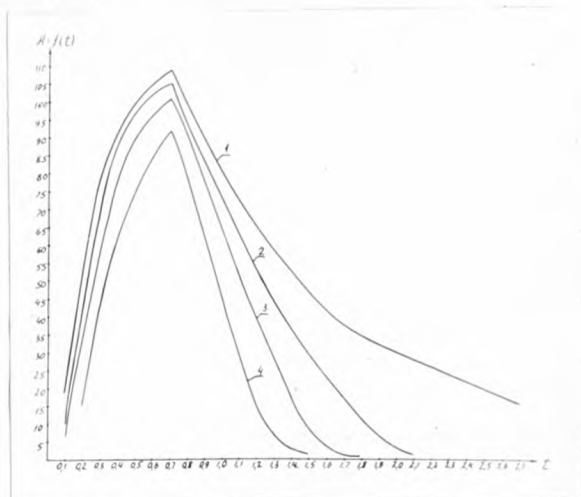


Рис.60.

Кривые "сокращений" $\chi(t)$ при разных значениях коэффициента распада комплекса CaM.

1. $K_2 = 2$; 2. $K_2 = 4$; 3. $K_2 = 6$; 4. $K_2 = 12$.

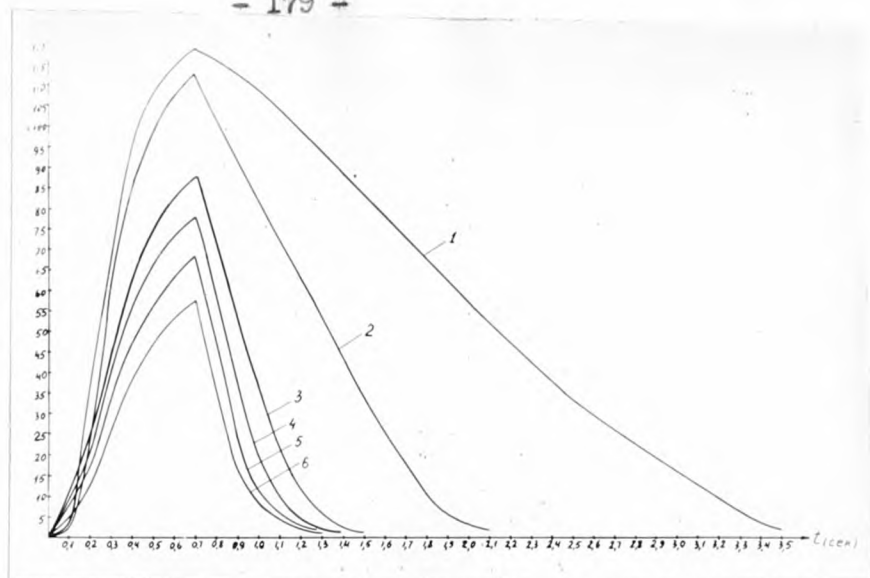


Рис.61. Влияние коэффициента K_3 на ход сокращения сердечной мышцы.

1. $K_3 = 2$; 2. $K_3 = 4$; 3. $K_3 = 6$; 4. $K_3 = 12$;
5. $K_3 = 16$; 6. $K_3 = 24$.

Несколько иным образом ведет себя функция $y(t)$ при вариациях коэффициента K_3 . Во всяком случае из рис.62 следует, что уменьшение K_3 резко увеличивает остаточную концентрацию кальция, когда сокращение уже отсутствует.

Наиболее интересным является выяснение влияния параметра N модели на характеристики сокращения, поскольку ранее предполагалось, что растяжение увеличивает число свободных мест, доступных для связывания с кальцием. На рис.63 даны функции $\chi(t)$ при разных значениях N .

Следует обратить внимание на следующее:

- 1) с увеличением N максимальная амплитуда сокращений растет, что совпадает с экспериментом (эффект Старлинга);
- 2) увеличение N вызывает значительное удлинение сокращений в том числе и фазы расслабления. Это также согласуется с тем, что обычно наблюдается при действии растяжения;

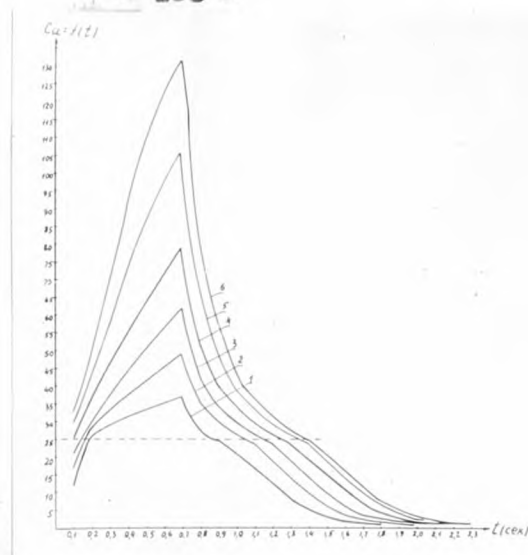


Рис.62. Зависимость $y(t)$ от коэффициента K_3 .

Пунктирная линия - пороговая концентрация кальция.

1. $K_3 = 2$; 2. $K_3 = 4$; 3. $K_3 = 16$; 4. $K_3 = 19$.

3) скорость расслабления мало зависит от значений параметров H ;

4) скорость укорочения растет с увеличением H .

Кроме того, вид функции связи максимальной амплитуды сокращений с величиной H (рис.64) также напоминает вид функции связи максимальной амплитуды сокращений со степенью растяжения. Из него следует, что на большом участке сила сокращений как функция от H прямолинейна. При больших значениях H наблюдается замедление скорости роста функции. Связь силы сокращений со степенью растяжения на большом участке также близка к линейной и лишь при больших степенях растяжения наблюдается насыщение. Все это свидетельствует о том, что точкой приложения действия растяжения действительно могут быть сократительные белки.

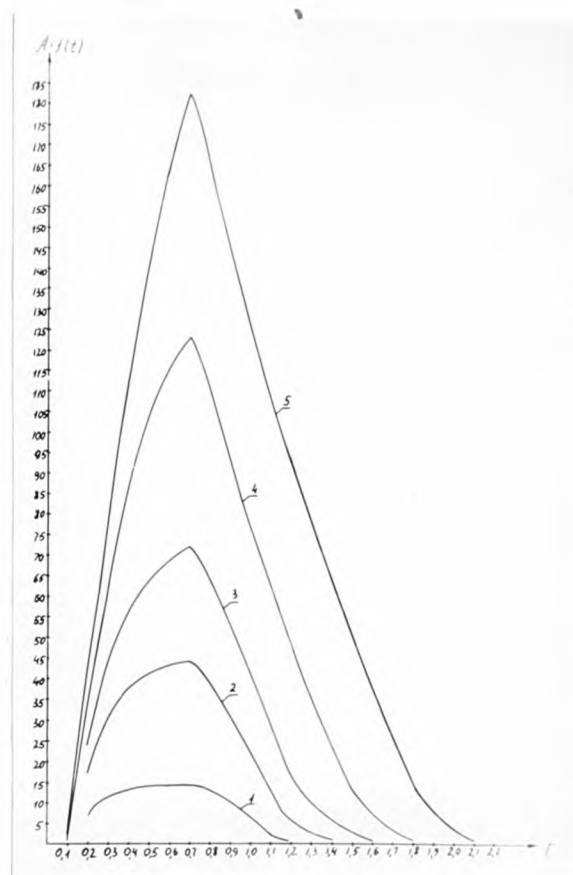


Рис.63. Характер функции $\lambda(t)$ при разных значениях параметра N

1. $N = 20$; 2. $N = 60$; 3. $N = 100$; 4. $N = 180$;
5. $N = 300$.

Интересна зависимость $A_{\text{макс}}^{y(t)}$ от величины N , приведенная на рис.65. Видно, что увеличение N значительно увеличивает остаточную концентрацию кальция, что должно сказаться при последующих сокращениях. Это предполагает, что на больших частотах сердцебиений при больших степенях растяжений могут быть сдвиги в возбудимой системе, поскольку, как нами было показано, остаточная концентрация кальция влияет на параметры проницаемости.

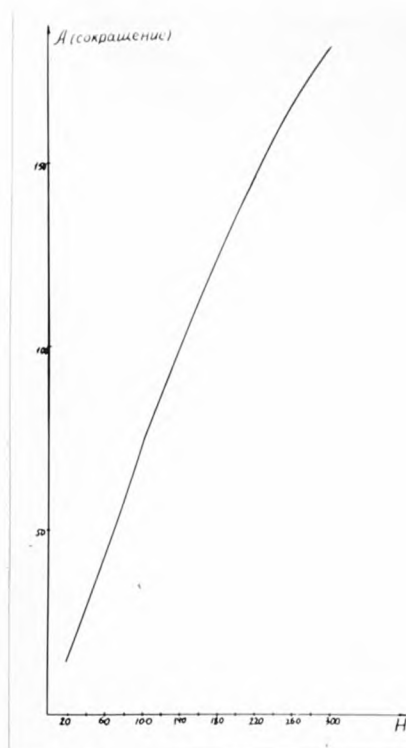


Рис.64. Зависимость максимальной амплитуды сокращений от величины N (количества рецепторов, доступных для связывания с кальцием).

Изменение K_7 также оказывает характерное влияние на $x(t)$ и на $y(t)$. Согласно описываемой модели K_7 — амплитуда кальциевого заброса в клетку при возбуждении. Из рис.66 видно, что увеличение K_7 , как и следовало ожидать, увеличивает силу сокращения и одновременно их длительность, а также скорость укорочения. Из анализа приведенных кривых следует, что латентный период сокращения при уменьшении поступления кальция в клетку уменьшается. Таким образом, можно предположить, что в гипокальциевом растворе и вообще во всех случаях, когда поток ионов кальция в клетку уменьшен (например, гипернатриевый раствор) латентный период сокращений увеличива-

ется. Противоположный вывод следует для гиперкальциевых или гипонатриевых сред. Точно такой же анализ можно провести для некоторых фармакологических веществ.

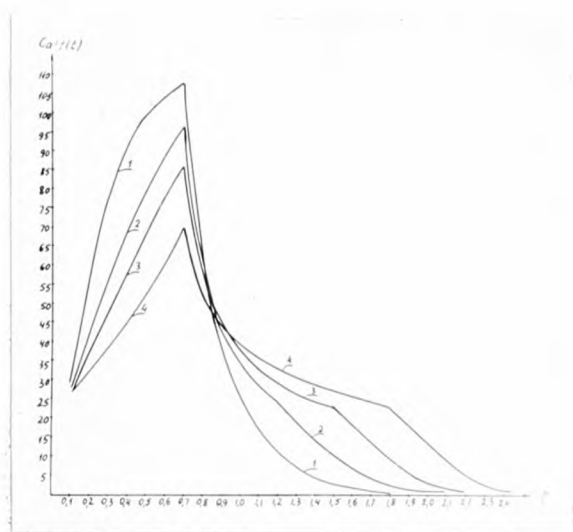


Рис.65. Влияние параметра N на функцию свободной концентрации кальция

1. $N=20$; 2. $N=60$; 3. $N=100$; 4. $N=180$.

Связь максимальной амплитуды сокращений с параметром K_7 приведена на рис.67. Видно, что эта связь S -образна, т.е. при некоторой величине поступления кальция амплитуда сокращений не зависит более от величины поступившего кальция из-за ограниченного количества рецепторов. Подобная зависимость наблюдалась, когда получалась связь амплитуды сокращений с наружной концентрацией ионов кальция. Характерно, что скорость нарастания свободной концентрации кальция зависит от K_7 , что следует из рис.68.

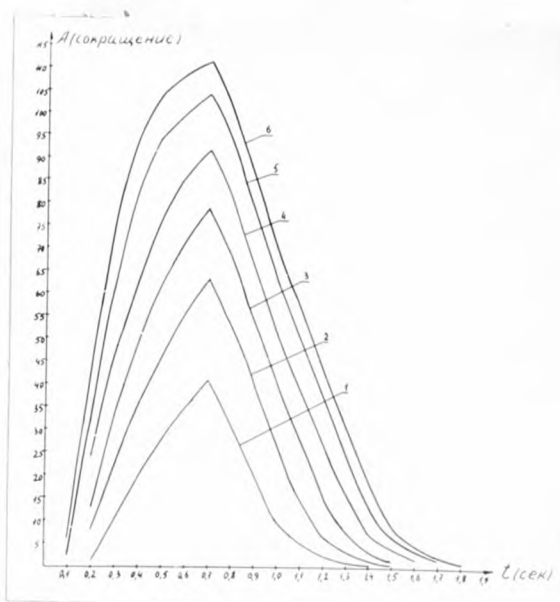


Рис.66. Сокращения $\chi(t)$ при разных значениях K_7 .

1. $K_7 = 300$; 2. $K_7 = 400$; 3. $K_7 = 500$;
4. $K_7 = 600$; 5. $K_7 = 900$.

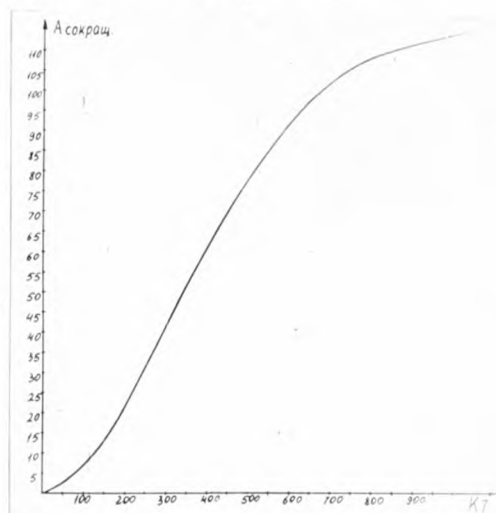


Рис.67. Зависимость амплитуды максимальных сокращений от параметров K_7 .

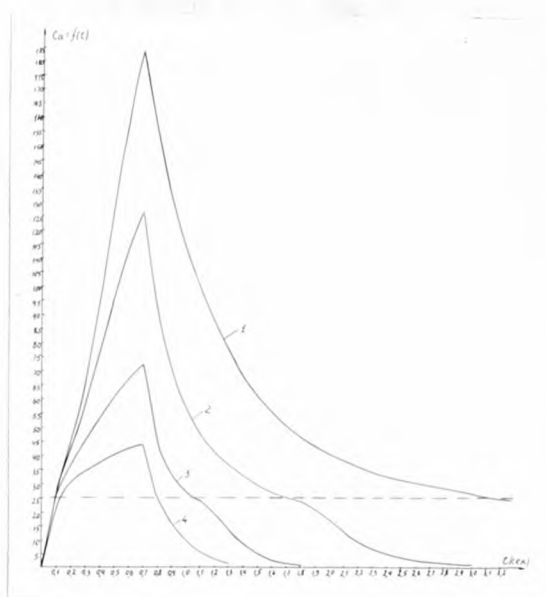


Рис.68. Кривые $y(t)$ при разных значениях коэффициентов K_γ . Пунктирная линия—пороговая концентрация ионов кальция, при которой развивается сокращение.

1. $K_\gamma=300$; 2. $K_\gamma=400$; 3. $K_\gamma=500$; 4. $K_\gamma=600$;
5. $K_\gamma=750$; 6. $K_\gamma=900$.

Из этих данных следует, что следовые эффекты, которые наблюдаются в условиях, когда поступление ионов кальция при возбуждении увеличивается, должны быть выражены больше. Этот вывод хорошо согласуется с результатами по хроноинотропии миокарда в гиперкальциевых и гипонатриевых растворах.

Исследование пороговой концентрации кальция на параметры сокращений $\chi(t)$ показало, что амплитуда сокращений также как и скорость расслабления мало зависит от y_0 . Однако, латентный период сокращений возрастает по мере увеличения y_0 . Исследование влияния этого параметра не представляет боль-

ного интереса, так как неизвестно, может ли меняться кальциевый порог для развития сокращений в клетке и чем он определяется. Сводные данные по изменению коэффициентов системы дифференциальных уравнений на описываемую ими сократимость приведены в табл.2.

4. Исследование модели на аналоговой машине — MN-IOM

После нахождения коэффициентов редуцированной системы дифференциальных уравнений, описывающей поведение одиночных сокращений на моделирующей машине MN-IOM, было проведено исследование хроноинотропии модели миокарда при различных режимах стимуляции. На рис.69 приведена зависимость параметров второго сокращения от интервала между стимулами при некоторых значениях входящих в систему уравнений коэффициентов. Видно, что модель воспроизводит приблизительно ту же зависимость, которая наблюдается в экспериментах на миокарде. Здесь также наблюдается активация сокращений, однако с увеличением интервала между стимулами прирост последующего сокращения падает. На этом же рисунке показано изменение концентрации ионов натрия (верхние кривые справа) и свободных ионов кальция (нижние кривые справа) при вариации времени между раздражающими импульсами. Внизу приведен характер сокращений (нижняя кривая) изменения концентрации натрия (средняя кривая) и кальция (верхняя кривая) при длительной ритмической стимуляции модели миокарда. Видно, что модель удовлетворительно

Т а б л и ц а 2

Влияние отклонений значений коэффициентов от
"оптимальных" на характеристики сокращений

Коэффициент		П а р а м е т р ы				
		максимальная амплитуда сокра- щений	скорость укорочения	скорость расслабления	длительность расслабления	последствие
K_I	↑	увеличивается	увеличивается	мало ме- няется	увеличивается	увеличива- ется
	↓	уменьшается	уменьшается	—"	уменьшается	уменьшается
K_2	↑	уменьшается	немного увеличивает- ся	несколь- ко воз - растает	слегка воз- растает	слегка падает
	↓	увеличивается	слегка пада- ет	резко па- дает	резко пада- ет	возрастает
K_3	↑	уменьшается	уменьшается	мало ме- няется	меняется мало	меняется мало
	↓	увеличивается	увеличивает- ся	резко падает	резко пада- ет	увеличивает- ся
H	↑	увеличивается	увеличивает- ся	мало ме- няется	увеличивает- ся	увеличивает- ся
	↓	уменьшается	уменьшается	—"	уменьшается	уменьшается
K_7	↑	увеличивается	увеличивает- ся	—"	увеличивает- ся	увеличивает- ся
	↓	увеличивается	уменьшается	—"	уменьшается	уменьшается

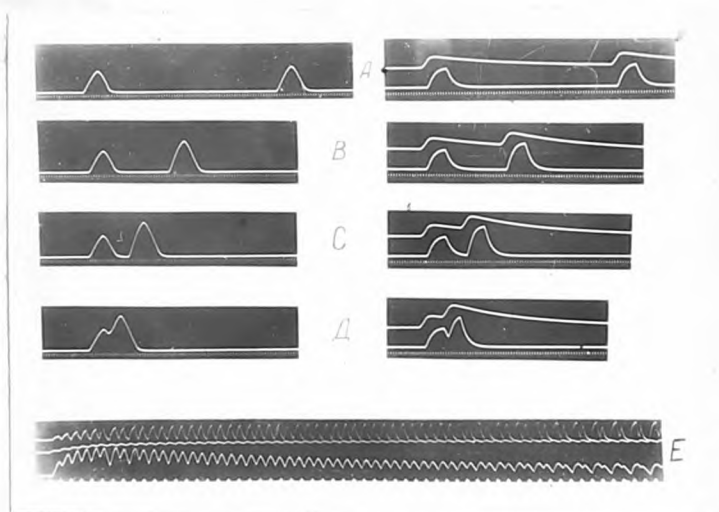


Рис.69. Зависимость параметров $\lambda(t)$, $y(t)$, $u(t)$ второго сокращения от интервала между стимулами.

А - расстояние между стимулами 10 сек, В-4 сек, С - 1,8 сек, Д - 1,2 сек, Е - форма $\lambda(t)$ - нижняя кривая, $u(t)$ - средняя кривая, $y(t)$ - верхняя кривая во время ритмической стимуляции ($T = 0,9$ сек).

воспроизводит хроноинотропию, переходные процессы, альтернацию амплитуды сокращений и другие феномены, известные из экспериментальных данных.

На рис.70 приведены кривые сокращений и одновременно внутриклеточная концентрация кальция и натрия при разных частотах стимуляции. Из рисунка следует, что как и в экспериментальных данных, при повышении частоты стимуляции на модели сначала наблюдается увеличение амплитуды сокращений, а затем развивается инактивация сокращений. При еще большем увеличении частоты стимуляции появляется альтернация сокращений, которая постепенно приводит к трансформации ритма

сердцебиений.

Из приведенных данных видно, что активация сокращений при повышении частоты стимуляции сопровождается значительным накоплением в клетке большего количества ионов натрия. Это объясняется тем, что скорость выброса натрия из клетки недостаточно велика, чтобы выбросить весь натрий, вошедший при возбуждении к моменту очередного раздражения.

Исследование модели при вариациях входящих в систему дифференциальных уравнений коэффициентов показало, что параметры различных хроноинотропных феноменов (степень и скорость активации сокращений, инаktivация сокращений, частота стимуляции, на которой возникают альтернации и др.) могут быть значительно изменены. Если изменение коэффициентов K_1 , K_2 , а также коэффициентов K_{12} , C_1 и C_2 сказывается в основном на форму одиночных сокращений, то вариация коэффициентов K_3 , K_5 , K_4 , K_6 , K_9 , K_{10} и K_{11} , K_{13} значительно изменяет ход огибающих сокращений при ритмической стимуляции, в том числе и при изменении частоты раздражений. Исследование влияния K_1 на функции $\chi(t)$, $y(t)$, $z(t)$ показало, что уменьшение K_1 вызывает уменьшение амплитуды $\chi(t)$, значительно влияя на $y(t)$ и $z(t)$. Увеличение K_1 оказывает противоположное действие на $\chi(t)$. Однако, зависимость максимальной амплитуды $\chi(t)$ от частоты стимуляции и от предшествующей активности при вариациях K_1 не изменяется. Аналогичные выводы в отношении хроноинотропии можно сделать для коэффициента K_2 . Разница состоит лишь в том, что уменьшение K_2 увеличивает амплитуду сокращений, а увеличение K_2 , наоборот, приводит к снижению максимальных значений $\chi(t)$.

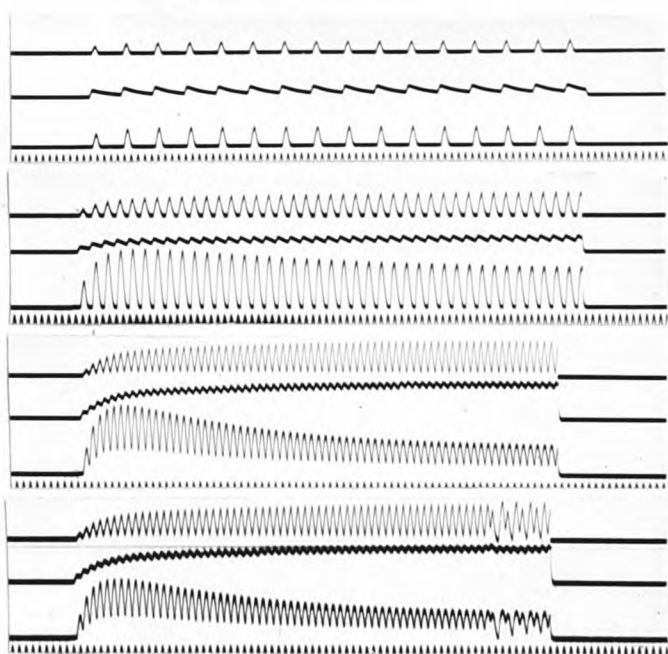


Рис. 70. Сокращения (нижние кривые) концентрация свободного натрия (средние кривые) и кальция (верхние кривые) при разных частотах стимуляции. Метки времени - 1 сек.

Изменение коэффициента K_3 (скорость оттока свободного кальция из поля реакции) оказывает существенное влияние и на максимальное значение $\chi(t)$ и на ход переходного процесса. С уменьшением K_3 растет амплитуда сокращений, возрастает диастолическое напряжение, раньше и при меньших частотах стимуляции возникают альтернации. Этот вывод особенно важен, так как он подтверждает тот факт, что примембранные концентрации кальция оказывают существенное влияние на хронотропию миокарда.

Дальнейшее исследование модели показало, что на хронотропию "миокарда" оказывает существенное влияние изменение коэффициентов, которые тем или иным образом регулируют содержание натрия в клетке или отражают его активность на уровне миофиламентов. Так уменьшение коэффициента K_4 , ха-

характеризующего скорость связывания натрия с контрактильными белками, показало, что инактивация сокращений в ритмическом ряду уменьшается, а при $K_4=0$ даже при очень высоких ритмах стимуляции отсутствует (рис.71).

Изменение коэффициента K_5 ведет себя противоположным образом. Увеличение K_5 уменьшает инактивацию сокращений, уменьшение K_5 усиливает ее. Однако, наиболее существенным образом на хроноинотропию $\chi(t)$ влияет изменение коэффициента K_6 , характеризующего скорость оттока натрия из клетки. Увеличение K_6 ведет сначала к уменьшению только инактивации сокращений (рис.72 а,б). Дальнейшее увеличение K_6 ведет к уменьшению скорости накопления натрия в клетке и к исчезновению его активирующего воздействия на сокращения (рис.72в).

Изменение начальных условий интегрирования на модели $\chi(t_0)$, $y(t_0)$, $u(t_0)$, $z(t_0)$, характеризующих как бы предисторию миокарда, показало, что они значительно влияют на переходные процессы сокращений в ряду при ритмической стимуляции, так что лестница Боудича, например, может смениться на обратную.

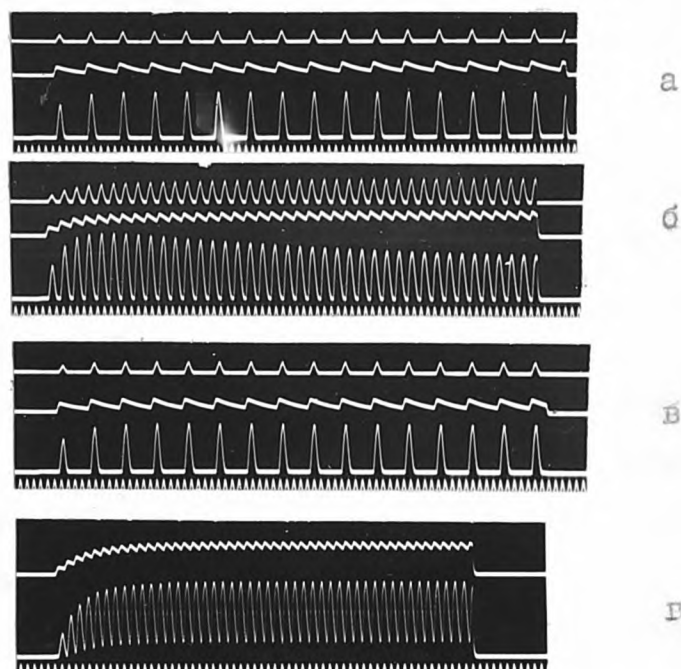


Рис. 71. Влияние коэффициента K_4 на хроноинотропию $\chi(t)$.
Верхние кривые $Na = f(t)$, нижние — сокращение.
а, б. $K_4 = 0$, $f = 0,2$ /сек и $0,8$ /сек;
в, г. $K_4 = 1$, $f = 0,2$ /сек; и $0,8$ /сек.

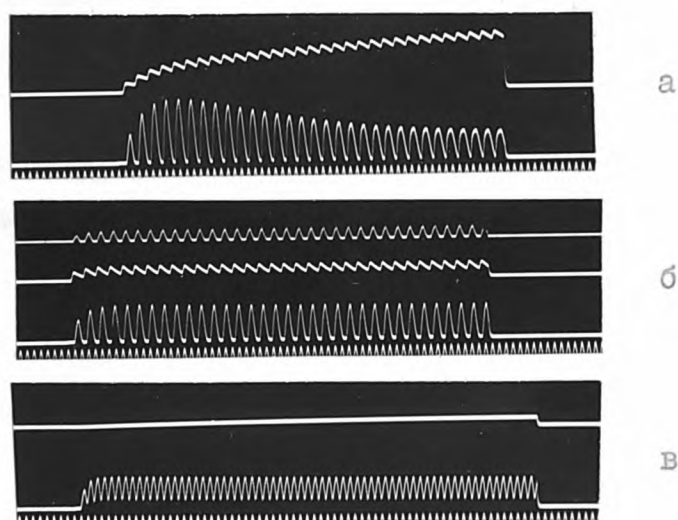


Рис. 72. Влияние коэффициента K_6 на хроноинотропию
а. $K_6 = 0,1$; б. $K_6 = 0,5$; в. $K_6 = 1$
Частота стимуляции $0,5$ 1 /сек.

В ы в о д ы

1. Исследование математической модели миокарда на ЦВМ М-20 и аналоговой машине МН-10М показало, что модель достаточно хорошо воспроизводит большинство хроноинотропных явлений.

2. Исследование модели подтвердило наше предположение о том, что хроноинотропные явления в миокарде могут быть обусловлены скоростью накопления и рассасывания свободных ионов натрия и кальция в миоплазме.

3. На длительность заброса кальция в миоплазму (длительность ПД) оказывает влияние внутренняя концентрация как ионов натрия, так и ионов кальция.

4. Инактивация сокращения ритмически работающего миокарда при длительной стимуляции или повышении частоты сердечбиений может быть объяснена не только инактивацией входа кальция в клетку по мере накопления комплекса *CaR* в при- мембранном слое, но и конкуренцией ионов кальция и натрия на уровне миофиламентов или на уровне другого какого-либо промежуточного звена.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Разработана модифицированная методика фиксации тока на мембране клеток миокарда, которая позволяет исследовать электромеханическое сопряжение и хроноинотропию.

2. Пропускание деполяризующих толчков тока через мембрану во время потенциалов действия увеличивает длительность фазы плато и одновременно длительность и амплитуду сокращений. Гиперполяризующий ток укорачивает потенциал действия и подавляет сократимость.

3. Связь между длительностью потенциала действия и максимальной амплитудой сокращений в миокарде желудочка лягушки в нормальном растворе S -образна. Связь силы сокращений с длительностью деполяризующих и гиперполяризующих толчков тока также S -образна. В гипернатриевом растворе зависимость "длительность толчков тока - сила сокращений" смещается параллельно вверх. В гиперкальциевом растворе эта кривая также смещается вверх, но одновременно увеличивается ее крутизна.

4. Чувствительность потенциалов действия и сокращений к току наибольшая в начальную фазу возбуждения (0,1-0,4 сек после регенеративной деполяризации).

5. Сильный гиперполяризующий ток приводит к возникновению контрактуры, кинетика которой значительно отличается от деполяризующей контрактуры. Способность к развитию контрактурных ответов в гипернатриевом и гиперкальциевом растворах падает.

6. На снятие сильного гиперполяризующего тока возникает анодразмыкательная контрактура, параметры которой определяются величиной и длительностью предшествующей гиперполяризации.

7. На сократимость ритмически работающего миокарда депо-

ляризирующий ток оказывает двойное влияние - увеличивает силу сокращений и увеличивает скорость инактивации в ритмическом ряду. Гиперполяризирующий ток подавляет сократимость в ритмическом ряду.

8. Деполяризация мембраны во время диастолы увеличивает скорость инактивации сокращений.

9. По прекращении действия деполяризирующего тока на фоне ритмической стимуляции наблюдается падение сократимости миокарда, которая медленно восстанавливается. По прекращении действия гиперполяризирующего тока амплитуда сокращений возрастает, а затем возвращается к исходному уровню. Постанодическая сократимость миокарда в гиперкальциевом растворе увеличивается.

10. Последствие деполяризирующего тока наряду с подавлением сократимости проявляется в уменьшении длительности потенциалов действия. Влияние деполяризирующего и гиперполяризирующего тока на процессы последствия выражено уже после однократного воздействия тока.

11. Тетродотоксин в дозе 1×10^{-7} г/мл во время ритмической деятельности миокарда уменьшает длительность фазы плато потенциала действия, скорость регенеративной деполяризации и овершут. Параллельно тетродотоксин подавляет сократимость миокарда. Тетродотоксин оказывает слабое влияние на электрическую и механическую активность клеток миокарда при одиночных стимулах.

Действие тетродотоксина выражено тем заметнее, чем выше частота стимуляции. Длительные диастолические паузы приводят к частичному восстановлению параметров потенциала действия и механического ответа.

12. Деполярирующие толчки тока в растворе с тетродотокси-

ном удлиняют потенциал действия, но не влияют на сократимость миокарда. Способность постоянного деполяризующего тока вызывать контрактуру в растворе с тетродотоксином минимальная, гиперполяризующего — отсутствует.

13. Строфантин активизирует сократимость миокарда при одиночных раздражениях, но ведет к быстрой ее инаktivации в ритмическом ряду при высокой частоте стимуляции. Деполяризующие толчки тока при действии строфантина ускоряют подавление сокращений.

14. Адреналин, добавленный в раствор с тетродотоксином, восстанавливает электрическую и механическую активность, но не восстанавливает чувствительность миокарда к току. Совместное действие адреналина и строфантина в растворе с тетродотоксином полностью восстанавливает сократимость миокарда и его чувствительность к току.

15. На основании проведенных исследований выдвинуто предположение, что регуляция сократимости миокарда при его ритмической деятельности осуществляется за счет изменения приембранной концентрации ионов натрия и кальция, а также мембранного связанного кальция.

16. Предложена математическая модель, которая хорошо воспроизводит большинство хроноинотропных явлений в миокарде желудочка лягушки.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Бабский Е.Б., Райхбаум Е.Я. Зависимость длительности потенциала действия одиночных мышечных волокон сердца от времени реституции возбужденной мембраны. ДАН СССР, серия Биология, 177,3,736-739,1967.
2. Бабский Е.Б., Райхбаум Е.Я. Альтернация потенциалов действия одиночных мышечных волокон сердца. ДАН СССР, серия Биология, 177,4,970-973,1967.
3. Бызов А.Л. Особенности микроэлектродного отведения биоэлектрических потенциалов. В кн. Современные проблемы электрофизиологических исследований нервной системы. Л., "Наука", 1964.
4. Гнитко Р.В., Изаков В.Я., Орлов Р.С., Установка для изучения связи возбуждения и сокращения клеток миокарда лягушки методом фиксации тока на мембране. Физиол. журнал СССР, 57,318-321,1971.
5. Гнитко Р.В., Орлов Р.С., Изаков В.Я., Ведерников Ю.П.
О возможности смены доминирующего типа электрогенеза в клетках миокарда лягушки *Rana temporaria* под влиянием двух валентных катионов. Журнал эволюционной биохимии и физиологии, 8,194-201,1972.
6. Глаголева В.В., Чечулин Ю.С. Ультраструктурная основа нарушения функции сердечной мышцы. Москва, "Медицина", 1968.
7. Бмченко А. Влияние электролитов на процессы возбуждения в сердце. Дворец науки, Доклады института биологии, Киев, 4,255-308,1941.
8. Зольникова Н.К. Влияние на изолированное сердце лягушки

- быстрого и медленного изменения концентраций хлористого кальция и хлористого калия в питающем растворе. Физиол. журнал СССР, 25, 5, 708-718, 1938.
9. Изаков В.Я. Изучение электрической активности клеток миокарда. Автореферат диссертации, Свердловск, 1967.
10. Изаков В.Я. Механизмы частотнозависимой потенциации сокращений в сердечной мышце. В кн. Ритм сердца в норме и патологии. Вильнюс, 1970.
11. Изаков В.Я., Мархасин В.С., Элик Е.Ф. Изучение зависимости длительности потенциалов действия клеток миокарда желудочка лягушки от частоты стимуляции. Материалы XXX годичной научной сессии Свердловского медицинского института, Свердловск, 272, 1968.
12. Изаков В.Я., Элик Е.Ф. Влияние температуры на внутриклеточно-регистрируемые потенциалы действия клеток миокарда желудочка. Физиол. журнал СССР, 55, 713-719, 1969.
13. Костюк П.Г. Микроэлектродная техника. Киев, 1960.
14. Мещерский Н.М. Методика микроэлектродного исследования. М., "Медгиз", 1960.
15. Ониани Т.Н. Мембрано-миофибриллярные взаимоотношения. Тбилиси, "Мецниереба", 1970.
16. Онищенко Н.А. Электролиты и электрическая активность сердца. В сб. Вопросы физиологии и патологии сердца. Научн. обзор, вып. 3, 39-71, 1967.
17. Орлов Р.С., Изаков В.Я. Зависимость параметров электрической активности волокон миокарда желудочка от частоты и длительности предшествующего возбуждения. Физиол. журнал СССР, 55, 823-832, 1969.

18. Орлов Р.С., Изаков В.Я. Основные вопросы механизма сопряжения возбуждения и сокращения в миокарде. Успехи физиологических наук, 2, 4, 3-23, 1971.
19. Орлов Р.С., Изаков В.Я., Кеткин А.Т., Плеханов И.П. Регуляторные механизмы клеток гладкой мускулатуры и миокарда. Л., "Наука", 1971.
20. Орлов Р.С., Изаков В.Я., Шевелев В.М. Природа частотнозависимого саморегуляторного механизма сокращений миокарда. Физиол. ж. СССР, 51, 223-239, 1971.
21. Орлов Р.С., Четверикова Е.Ф. Роль ионов кальция в следовых электрических и механических процессах клеток сердечной мышцы. ДАН СССР, 192, 466-468, 1970.
22. Орлов Р.С., Шевелев В.М. Действие тетродотоксина на электрическую активность и сокращения клеток миокарда. ДАН СССР, 185, 221-224, 1969.
23. Орлов Р.С., Шевелев В.М. Роль ионов натрия в регуляции сократительной активности миокарда. Бюл. exper. биол. и мед., 1, 3-6, 1970.
24. Орлов Р.С., Элик Е.Ф. Влияние различных концентраций кальция на трансмембранные потенциалы и сокращения клеток миокарда. Бюл. exper. биол. и мед., 3, 7, 1969.
25. Растрингин Л.А. Статистические методы поиска. М., "Наука", 1968.
26. Сальманович В.А. Электролиты и сокращения миокарда. В сб. Физиология и патология сердечно-сосудистой системы. Научный обзор. Вып. I (2), 3-78, 1966.

27. Саркисов Д.С., Втирин Б.В. Электронная микроскопия деструктивных и регенеративных внутриклеточных процессов. Москва, "Медицина", 1967.
28. Смит Д. Скелетная, сердечная и гладкая мышечная ткань. В кн. Электронно-микроскопическая анатомия. М., "Мир", 141-155, 1967.
29. Струков А.И., Пауков В.С. Современные представления о функциональной морфологии сократительного миокарда. Архив патологии, 4, 43-57, 1969.
30. Ходоров Б.И., Варновицкий Е.Г. О различиях в механизме угнетающего действия тетродотоксина и новокаина на скелетные мышечные волокна лягушки. Бюл. экспер. биол. и мед., II, 34-37, 1967.
31. Шевелев В.М. К изучению механизмов хроноинотропии в клетках миокарда. Канд. дис., Свердловск, 1971.
32. Элик Е.Ф., Изаков В.Я. Влияние низкой температуры на внутриклеточно регистрируемые потенциалы действия клеток миокарда желудочка. Материалы II Всес. конф. "Теоретические проблемы действия низких температур на организм", Л., 120-123, 1969.
33. Ashley C.C. Calcium and the activation of skeletal muscle. Endeavour, 30, 18-25, 1971.
34. Ashley C.C., Ridgway E.B. Simultaneous recording of membrane potential, calcium transient and tension in single muscle fibres. Nature, 219, 1168-1169, 1968.
35. Ashley C.C., Ridgway E.B. Aspects of the relationship between membrane potential, calcium transient and tension

- in single barnacle muscle fibres. *J.Physiol.*,200,74,1969.
36. Ashley C.C.,Ridgway E.B. Acquorin calcium luminescence and its application to muscle physiology. In: Calcium and cellular function, ed. Cuthbert A.,London,42-53,1970.
37. Ashley C.C.,Ridgway E.B. On the relationships between membrane potential, calcium transient and tension in single barnacle muscle fibres. *J.Physiol.*,29,105-130, 1970.
38. Baker P.F. Recent experiments on the properties of the Na efflux from squid axons. *J.Gen.Physiol.*,51,5,Part 2, 172-179,1968.
39. Baker P.F.,Blaustein M.P. Sodium dependent uptake of calcium by crab nerve. *Biochem.biophys.Acta.*150,167-170, 1968.
40. Baker P.F.,Baustein M.P.,Hodgkin A.L.,Steinhardt R.R. The effect of sodium concentration on calcium movements in giant axons of *loligo forbesi*. *J.physiol.*,192,43-44, 1967.
41. Baker P.F.,Hodgkin A.L.,Ridgway E.B. Depolarization and calcium entry in squid giant axons. *J.Physiol.*,218,709-755,1971,
42. Beeler G.W.,Reuter H. Membrane calcium current in ventricular myocardial fibres. *J.Physiol.*,207,191-209,1970.
43. Beeler G.W.,Reuter H. The relation between membrane potential, membrane currents and activation of contraction in ventricular myocardial fibres. *J.Physiol.*,207, 211-229,1970.

44. Bendall J.R. Further observations on a factor (the Marsh-factor) effecting relaxation of ATP shortened muscle-fibre models, and the effect of Ca and Mg ions upon it. *J.Physiol.(London)*, 121, 232-254, 1953.
45. Bennett H.S., Porter K.R. An electron microscopg study of sectioned breast muscle of domestic fowell. *Am.J. Anat.* 93, 61-105, 1953.
46. Bernard C., Gargouil G.M. Acquisitions successives, chez l'embryon de Rat des perméabilites spécifiques de la membrane myocardique. *Comptes rendus Acad.Sc.Paris*, 270, série D, 1495-1498, 1970.
47. Besseau A., Gargouil G.M. Ionic currents in rat ventricular heart fibres: voltage-clamp experiments using double sucrose-gap technique. *J.Physiol.*, 204, 95, 1969.
48. Blaustein M.P., Hodgkin A.L. The effect of cyanide on the efflux of calcium from squid axons. *J.Physiol.*, 200, 497-527, 1969.
49. Blaustein M.P., Weismann W.P. Effect of sodium ions on calcium movements in isolated synaptic terminals. *Proc. Nat.Acad.Sci.v.* 66, 664, 1970.
50. Bozler E. Relaxation in extracted muscle fibres. *J.Gen. Physiol.*, 38, 149-159, 1954.
51. Bozler E. Contractility of muscle in solutions of low electrolyte concentration. *Amer.J.Physiol.*, 199, 299-300, 1960.
52. Brady A.J. Physiology of amphibian heart. In: *Physiology of the amphibia.* ed. Moore J.A., 1964.

53. Brady A.J. Excitation and excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Ann. Rev. Physiol.*, 26, 341-367, 1964.
54. Brady A.J., Woodbury J.W. Effects of Sodium and Potassium on Repolarization in Frog Ventricular Fibres. In: H. Necht (ed), *The Electrophysiology of the Heart*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 65, 687-692, 1957.
55. Briggs A.H. Calcium movements during potassium contraction in isolated rabbit aortic strips. *Amer. J. Physiol.*, 203, 849-852, 1962.
56. Cruse R., Roberts H.E. Calcium and muscle sodium. *J. Physiol.*, 127, 32, 1955.
57. Carvalho A.P. Binding of cations by microsomes from rabbit skeletal muscle. *J. Cell. Physiol.* 67, 73-84, 1966.
58. Carvalho A.P. Calcium-binding properties of sarcoplasmic reticulum as influenced by ATP, caffeine, quinine and local anesthetics. *J. Gen. Physiol.*, 52, 622-642, 1968.
59. Carvalho A.P., Leo B. Effects of ATP on the interaction of Ca, Mg and K with fragmented sarcoplasmic reticulum isolated from rabbit skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.*, 50, 1327-1352, 1967.
60. Crairfield P.F., Hoffman B.F., Siebens A.A. Anodal excitation of cardiac muscle. *Amer. J. Physiol.*, 190, 383-390, 1957.
61. Daly J., Clark A.J. The action of ions upon the frog's heart. *J. Physiol.*, 54, 367-383, 1921.
62. Deck K.A., Trautwein W. Ionic currents in cardiac excitation. *Arch. Ges. Physiol.*, 280, 63-80, 1964.
63. Dudel J., Peper K., Rudel R., Trautwein W. Excitatory membrane current in heart muscle (Purkinje fibres). *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 292, 3, 255-273.

64. Dudel J., Rüdel R. Voltage and time dependence of excitatory sodium current in cooled sheep Purkinje fibres. *Pflügers Arch.*, 315, 136-158, 1970.
65. Ebashi S., Endo M. Calcium ion and muscle contraction. *Progr Biophys. and Molec Biol.* Vol. 8, Pergamon Press, 123-183, 1968.
66. Ebashi S., Endo M., Ohtsuki I. Control of muscle contraction. *Quart. Rev. Biophys.*, 2, 351-384, 1969.
67. Edman K.A.P., Grieve D.W., Nilsson E. Studies of the excitation-contraction mechanism in the skeletal muscle and the myocardium. *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* 290, 320-334, 1966.
68. Falk V., Gerard R. Effect of micro-injected salts and ATP on the membrane potential and mechanical response of muscle. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 43, 349, 1954.
69. Fanburg B. Calcium in the regulation of heart muscle contraction and relaxation. *Fed. Proc.*, 23, 922-925, 1964.
70. Fanburg B., Gergely J. Studies an adenosinetriphosphate supported calcium accumulation by cardiac subcellular particles. *J. Biol. Chem.*, 240, 2721-2728, 1965.
71. Forsman W.G., Girardier L. Untersuchungen zur ultrastruktur des Rattenherzmuskels mit besonderer Beruecksichtigung des sarkoplasmatischen Retikulums. *Z. Zellforsch.*, 249-275, 1966.
72. Frank K., Becker M.C. Microelectrodes for recording and stimulation in Electrophysiological methodes , ed. Polister K., Nastuk A., N.-Y., Vol. 5, 22-86, 1964.
73. Giebisch G., Weidmann S. Membrane currents in mammalian

- ventricular heart muscle fibres using a voltage-clamp technique. *J.Gen.Physiol.* 57, 290-296, 1971.
74. Goto M., Brooks C.M.C. Membrane excitability of the frog ventricle examined by long pulses. *Amer.J.Physiol.*, 217, 4, 1236-1245, 1969.
75. Haas H.G., Kern R., Einwachter H.M. Electrical activity and metabolism in cardiac tissue: an experimental and theoretical study. *J.Memb.Biol.*, 3, 180-209, 1970.
76. Hagiwara S., Nakajima S. Tetrodotoxin and manganese ion effects on action potential of frog heart. *Science*, 149, 3689, 1254-1255, 1965.
77. Hagiwara S., Nakajima S. Differences in Na and Ca spikes as examined by application of tetrodotoxin, procaine and manganese ion. *J.Gen.Physiol.*, 49, 793-806, 1966.
78. Hagiwara S., Nakajima S. Effects of the intracellular Ca ion concentration upon the excitability of the muscle fibre membrane of a barnacle. *J.Gen.Physiol.*, 49, 807-818, 1966.
79. Hasselbach W. Relaxing factor and the relaxation of muscle *Progr.Biophys.*, 14, 167-192, 1964.
80. Hasselbach W. Structural and enzymatic properties of the calcium transporting membranes of the sarcoplasmic reticulum., *Ann.N.-Y., Acad.Sci.*, 137, 1041-1048, 1966.
81. Heilbrunn L.V., Wiercinski F. The action of various cations on muscle protoplasm. *J.Cell.and Compar.Physiol.*, 29, 15-32, 1947.
82. Hill A.V., Howarth J.V. The effect of potassium on the resting metabolism of the frog's sartorius. *Proc.Roy Soc.B.*, 147, 21-43, 1957.

83. Hodgkin A.L., Horowicz P. Potassium contractures in single muscle fibres. *J. Physiol.*, 153, 386-493, 1960.
84. Holland W.C., Sekul A.A. Effect of ouabain on Ca^{45} and Cl^{36} exchange in isolated rabbit atria. *Amer. J. Physiol.*, 197, 757-760, 1959.
85. Hollander P.B., Webb J.L. Cellular membrane potentials and contractility of normal rat atrium and the effects of temperature, tension and stimulus frequency. *Circul. Res.*, 3, 604-612, 1955.
86. Johnson E.A., Lieberman M. Heart: excitation and contraction. *Ann. Rev. Physiol.* 33, 479-532, 1971.
87. Kao C.Y. Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharmacolog. Reviews*, 18, 2, 997-1049, 1967.
88. Kavalier F. Membrane depolarization as a cause of tetanic development in mammalian ventricular muscle. *Amer. J. Physiol.*, 197, 968-970, 1959.
89. Koeh-Weser J. Myocardial contraction frequency and onset of cardiac glycoside action. *Circul. Res.*, 28, 34-48, 1971.
90. Kruts V., Braveny P. Restitution de la contractilité du myocarde entre les contractions et phénomènes de potentiation. *Arch. int. Physiol.*, 69, 645-667, 1961.
91. Langer G.A. Ion Fluxes in Cardiac Excitation and Contraction and Their Relation to Myocardial Contractility. *Physiol. Rev.*, 48, 4, 708-757, 1968.
92. Langer G.A., Beady A.J. Calcium flux in the mammalian ventricular myocardium. *J. Gen. Physiol.*, 46, 703, 1963.
93. Lee K.S. The role of cardiac sarcoplasmic reticulum in excitation-contraction coupling. In: Factors influencing

- myocardial contractility. Ed. Tanz R., Kavalier F., Roberts J., 363-372, N.-Y. Acad. Press, 1967.
94. Lee K.S. Effect of cardiac glycoside on the sarcoplasmic reticulum as a possible mechanism of inotropic action. In: Factors influencing myocardial contractility. Ed. Tanz R., Kavalier F., Roberts J., 519-531, N.-Y. Acad. Press, 1967.
95. Lee K.S., Ladinsky H., Choi S.J., Kasuja J. Studies on the in vitro interaction of electrical stimulation and Ca movement in sarcoplasmic reticulum. J. Gen. Physiol., 49, 689-715, 1966.
96. Legato M.J., Spiro D., Langer G.A. Ultrastructural alteration produced in mammalian myocardium by variation in perfusate ionic composition. J. Cell. Biol., 37, 1-12, 1968.
97. Lee J.C.P., Visscher M.B. Perfusate cations and contracture and Ca, Cr, and ATP in rabbit myocardium. Amer. J. Physiol. 219(6), 1637-1641, 1970.
98. Lingle D.S. The importance of sodium chloride in heart activity. Amer. J. Physiol., 8, 75-98, 1902.
99. Loewi O. On the mechanism of the positive inotropic action of fluoride, oleate and calcium on the frog's heart. J. Pharm. exp. Ther., 114, 90-99, 1955.
100. Lüttgan H.C., Niedergerke R. The antagonism between Ca and Na ions on the frog's heart. J. Physiol., 143, 486-505, 1958.
101. Marsh B.B. The effect of adenosinetriphosphate on the fibre volume of muscle homogenate. Biochim. Biophys. Acta, 9, 247-260, 1952.

102. Mascher D., Peper K. Two components of inward current in myocardial muscle fibres. *Pflüg. Arch.*, 307, 190-203, 1969.
103. Matsubara I., Matsuda K. Contribution of calcium current to the ventricular action potential of dog. *Jap. J. Physiol.*, 19, 6, 814-823, 1969.
104. Mines G.R. An functional analysis by the action of electrolytes. *J. Physiol.*, 46, 188-235, 1913.
105. Moulin M., Wilbrandt W. Die Wirkung von Kalium und Calcium auf das Treppenphänomen am Träschherren. *Experientia*, 11, 72-73, 1955.
106. Müller H. EDTA-sensitizing activity and molecular properties of tropomyosin prepared in presence of a sulphydryl protecting agent. *Biochem. Z.*, 345, 300-321, 1966.
107. Muir A.R. Observations on the fine structure of the Purkinje fibres in the ventricle of the sheep's heart. *J. Anat.*, 91, 251-258, 1957.
108. Muir A.R. Further observations on the cellular structure of cardiac muscle. *J. Anat.*, 99, 27-46, 1965.
109. Narahashi T., Anderson N.C., Moore J.W. Tetrodotoxin does not block excitation from inside the nerve membrane. *Science*, 153, 3737, 765-767, 1966.
110. Narahashi T., Deguchi T., Urakawa N., Ohkubo G. Stabilization and rectification of muscle fibre membrane by tetrodotoxin. *Amer. J. Physiol.*, 198, 934-938, 1960.
111. Narahashi T., Moore J.W., Scott W.R. Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase of lobster giant axons. *J. Gen. Physiol.*, 47, 965-974, 1964.
112. Nayler W.G. Influence of hypertonic solutions on ventri-

- cular contractile activity. *Amer.J.Physiol.*, 201, 682-686, 1961.
113. Nayler W.G. The importance of calcium in poststimulation potentiation. *J.Gen.Physiol.*, 44, 1053-1072, 1961.
114. Nayler W.G. Calcium and other divalent ions in contraction of cardiac muscle. In: *Muscle. Proc.Symp.Fac.Med. Univ.Alberta.ed.W.M.Paul,E.E.Daniel,C.M.Kag, Monckton G., London Pergamon, 167-184, 1965.*
115. Nayler W.G. Changes in cardiac contractility evoked under isotonic and isometric conditions. *Aust.J.exp. Biol.med.Sci.*, 39, 429-440, 1961.
116. Nelson D.A., Benson S.S. On the structural continuities of the transverse tubular system of rabbit and human myocardial cells. *J.Cell.Biol.*, 16, 297-313, 1963.
117. Niedergerke R. Local muscular shortening by intracellularly applied calcium. *J.Physiol.*, 128, 12, 1955.
118. Niedergerke R. The staircase phenomenon and the action of calcium on the heart. *J.Physiol.*, 134, 569-583, 1956.
119. Niedergerke R. The potassium chloride contracture of the heart and its modification by calcium. *J.Physiol.*, 134, 584-599, 1956.
120. Niedergerke R. Movements of Ca in beating ventricles of frog heart. *J.Physiol.*, 167, 551-580, 1963.
121. Niedergerke R. The role of calcium ions as coupling agents. XXIV Internal Congress, I, 143, Washington, 1968.
122. Niedergerke R., Lüttgan H.C. Calcium and the contraction of the heart. Antagonism between calcium and sodium ions. *Nature*, 179, 1066-1067, 1957.
123. Niedergerke R., Orkand R.K. The dual effect of calcium

- on the action potential of the frog's heart. *J. Physiol.*, 184, 291-311, 1966.
124. Niedergierke R., Orkand R.K. The dependence of the action potential of the frog's heart on the external and intracellular sodium concentration. *J. Physiol.*, 184, 312-334, 1966.
125. Ochi R. The slow inward current and the action manganese ions in guinea pig's myocardium. *Pflügers Arch.*, 316, 81-94, 1970.
126. Paes de Carvalho A., Hoffman B.F., M. De Paula Carvalho. Two components of cardiac action potential. I voltage-time course and the effect of acetylcholine on atrial and nodal cells of the rabbit heart. *J. Gen. Physiol.*, 54, 607, 1969.
127. Page E. Tubular systems in Parkinye cells of the cat heart. *J. Ultrastructure Res.*, 17, 72-83, 1967.
128. Page E. Correlations between electron microscopic and physiological observations in heart muscle. *J. Gen. Physiol.*, 5, 212-220, 1968.
129. Palmer R.F., Posey V.A. Ion effects on calcium accumulation by cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.*, 50, 2085-2096, 1967.
130. Paradise R.R. Influence of potassium and calcium on behavior of isolated rat atria. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 112, 483-486, 1963.
131. Peachey L.D. The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius. *J. Cell. Biol.*, 25, 209-231, 1965.
132. Peachey L.D. The role of transverse tubules in excita-

- tion contraction coupling in streated muscles. Ann.N.-Y. Acad.Sci.,137,1025-1037,1966.
133. Peper K.,Trautwein W. A membrane current related to the plateau of the action potential of Purkinje fibres. Pflueger Arch,303,108-23 1968,
 134. Porter K.R.,Palade G.E. Studies on the endoplasmic reticulum III Ions form and distribution in striated muscle fibres. J.Biophys.Biochem.Cytol.3,269-300,1957.
 135. Reiter M. Wirkung von Frequenz, Natriumentrug und Strophanthin auf Kontraktionskraft und Alkaligehalt des Herzmuskels. Arch.exp.Path.,Pharmak.,227,300-315,1956.
 136. Reuter H. The dependence of the slow inward current on external calcium concentration in Purkinje fibres. J.Physiol.,192,479-492,1967.
 137. Reuter H. Slow inactivation of currents in cardiac Purkinje fibres. J.Physiol.,197,233-253,1968.
 138. Reuter H.,Seitr N. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. J.Physiol.,195,451-472,1968.
 139. Ridgway E.B.,Ashley G.C. Calcium transients in single muscle fibres. Biochem.and Biophys.Res.Communs,29,229-234,1967.
 140. Ringer S. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. J.Physiol.,4,29-42,1883.
 141. Rougier O.,Vassort G.,Garnier G.,Gargouil G.M.,Corabocuf E. Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential. Pflügers Arch.,308,91-110, 1969.

142. Rougier O., Vassort G., Stämpfli R. Voltage clamp experiments on frog atria heart muscle fibres with the sucrose gap technique. *Pflüger Arch.* 301, 91-108, 1968.
143. Sandow A. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Pharm. Rev.*, 17, 3, 265-318, 1965.
146. Sandow A. Skeletal muscle. *Ann. Rev. Physiol.*, 32, 87-138, 1970.
147. Schmidt R.F., Chang J.J. Aktionspotential und Mechanogramm von Purkinje-Fäden in tiefer Temperatur. *Pflügers Arch.*, 272, 393-399, 1961.
148. Simpson F.O. The transverse tubular system in mammalian myocardial cells. *Amer. J. Anat.*, 117, 1-18, 1965.
149. Simpson F.O. Electron microscopic morphology of cardiac muscle. XXIV Int. Congress IUPS, Washington, 6, 141-142, 1968.
150. Simpson F.O., Oertel S.J. The fine structure of sheep myocardial cells, sarcolemmal invaginations and the transverse tubular system. *J. Cell Biol.*, 12, 91-100, 1962.
151. Simpson F.O., Rayns D.G. The relationship between the transverse tubular system and the tubules at the Z discs level of myocardial cells in the ferret. *Amer. J. Anat.*, 122, 193-208, 1968.
152. Sleator W.W., Gubareff T. The control of spike duration by calcium in human and chimpanzee atrial muscle. *Proc. Intern. Union Physiol. Sci.*, I, 404, 1968.
153. Sommer J.R., Johnson E.A. Cardiac muscle: a comparative study of Purkinje fibres and ventricular fibres. *J. Cell. Biol.*, 36, 497-526, 1968.

154. Sommer J.R., Johnson E.A. Cardiac muscle. A comparative ultrastructural study with special reference to frog and chicken hearts. *Z.Zellforsch.*, 98, 437-468, 1969.
155. Sommer J.R., Johnson E.A. Comparative ultrastructure of cardiac cell membrane specializations. *Amer.J.Cardiol.*, 25, 184-194, 1970.
156. Sonnenblick E.H., Stam A.C. Cardiac Muscle : Activation and Contraction. *Ann.Rev.Physiol.*, 31, 645-674, 1969.
157. Staley N.A., Benson E.S. The ultrastructure of frog ventricular cardiac muscle and its relationship to mechanism of excitation-contraction coupling. *J.Cell. Biol.*, 38, 99-144, 1968.
158. Stenger R.J., Spiro D. Ultrastructure of mammalian cardiac muscle. *J.Biophys.and Biochem.Cytol.*, 9, 325-351, 1961.
159. Szent-Györgyi A. The reversibility of the contraction of myosin threads. *Studies Inst.Med.Chem.Univ.Szeged*, 2, 25-26, 1942.
160. Thomas L.J., Jalley W.B., Grechman R. Effect of calcium lack and ouabain on calcium uptake in frog's heart. *Fed.Proc.*, 17, 162, 1958.
161. Tice L.W. In situ studies of the sarcotubular system. In: *Factors influencing myocardial contractility*. Ed. Tanz, Kavalier F., Roberts J., 339-350, 1967.
162. Trautwein W., Dudel J. Aktionspotential und Mechanogramm des Katzenpapillarmuskels aus Funktion der Temperatur. *Pflügers Arch.Physiol.*, 260, 104-105, 1954.
163. Yamamoto T. Observations on the fine structure of the cardiac muscle cells in goldfish. In: *Electrophysiology and ultrastructure of the heart*. Ed.Sano T., Mitsuhiro V.,

- Matsuda K., Tokyo, 1-13, 1967.
164. Walker J.M.G., Weatherall M. Rabbit auricles in media containing high concentrations of potassium and calcium and low concentrations of sodium. *J. Physiol.*, 166, 2, 33, 1963.
 165. Watanabe S. Relaxing effects of EDTA on glycerol-treated muscle fibres. *Arch. Biochem. Biophys.*, 54, 559-562, 1955.
 166. Webb J., Hollander P.B. Effects of enzyme inhibitors on the contractility and membrane potentials of the rat atrium. *Circ. Res.*, 7, 131-137, 1959.
 167. Weber A.M., Herr R., Reiss J. Study of the kinetics of calcium transport by isolated fragmented sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Z.* 345, 329-369, 1966.
 168. Wilbrandt W., Koller H. Die Calciumwirkung am Froscherzen als Funktion des Ionengleichgewichts zwischen Zellmembran und Umgebung. *Helv. Physiol. Acta*, 6, 208-221, 1948.
 169. Winegrad S. The possible role of calcium on excitation-contraction coupling of heart muscle. *Circulation*, 24, 523-529, 1961.
 170. Winegrad S. Electrolytes and contractility in heart muscle. *Biophysics of Physiological and Pharmacological Actions*. ed. Shanes A.M., Amer. Adv. Sci., Washington, 1961.
 171. Winegrad S., Shanes A.M. Calcium flux and contractility in guinea pig atria. *J. Gen. Physiol.*, 45, 371-394, 1962.
 172. Woodbury J.W., Brady A.J. Intracellular recording from moving tissue with a flexibly mounted microelectrode. *Science*, 123, 100-101, 1956.
 173. Woodbury L.A., Hecht H.H., Christopherson A.R. Membrane

Resting and Action Potentials of single cardiac muscle
Fibres of Frog Ventricle. Amer.J.Physiol., 164, 307-318,
1951.