

СВЕРДЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ

На правах рукописи

РОСТИСЛАВ ВАСИЛЬЕВИЧ ГНИТЬКО

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

Диссертация написана на русском языке
03.00.13 — физиология человека и животных

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Свердловск, 1972

СВЕРДЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ

На правах рукописи

РОСТИСЛАВ ВАСИЛЬЕВИЧ ГНИТЬКО

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

Диссертация написана на русском языке
03.00.13 — физиология человека и животных

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Свердловск, 1972

Работа выполнена в Свердловском медицинском институте.
Научный руководитель — кандидат медицинских наук, доцент
Изаков В. Я.

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор — *Розенблат В. В.*

Кандидат биологических наук, доцент — *Рыбин И. А.*

На внешний отзыв работа направлена в Научно-исследовательский институт Кардиологии при Каунасском медицинском институте.

Автореферат разослан « *24* » *ноября* 1972 г.

Защита диссертации состоится « *26* » *декабря* 1972 г.
на заседании Медико-биологического Ученого совета Свердловского медицинского института.

Адрес: г. Свердловск, ул. Репина, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Свердловского медицинского института.

Адрес: ул. Ермакова, 17.

Ученый секретарь Совета — доцент *Константинов В. Г.*

Механизм сопряжения электрических явлений в поверхностной мембране с сокращением становится узловой проблемой в физиологии мышечной ткани. Основные моменты электромеханического сопряжения сначала были выяснены на клетках скелетных мышц и часть выводов этих работ без должной экспериментальной проверки была перенесена для объяснения связи возбуждение — сокращение в миокарде. Однако клетки миокарда имеют ряд отличительных особенностей морфологического плана (В. В. Глаголева и Ю. С. Чечулин, 1966; Д. С. Саркисов, Б. В. Втюрин, 1967; Смит Р., 1967 и др.) и обладают более высокой чувствительностью к физиологически активным веществам по сравнению со скелетными мышцами. Ввиду этого экстраполяция электромеханического сопряжения со скелетной мускулатуры на миокард должна производиться с большой осторожностью. Обращает на себя внимание 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 ряде физиологических и фармакологических воздействий.

В настоящее время складывается мнение, что в миокарде ПД не просто триггер, запускающий механизм сокращения, а одно из центральных звеньев, посредством которого осуществляется регулирование интенсивности механического ответа в зависимости от предыстории деятельности, состояния клеток и состава окружающей миокард среды.

Целью настоящей работы было выяснение особенностей электромеханического сопряжения в миокарде при его ритмической деятельности. Очевидно, для выяснения взаимосвязи электрической и механической активности необходимо в желаемом направлении изменять параметры ПД и проследить как при этом меняется сократимость. Применение для этой цели фармакологических веществ, изменение ионного состава среды и увеличение либо уменьшение температуры является не совсем приемлемым подходом, так как указанные воздействия влияют на многие зве-

ня в цепи электромеханического сопряжения и интерпретация получаемых данных становится затруднительной.

В настоящей работе для проведения исследований была разработана специальная установка, позволяющая методом упрощенного сахарозного мостика за счет фиксации тока на мембране непосредственно управлять длительностью генерируемых ПД и одновременно регистрировать электрическую и механическую активность миокардиальных клеток. Сначала изучалась связь параметров ПД и сокращений с параметрами фиксирующего тока при одиночных раздражениях с целью установления различных функциональных зависимостей между параметрами ПД и сокращений. Эти данные отражены в главе III.

Затем электромеханическое сопряжение изучалось во время ритмической стимуляции миокарда при задании предыстории возбуждения и одновременной фиксации тока в различные фазы ПД и в диастолу (гл. IV). С целью более детального изучения отдельных звеньев электромеханического сопряжения аналогичные серии опытов были проведены в типеркальциевом и гипонатриевом растворах, а также при воздействии специфического ингибитора натриевого канала (тетродоксина) и блокатора активного переноса натрия — строфантина. Эти данные приведены в гл. V. В гл. VI дается обсуждение экспериментальных результатов. В гл. VII представлена математическая модель электромеханического сопряжения ритмически работающего миокарда и проведено исследование предлагаемой модели на аналоговой моделирующей машине МН-10М и ЦВМ М-20.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе электромеханическое сопряжение миокарда исследовалось при помощи фиксации тока на мембране. Фиксация тока производилась с помощью упрощенного сахарозного мостика (Гнилько Р. В., Изаков В. Я., Орлов Р. С. — 1971). Электрическая активность регистрировалась внутриклеточно при помощи стеклянных микроэлектродов. Предусилитель собран по каскадной схеме и имеет следующие параметры: входное сопротивление 1,5 *гом*, входная емкость менее 1 *нф*, передаточный коэффициент 0,99, входной ток при нейтрализации сеточного тока не более $10^{-11} \div 10^{-12}$ а, нестабильность 1—2 *мв/час*. Одновременно при помощи механотрона регистрировалась механическая активность миокарда.

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 с нормальным раствором, куда добавляется исследуемое вещество. Полоска миокарда желудочка лягушки *Rana ridibunda* 10—15 *мм* длины и 1,5—2,5 *мм* в диаметре одним концом фиксируется в камере А, а другим связана с механотроном. Препарат помещался в желобок, который имеется в перегородках, разделяющих камеры между собой (толщина сахарозной камеры 2 *мм*). Температура раствора $20 \pm 5^\circ$ С. Колебание температуры за время опыта не превышало $\pm 0,5^\circ$. Состав основного раствора: NaCl—110 *мМ*, KCl—2,5 *мМ*, CaCl₂—1,8 *мМ*, NaHCO₃—2,38 *мМ*, K₂HPO₄—0,08 *мМ*, глюкоза—5,5 *мМ*. При уменьшении количества натрия осмоличность поддерживалась эквивалентным количеством сахарозы. Исследуемые вещества добавлялись к основному раствору в тестирующую камеру. После установления полоски миокарда она подвергалась стимуляции с частотой 0,1 \div 0,2 *1/сек* в течение 10 \div 20 *мин*. Ритмическая стимуляция проводилась на фиксированных частотах $f=0,1$ *1/сек*; 0,2 *1/сек*; 0,4 *1/сек*; 1,0 *1/сек*. Промежутки между сериями обычно составляли одну минуту. При фиксации тока на мембране

более $1 \div 2$ сек пауза между сериями увеличивалась до $2 \div 3$ минут.

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.

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

Наиболее характерным эффектом деполяризующих толчков тока во время одиночных возбуждений является увеличение амплитуды и длительности 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. После того, как амплитуда контрактильного ответа достигнет некоторого уровня, характерного для каждой определенной силы тока, она остается практически неизменной, а длительность сокращений изменяется пропорционально длительности деполяризующего импульса. Контрактильный 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.

Кинетика расслабления после снятия деполяризующего толчка тока практически не зависит от длительности воздействующего импульса. Гиперполяризующий ток, задаваемый во время сокращений, обладает действием противоположным деполяризующему — подавляет амплитуду сокращений и уменьшает их длительность вплоть до полного подавления сократимости. Гиперполяризующие толчки средней силы без предварительного, запускающего стимула не приводят к возникновению ПД и сокращений (при снятии такого гиперполяризующего тока развивается обычное анодразмыкательное возбуждение и сокращение). При сильном гиперполяризующем токе возникает контрактильный ответ типа контрактуры и его кинетика во многом отличается от кинетики деполяризующих контрактур. Во-первых, процесс инактивации развивается крайне медленно или вообще отсутствует. Во-вторых, при длительном действии сильного гиперполяризую-

шего 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 контрактура с крайне медленным расслаблением. Амплитуда этой анодразмыкательной контрактуры тем выше, чем больше длительность предшествующей гиперполяризации. После прекращения действия сильного гиперполяризующего тока и спада анодразмыкательной контрактуры амплитуда одиночных сокращений возвращается к нормальному уровню.

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. После прекращения действия деполяризующего тока кинетика фазы быстрой конечной реполяризации не отличается от кинетики этой фазы без тока. Гиперполяризующий ток укорачивает ПД за счет уменьшения длительности фазы плато, форма конечной быстрой реполяризации при этом не меняется. Характер взаимосвязи между длительностью толчков тока и длительностью ПД, а также между длительностью толчков тока и амплитудой сокращений имеет S — образный вид, т. е. при некоторой длительности толчка тока сокращение достигает максимального для данных условий уровня. При увеличении силы толчков тока увеличивается крутизна линейного участка, а также расширяется диапазон линейности. Линейная зависимость наблюдается только при «естественных» длительностях ПД (0,45—0,85) сек. Это указывает на то, что длительность удерживаемой деполяризации является важным фактором, определяющим сократимость миокарда.

Чувствительность миокарда к пропускаемому току во время ПД значительно выше, чем во время диастолы. Причем чувствительность к току в первой фазе ПД (0,1—0,4 сек после регенеративной деполяризации) значительно выше, чем в последующих фазах. Чувствительность сокращений к деполяризующему току значительно выше, чем чувствительность к гиперполяризующему току.

Из результатов приведенных экспериментов следует, что амплитуда и длительность сокращений являются функцией длительности ПД, генерируемых на мембране. Этот вывод является особенно важным, если учесть, что длительность ПД подвержена существенным изменениям при вариациях ритма сердцебие-

ний, которое сопровождается хронотропными сдвигами. Можно считать, что сократимость миокарда при различных ритмах сердечбиений регулируется через изменение длительности ПД.

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

Как и в случае одиночных сокращений деполяризующие толчки тока небольшой длительности приводят к устойчивому увеличению амплитуды сокращений в ритмическом ряду. Гиперполяризующие толчки тока устойчиво подавляют амплитуду сокращений. Толчки тока, прикладываемые синхронно с импульсами стимуляции, принципиально изменяют ход переходных характеристик. Характерной лестницы Боудича, которая наблюдается в ряду сокращений в нормальном растворе, здесь не отмечается.

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 ($T=5\div 10$ сек) и небольших значениях фиксирующего тока ($I_d=0,2$ ма $t_u=0,4$ 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 в ритмическом ряду усиливается. Таким образом, деполяризующий ток оказывает двойное влияние на сократимость миокарда: увеличивает силу сокращений в момент его приложения и увеличивает скорость падения сокращений в ритмическом ряду. Оба эффекта увеличиваются при возрастании длительности или интенсивности деполяризующего тока. Гиперполяризующий ток подавляет сократимость 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.

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

Изменения сократимости выражены значительно сильнее, если ритмическая стимуляция производится на фоне постоянного гиперполяризующего и деполяризующего тока. После снятия постоянного гиперполяризующего тока сокращения, которые первоначально были подавлены, резко возрастают. Причем, абсолютная величина первых сокращений может быть выше установившегося значения фоновых сокращений. Постоянный деполяризующий ток вызывает увеличение силы сокращений, а затем постепенное их падение. На снятие деполяризующего тока первоначально наблюдается еще большее снижение амплитуды сокращений, которые затем очень медленно возвращаются к своему исходному уровню.

Исследования с одновременной регистрацией механической и электрической активности и приложением деполяризующих толчков тока показали, что сила сокращений в ритмически работающем миокарде аналогично единичным сокращениям регулируется посредством изменения длительности ПД, причем эффекты последствия фиксирующего тока очень тесно связаны с изменением длительности ПД. 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 снятия тока выражен сильнее.

Облегчение сокращений как функции времени между фоновым и тестирующим импульсами в нормальном растворе описывается формулой

$$P_{(T)} = A(1 - e^{-\alpha T})e^{-\beta T} \quad (1)$$

где T — время (расстояние между фоновым и тестирующим импульсами);

α , β — параметры облегчения;

A — некоторая константа.

Исследование облегчения в различных режимах фиксации тока показало, что влияние деполяризующего и гиперполяризующего тока на процессы последствия выражено уже после однократного воздействия тока.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ И НАТРИЯ В ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКОМ СОПРЯЖЕНИИ МИОКАРДА

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

Увеличение ионов кальция в растворе (до 2 мМ) приводит к увеличению силы сокращений и более сильному изменению этих сокращений при действии деполяризующих и гиперполяризующих толчков тока. Дальнейшее увеличение концентрации кальция (до 5 мМ и более) приводит к еще большему увеличению амплитуды сокращений, однако однократные деполяризующие толчки той же силы становятся неэффективными. Гиперполяризующие толчки тока могут подавлять сокращения до тех же величин, что и в нормальном растворе. S — образная зависимость амплитуды сокращений от длительности толчков гиперполяризующего и деполяризующего тока, наблюдаемая в нормальном растворе, смещается вверх, причем производная $\frac{dA}{dtu}$ (где A — амплитуда сокращения, а tu — длительность толчков тока) для линейного участка становится значительно больше, чем в нормальном растворе. Эти изменения тем заметнее, чем больше величина фиксирующего тока. Однако, если постепенное увеличение силы деполяризующего тока в нормальном растворе приводит сначала к увеличению только амплитуды быстрых контрактных ответов на фоне постоянного тока, а затем и к появлению ответа типа контрактуры, то в гиперкальциевом растворе ток той же силы приводит к еще большему увеличению амплитуды сокращений, в то время как контрактуры практически не наблюдается. Контрактура от гиперполяризующего тока в гиперкальциевом растворе также значительно ниже, чем в нормальном растворе. Интересно, что все эффекты последствия в гиперкальциевом растворе выражены значительно сильнее.

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

При низких частотах стимуляции ($T=10 \div 5$ сек) снижение натрия в растворе до 50 мМ повышает амплитуду сокращений и практически не влияет на лестничный эффект Боудича. Максимум сокращения наблюдается на 5—6 сокращении. Деполяризующие толчки тока становятся более эффективными. Как и в нормаль-

ном растворе, они повышают амплитуду сокращений, однако эффекты последствия толчков тока практически остаются без изменений. При прочих равных условиях в гипонатриевом растворе, особенно при гиперполяризующих толчках тока, инактивация сокращений меньше. Увеличение длительности деполяризующих толчков тока ведет к увеличению амплитуды сокращений и одновременно усилению их инактивации во времени. Снижение концентрации натрия в растворе сместило S-образную зависимость амплитуды сокращений от длительности толчков тока в сторону увеличения амплитуды сокращений и в сторону гиперполяризующих токов. Производная $\frac{dA}{dt}$ в отличие от гиперкальциевых растворов, остается практически без изменения.

3. Влияние тетродотоксина и строфантина на электромеханическое сопряжение миокарда

Известно, что тетродотоксин (ТТХ) обладает специфическим действием по отношению к натриевому каналу, не изменяя проницаемости ионов по другим каналам гетерогенных мембран. Ходоров Б. И., Варновицкий Е. П. (1967), Као (1967) и Nagiwaга, Nakajima (1966) показали, что тетродотоксин блокирует быстрый натриевый канал, а строфантин уменьшает скорость выхода натрия из клетки, что способствует изменению процессов накопления ионов внутри и оказывает существенное воздействие на электрическую и механическую активность миокарда. Ввиду сказанного, эти вещества являются хорошим инструментом при изучении механизмов электромеханического сопряжения, в том числе и при использовании метода фиксации тока. Тетродотоксин использовался в концентрации 1×10^{-7} г/мл, строфантин — 1×10^{-5} г/мл (адреналин в концентрации 1×10^{-6} г/мл).

Начальным эффектом ТТХ было подавление сокращений при неизменности электрической активности, а затем проявление его действия и на ПД (уменьшение времени плато, падение overshота). Подавление ПД приводит к дальнейшему уменьшению амплитуды сократительного ответа. 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 overshот 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 посте-

ленно исчезает, уменьшается скорость деполяризации. Эффект ТТХ прогрессирует во времени. На пятой — шестой минутах ПД становятся abortивными, резко падает возбудимость, сокращения практически исчезают. Еще более выраженные изменения наблюдались при периоде стимуляции 1—1,2 сек. ТТХ настолько подавляет сократимость, что деполярирующий ток становится мало эффективным. 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 удлинялись под влиянием деполярирующих толчков тока. Увеличение концентрации тетродотоксина до $(5-10) \times 10^{-7}$ г/мл приводит к тому, что влияние деполярирующих толчков тока исчезает практически после первого импульса. Характерным является то, что в растворе с ТТХ гиперполяризующая контрактура не возникает. Деполяризующая контрактура имеет меньшую величину и не содержит быстрой фазы инактивации, что обычно наблюдается в нормальном растворе. Вычисление параметров, характеризующих временной ход потенциации после одиночного сокращения по формуле (1) 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 ($P = 0,05$).

Адреналин в растворе ТТХ, где электрическая и механическая активность полностью подавлены, восстанавливает ПД и сократимость. Деполярирующие толчки тока в растворе ТТХ + адреналин удлиняют ПД, но практически не влияют на механическое напряжение. Восстанавливающее действие адреналина на фоне ТТХ имеет взрывной характер, т. е. через 1—3 мин. после его добавления амплитуда сокращений сразу достигает максимальной величины. При этом оказывается восстановленной частотнозависимая потенциация сокращений, лестница Боудича и другие хроноинотропные феномены. Восстанавливающее действие адреналина выражено значительно сильнее, если опыт проводится на фоне повышенной концентрации натрия. При концентрации ТТХ 1×10^{-6} г/мл адреналин даже в повышенной концентрации не оказывает своего действия.

Ионы кальция (5 мл), добавленные в растворе 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 кратковременен. При среднем ритме стимуляции (0,2—0,1/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 тетродотоксина добавлялся строфантин, который в нормальном растворе обладает выраженным инотропным действием. В растворе с тетродотоксином строфантин усиливает ингибирующее действие ТТХ на электрическую и механическую активность. Любопытно, если к раствору с тетродотоксином, в котором была полностью подавлена механическая активность и чувствительность миокарда к толчкам тока, добавить строфантин, чувствительность к току той же силы частично восстанавливается. Строфантин активизирует сократимость миокарда при одиночных раздражениях, но ведет к быстрой ее инактивации в ритмическом ряду при высоких частотах стимуляции. Деполяризующие толчки тока при действии строфантина ускоряют подавление сокращений.

ОБСУЖДЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

В работе В. Я. Изакова (1968) было выдвинуто представление, что длительность ПД определяется скоростью работы натриевого насоса (К—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 функ-

цией 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 и скорость, и длительность реполяризации в фазу плато. При ритмической стимуляции имеется накопление некоторого количества натрия в прислое 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 сокращения их концентрация падает и влияние на последующие ПД свободных ионов кальция должно сказываться лишь при достаточно малых периодах стимуляции. Таким образом, примембранные концентрации ионов натрия и кальция могут быть регуляторами длительности ПД.

Мы полагаем, что деполяризующие толчки тока смещают мембранный потенциал, так что уровень, с которого начинается электрогенное выталкивание натрия, повышается, а уровень срабатывания регенеративной деполяризации остается постоянным. Это должно увеличивать длительность ПД. Обратная 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.

Повышение механического напряжения при действии деполяризующих толчков тока связано с увеличенным входом ионов кальция из внеклеточной среды и/или высвобождением ионизированного кальция из некоторых внутриклеточных мест связывания. Для желудочка лягушки, где имеются лишь рудименты саркоплазматического ретикулюма, основной внутриклеточный кальций, по-видимому, находится в субсарколеммальном 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 входящий ион кальция частично идет непосредственно к миофиламентам, а частично связывается с рецептором R у внутренней поверхности мембраны. Высвобождение кальция при деполяризации определяется концентрацией ионов натрия у внутренней поверхности мембраны. Высвобождение кальция ~~CaR диссоциирует хуже, при наличии натрия (и при одновре-~~

менной деполяризации) высвобождение кальция из комплекса облегчается. Деполяризующий ток за счет увеличения длительности ПД приводит к увеличенному входу кальция из внеклеточной жидкости (большее время открытия кальциевого канала) и к повышенному высвобождению внутриклеточного кальция.

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 высвобождением кальция). С другой стороны, гиперполяризующий ток может увеличивать кальций — поглощающую емкость внутриклеточных мест связывания, при этом меньше кальция высвобождается 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 сокращения ритмического миокарда в течение некоторого времени больше нормальных.

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 указанные ионы 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 ее относительно медленной инактивацией.

Для объяснения влияния тока при ритмических сокращениях миокарда мы приняли во внимание, что накопление натрия внутри клетки активирует вход кальция во время возбуждения (Baker, Blaustein, Hodgkin, Steinhardt — 1969, Reuter, Seitz, 1968). Кроме того, натрий может обеспечить высвобождение кальция из комплекса CaR за счет конкуренции при очередном возбуждении. 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 Бюудича) при ритмической стимуляции миокарда после некоторого периода покоя объясняется динамикой накопления кальция 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 сокращения и длительность ПД после действия деполяризующих толчков тока, что сопровождается накоплением комплекса CaR в клетке и относительным уменьшением натрия в клетке по отношению к кальцию становится значительно меньше фоновых, можно полагать, что комплексе CaR непосредственно уменьшает длительность ПД. Такой механизм регуляции сократимости ритмически работающего миокарда хорошо согласуется с данными целого ряда авторов. Еще Hagiwara и Nakajim путем микроинъекций Ca^{++} обнаружили, что повышенная концентрация ионов кальция внутри клетки блокирует возбуждение. Значительные постэффekte деполяризующего и гиперполяризующего токов, а также то, что последствие от токовых воздействий проявляется уже после однократного приложения, свидетельствует о высокой лабильности внутриклеточных ионных взаимоотношений. Об этом же свидетельствуют эффекты, наблюдаемые в гиперкальциевом и гипонатриевом растворах.

Наиболее вероятным объяснением механизма действия ТТХ представляется предположение о конкурирующем взаимодействии ионов натрия и кальция не только на внешней (Lüttgau, Niedegerke — 1958), но и на внутренней стороне сарколеммальной мембраны. С учетом кальция — поглощающей емкости мембраны, т. е. ее свойств как катионообменной системы (Carvalho — 1956), зависящей от потенциала и содержания ионов натрия у внутренней ее поверхности ингибирующее действие ТТХ на ПД и сокращения может быть объяснено следующим образом. 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. 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) приводит к накоплению кальция в кальциевом мембранном депо, к падению возбудимости и подавлению ПД. Изменения выражены тем больше, чем выше частота сердечных биений, и чем больше предшествующих волн возбуждения на данной частоте имело место. Прогрессирующее падение сокращений при ритмическом раздражении связано, в дополнение к сказанному ранее, с ингибированием ПД.

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 внутриклеточную и концентрацию натрия и кальция.

Таким образом, изложенные данные свидетельствуют о важности внутриклеточных ионов, особенно у внутренней поверхности мембраны в регуляции электрической и механической активности ритмически работающего сердца.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ СОКРАЩЕНИЙ РИТМИЧЕСКИ РАБОТАЮЩЕГО МИОКАРДА

В модель заложены следующие основные положения:

1. Заброс ионизированного натрия $Na(t)$ задается почти ступенчатой функцией.

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.

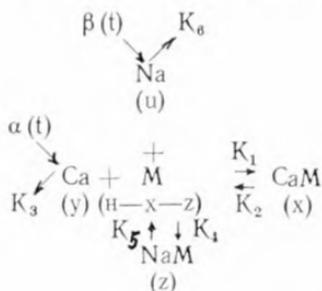
3. Величина сокращений прямо связана с числом комплексов CaM в миофиламентах, где M — рецептор, связывающий кальций.

4. Кальций и натрий после возбуждения выводятся из поля реакции.

5. Увеличение внутриклеточной концентрации натрия увеличивает количество кальция, поступающего в клетку при последующем возбуждении.

6. В модели заложена также конкуренция ионов натрия с кальцием за места связывания на уровне миофиламентов. Конкуренция идет по типу 2 иона натрия на один ион кальция. Реакции кальций — рецептор и натрий — рецептор являются обратимыми.

В основе предлагаемой упрощенной модели лежит открытая химическая реакция, схема которой представлена ниже:



Она описывается следующей системой дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned}
 \frac{dx}{dt} &= K_1(H - X - Z)(Y - Y_0) - K_2X, \\
 \frac{dy}{dt} &= K_2X - K_1(H - X - Z)(Y - Y_0) - K_3Y + \alpha(t), \\
 \frac{dz}{dt} &= K_4(H - X - Z)U^2 - K_5Z, \\
 \frac{du}{dt} &= K_5Z - K_4(H - X - Z)U^2 - K_6U + \beta(t), \\
 \alpha(t) &= \begin{cases} K_7(1 - e^{-ct_1}) & \text{при } t \leq T_1 = T_{\text{пд}} \\ K_7e^{-c_1t} & t > T_1 \end{cases}
 \end{aligned}$$

$$\beta(t) = \begin{cases} K_8(1 - e^{-c_2 t}) & \text{при } t \ll T_2 \\ K_8 e^{-c_2 t} & t > T_2 \end{cases}$$

$$\begin{cases} T_1 = K_9 - K_{10}Y(t') - K_{11}U(t') \\ K_7 = K_{12} + K_{13}U(t) \end{cases} \begin{cases} t' = T(n-1) \\ T - \text{период} \\ n - \text{номер импульса} \end{cases}$$

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

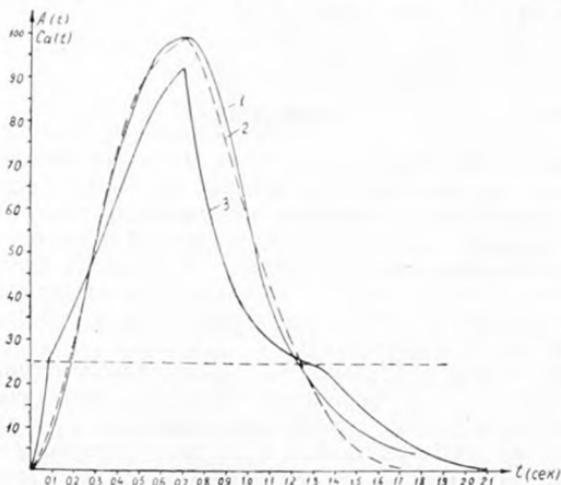


Рис. Сравнение опытных (кривая 1) и вычисленных на ЦВМ (2) кривых одиночных сокращений. Кривая 3—Ca(t).

щей активности $\beta(t)$, $Z(t)$, $U(t) = 0$, определялись так, чтобы функционал, определяемый через расхождение между опытными и теоретическими данными, был минимальным. Иными словами искалось решение системы, обеспечивающее

$$\min \left\{ F(x) = \sqrt{\sum_{j=1}^m [x(t_j) - X_p(t_j)]^2} \right\} = F(K_0).$$

Оптимизация велась методом случайного поиска. Дифференциальные уравнения решались методом Рунге—Кутты. Сравнение расчетных и экспериментальных данных представлено на рисунке. Функция вычислена при следующих значениях коэффициентов ($K_1=0,3$; $K_2=8$; $C_1=18$; $V_0=24$; $N=140$; $T_{пл}=T_1=0,7$; $K_7=677$).

Исследование математической модели миокарда на ЦВМ М-20 и аналоговой машине МН-10М показало, что модель достаточно хорошо воспроизводит большинство хронотропных явлений. Исследование модели подтвердило наше предположение о том, что хронотропные явления в миокарде могут быть обусловлены скоростью накопления и высвобождения свободных ионов натрия и кальция в миоплазме. На длительность заброса кальция в миоплазму оказывает влияние как внутренняя концентрация ионов натрия, так и кальция.

ВЫВОДЫ

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

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 гипонатриевом растворе зависимость длительности 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 гипонатриевом и гиперкальциевом растворах падает.

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

7. На ритмически работающем миокарде деполяризующий ток оказывает двойное влияние на сократимость — увеличивает силу сокращений и увеличивает скорость инактивации в ритмическом ряду. Гиперполяризующий ток подавляет сократимость в ритмическом ряду.

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

9. 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. Постанодическая сократимость миокарда в гиперкальциевом растворе увеличивается.

10. 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.

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. Деполяризующие толчки тока в растворе с тетродотоксином удлиняют потенциалы 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 инактивации в ритмическом ряду при высокой частоте стимуляции. Деполяризую-

щие толчки тока при действии строфантина ускоряют подавленные сокращения.

14. Адреналин, добавленный в раствор с тетродоксином, восстанавливает электрическую и механическую активность, но не восстанавливает чувствительность миокарда к току. Совместное действие адреналина и строфантина в растворе с тетродоксином 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 проницаемости мембранной концентрации ионов натрия и кальция, а также мембранного связанного кальция.

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

Диссертация напечатана на 215 страницах, содержит 7 глав и 72 рисунка. Список литературы включает 173 источника, из них 141 иностранные.

Работы по теме диссертации, опубликованные в печати

1. Катодные повторители для регистрации биоэлектрической активности гладкой мышцы. (Совместно с Изаковым В. Я., Мархасиным В. С., Орловым Р. С.). Материалы первой всесоюзной конференции по электронной аппаратуре для исследований в области высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. Москва—Иваново, 1966.

2. Устройство для программированного растяжения мышцы с регистрацией реакции полупроводниковым тензометрическим усилителем. (Совместно с Изаковым В. Я., Мархасиным В. С., Орловым Р. С.). Физиологический журнал СССР, 53, 598—600, 1967.

3. Установка для изучения связи возбуждения и сокращения клеток миокарда методом фиксации тока на мембране. (Совместно с Изаковым В. Я., Орловым Р. С.). Физиологический журнал СССР, 57, 318—321, 1971.

4. К действию тетродотоксина на электрическую и механическую активность ритмически работающего миокарда. (Совместно с Изаковым В. Я., Шелевевым В. М.). Физиологический журнал СССР, 57, 1471—1480, 1971.

5. Исследование электромеханического сопряжения в миокарде лягушочки лягушки методом фиксации тока. (Совместно с Изаковым В. Я.). Материалы симпозиума «Биофизика мембран», 24—28 сентября 1971, 300—308, Каунас, 1971.

6. Модель электромеханического сопряжения ритмически работающего миокарда (Совместно с Изаковым В. Я.). Материалы симпозиума «Биофизика мембран» 24—28 сентября 1971, 291—300, Каунас, 1971.

7. К изучению действия специфического блокатора натриевого переноса — тетродотоксина на электромеханическое сопряжение в клетках миокарда. (Со-

вместно с Шевелевым В. М., Изаковым В. Я., Орловым Р. С.), Материалы симпозиума «Биофизика мембран» 24—28 сентября 1971, 309—317, Каунас, 1971.

8. О возможности смены доминирующего электрогенеза в клетках миокарда лягушки под влиянием двухвалентных катионов. (Совместно с Орловым Р. С., Изаковым В. Я., Ведерниковым Ю. П.), Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 53.194—201.1972.

9. Исследование электрической и механической активности в миокарде желудочка лягушки методом фиксации тока. (Совместно с Изаковым В. Я., Орловым Р. С.). Физиологический журнал СССР 58.6.1972.

10. Исследование роли ионов натрия в электромеханическом сопряжении в клетках миокарда. Труды Международного Биофизического Конгресса. Москва, 1972.

НС 41005 Подписано к печати 25/IX-72 г.
Объем 1,5 п. л. Тираж 150

Формат 60×84¹/₁₆
Заказ 405

Цех № 1 производственного объединения «Полиграфист»,
Свердловск, М.-Сибиряка, 145