

УДК 612.73:612.467.1:612.014.42

Н. Г. Кочемасова

РОЛЬ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ФОРМИРОВАНИИ ПЛАТО ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК МОЧЕТОЧНИКА В БЕЗНАТРИЕВОМ РАСТВОРЕ

Потенциал действия (ПД) гладкомышечных клеток (ГМК) мочеточника состоит из пиковой компоненты, обусловленной прохождением ионов кальция через быстрые кальциевые каналы, и плато [3—6, 9—12]. Однако, несмотря на многочисленные исследования, посвященные электрогенезу ГМК мочеточника, природа плато ПД этих клеток до сих пор остается неясной. Данные о том, что в безнатриевом растворе плато исчезает, и ПД приобретают форму простых пиковых потенциалов, указывают на преобладающее значение увеличения натриевой проницаемости мембраны в формировании плато ПД [3, 9]. В то же время в безнатриевом растворе в присутствии ионов марганца, которые являются блокаторами не только быстрого входящего кальциевого, но и выходящего калиевого тока [5—7], амплитуда и продолжительность ПД увеличиваются, а скорость нарастания его замедляется [10]. Наличие выраженного плато ПД в отсутствие ионов натрия в наружном растворе дает возможность предположить, что в его формировании принимают участие другие катионы наружного раствора, способные создавать входящий ток, в частности, катионы кальция. Чтобы проверить это предположение нами была исследована электрическая и сократительная активность ГМК мочеточника при различных концентрациях ионов кальция в безнатриевом внеклеточном растворе в присутствии тетраэтиламмония (ТЭА), который применяли для подавления выходящих потенциалозависимых калиевых токов.

Методика исследований

Исследования проводили на изолированных отрезках мочеточника морской свинки длиной 5—6 мм с помощью метода двойного сахарозного мостика с одновременной регистрацией электрической и сократительной активности ГМК [1]. Для отведения электрических потенциалов и раздражения мышечной полоски использовали хлорсеребряные электроды. Контакт между электродами и мышцей осуществляли через агровые мостики. Раздражение полоски производили прямоугольными импульсами постоянного тока продолжительностью 1—5 с. В исследованиях использовали растворы Кребса и Рингера—Локка. Состав раствора Кребса (в миллиолях на 1 л бидистиллированной воды): NaCl — 120,4; KCl — 5,9; NaHCO₃ — 15,5; MgCl₂ — 1,2; NaH₂PO₄ — 1,2; CaCl₂ — 2,5; глюкоза — 11,5. Состав раствора Рингера—Локка: NaCl — 154,0; KCl — 5,6; CaCl₂ — 2,2; NaHCO₃ — 1,3; глюкоза — 5,6. В безнатриевых растворах Кребса и Рингера—Локка ионы натрия, кроме тех, которые входили в состав буфера NaH₂PO₄, заменяли в эквивалентных количествах сахарозой. ТЭА применяли в концентрации 5×10^{-3} моль, верапамил — 10^{-9} — 10^{-5} моль. Температуру тестирующих растворов поддерживали в пределах 34—35 °C.

Результаты исследований

На рис. 1 показаны ПД ГМК мочеточника в нормальном растворе Кребса (рис. 1, а) и при замене ионов натрия в омывающем растворе сахарозой (рис. 1, б). Как видно из рисунка, в безнатриевом растворе в ГМК мочеточника возникали спонтанные ПД, которые имели форму простых пиковых ПД. Такая форма ПД могла поддерживаться на протяжении 20—30 мин и более. В дальнейшем спонтанная активность прекращалась, однако, такие же ПД могли быть вызваны при действии

на полоску деполяризующего тока (анод).

При добавлен (5×10^{-3} моль) фосфата кальция удалось увеличение действия ТЭА как появление плато,

Рис. 1. Влияние ТЭА на активность ГМК (а — активность ГМК в нормальном растворе Кребса; б, г, д — то же в ответ на действие деполяризующего тока)

кращением (рис. 1, г) и при этом ПД вновь становились спонтанными на протяжении 20 мин действия ТЭА. Активность ГМК мочеточника (г) в вызванных ПД уменьшилась, но ПД длились и сокращением (рис. 1, д).

В следующей серии опытов ПД и сокращения ГМК мочеточника были зарегистрированы в присутствии ионов кальция от действия деполяризующего тока (рис. 2, А). Амплитуда пикового ПД находилась в линейной зависимости от концентрации ионов кальция (рис. 2, Аа, а1). Скорость нарастания ПД увеличивалась при повышении концентрации ионов кальция. В то же время длительность ПД уменьшилась при повышении концентрации ионов кальция. При увеличении концентрации ионов кальция также увеличилась амплитуда сокращения ГМК.

В последней серии опытов в присутствии блокаторов кальция и сократительную активность ГМК мочеточника в растворе Кребса и в присутствии

на полоску деполяризующего тока или при выключении гиперполярирующего тока (анодразмыкательный ПД).

При добавлении к омывающему безнатриевому раствору ТЭА (5×10^{-3} моль) форма ПД резко изменялась. Через 1—2 мин наблюдалось увеличение амплитуды ПД (рис. 1, в), а затем на 5—10 мин действия ТЭА как в спонтанных, так и вызванных ПД наблюдалось появление плато, причем такие ПД сопровождались длительным со-

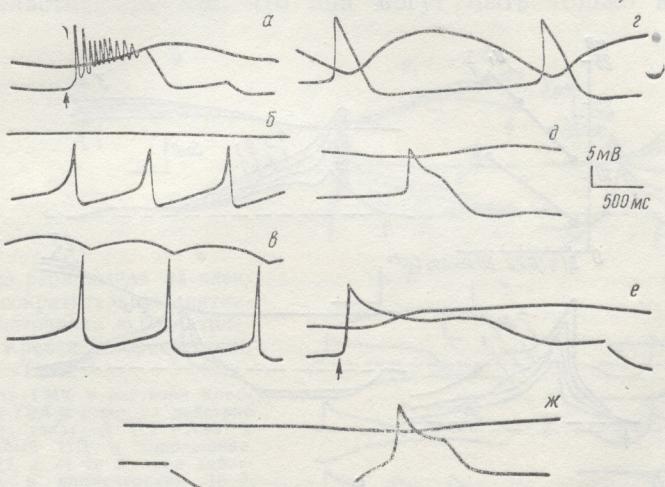


Рис. 1. Влияние ТЭА на электрическую (нижняя кривая) и сократительную (верхняя кривая) активность ГМК мочеточника морской свинки в безнатриевом растворе Кребса. *α* — активность ГМК в нормальном растворе Кребса в ответ на действие деполяризующего тока. Начало раздражения обозначено стрелкой; *β* — спонтанная активность ГМК в безнатриевом растворе Кребса; *γ*, *δ*, *ε* — то же на 2, 10 и 12 мин действия ТЭА (5×10^{-3} моль); *ж* — активность ГМК в ответ на действие деполяризующего тока и *ж* — анэлектротон (АЭТ) и анодразмыкательный ПД и сокращение на 15 мин действия ТЭА.

кращением (рис. 1, *г*—*ж*). При удалении ТЭА из омывающего раствора ПД вновь становились пиковыми. В большинстве опытов на 15—20 мин действия ТЭА наблюдалась незначительная деполяризация ГМК мочеточника (на 2—5 мВ); амплитуда как спонтанных, так и вызванных ПД уменьшалась, а длительность их увеличивалась. В ряде случаев ПД длились 3—5 с, сопровождаясь при этом столь же длительным сокращением (рис. 3, *а*, *1*).

В следующей серии экспериментов изучали зависимость амплитуды ПД и сокращения ГМК мочеточника в безнатриевом растворе Рингера—Локка и в присутствии ТЭА от наружной концентрации ионов кальция. На рис. 2 показано влияние изменения наружной концентрации ионов кальция от 0,1 до 20 ммоль на вызванные ПД при действии деполяризующего тока (рис. 2, *Аа*, *б* и 2, *Ба*) и на анодразмыкательный ПД (рис. 2, *Ав* и 2, *Бб*). Как видно из приведенных электрограмм, амплитуда пиковой компоненты ПД, а также амплитуда плато ПД находились в линейной зависимости от логарифма наружной концентрации ионов кальция в пределах от 0,1 до 20 ммоль кальция (рис. 2, *Аа*, *а₁*). Скорость нарастания пиковой компоненты ПД также увеличивалась при повышении наружной концентрации ионов кальция. В то же время длительность плато ПД при увеличении наружной концентрации ионов кальция от 0,1 до 20 ммоль изменялась незначительно. При увеличении наружной концентрации ионов кальция возрастила также амплитуда сокращения (рис. 2, *Аб*, *в*).

В последней серии экспериментов было проведено исследование влияния блокаторов кальциевых каналов верапамила на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника в безнатриевом растворе Кребса и в присутствии ТЭА. Данные этой серии опытов пред-

ставлены на рис. 3, из которого видно, что верапамил в концентрации 10^{-9} моль не оказывал влияния на скорость нарастания и на амплитуду пиковой компоненты ПД, но в то же время уменьшал продолжительность и амплитуду плато ПД и сокращения (рис. 3, а, 2 и 3, б, 2). При увеличении концентрации верапамила до 10^{-7} моль эти изменения были выражены еще более значительно (рис. 3, а, 3 и 3, б, 3). Следует отметить, что при этой концентрации верапамила наблюдалось неко-

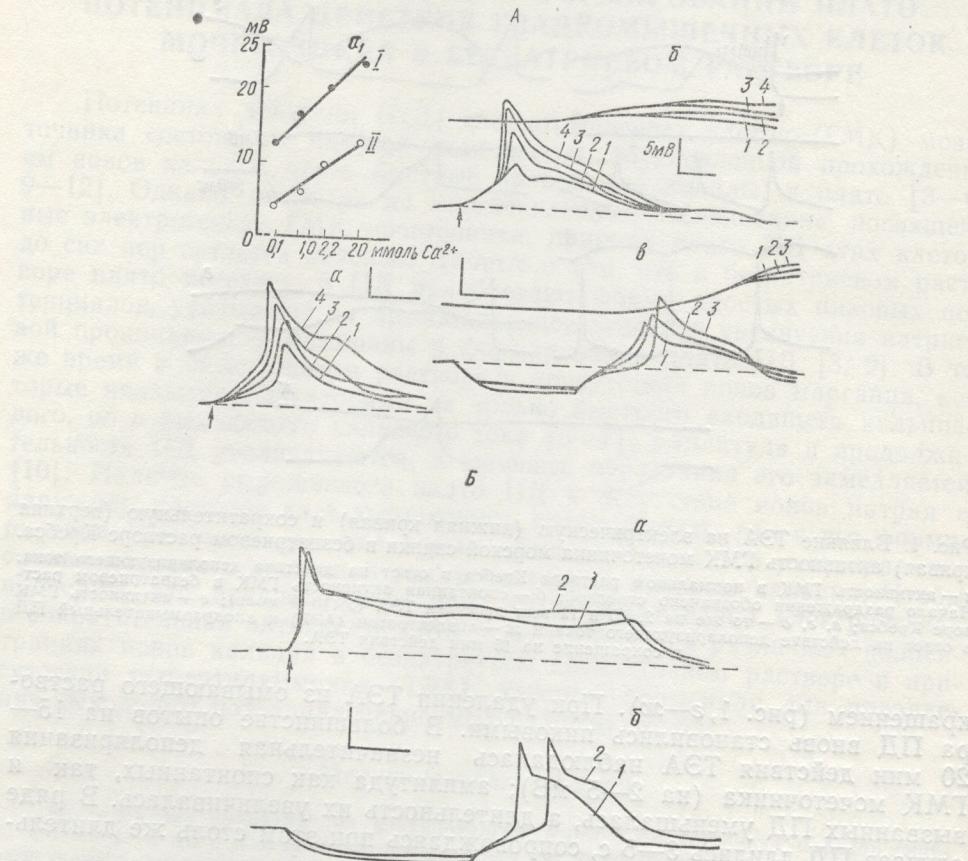


Рис. 2. Влияние увеличения наружной концентрации ионов кальция в безнатриевом растворе Рингера — Локка в присутствии ТЭА на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника морской свинки.

А. а — электрическая активность ГМК в ответ на действие деполяризующего тока при 0,1 (1); 0,5 (2); 2,2 (3) и 20,0 моль Ca^{2+} (4) в омывающем растворе; а' — график зависимости амплитуды пикового компонента ПД (1) и плато ПД (II) от логарифма наружной концентрации ионов кальция; б — электрическая и сократительная активность ГМК в ответ на действие деполяризующего тока при 0,1 (1); 0,5 (2); 2,2 (3); 10 моль Ca^{2+} (4) в омывающем растворе; в — АЭТ и анодразмыкателльный ПД и сокращение ГМК при 0,5 (1); 2,2 (2); 10 моль Ca^{2+} (3) в омывающем растворе. Б. а — электрическая активность ГМК в ответ на действие деполяризующего тока и б — АЭТ и анодразмыкателльный ПД при 10 (1) и 20 моль Ca^{2+} (2) в омывающем растворе. Обозначения см. рис. 1.

торое уменьшение электротонических потенциалов. Дальнейшее увеличение концентрации верапамила до 10^{-5} моль приводило, наряду с уменьшением плато ПД, к снижению скорости нарастания и амплитуды ее пиковой компоненты (рис. 3, а, 4 и 3, б, 4). Верапамил в концентрации 10^{-5} моль приводил также к полному угнетению повторных ПД в ответ на действие деполяризующего тока, продолжительность сокращения при этом резко уменьшалась, и оно приобретало форму фазного ответа (рис. 3, а, 4). При этой концентрации верапамила наблюдалось также дальнейшее уменьшение электротонических потенциалов.

что
тень
тель
Уже
ПД,

тричес-
ность
вом ра-

а (1) —
са в при-
деполяр-
анодраз-
а (2, 3,
вии вер-
 10^{-7}
вставках
грамм
масштаб
отмечено
ка. Ос-

природ-
понент-
ческой
Вр-
зано с
кроме
250 мс,
волны д-
раженн-
ция че-

Поя-
раздраж-
поляриз-
Однако
тельных
зующего
метода
налов в
при поте-
ет эту и
продолжи-
вация ча-
ТЭА, во

Плат-
вие ТЭА,
ток, очеви-
вследстви-
тока. В н-

в концентрации и на амплитуду продолжительность ПД не изменялась (рис. 3, а, 2 и 3, б, 2). В эти изменения не наблюдалось никаких колебаний.

Обсуждение результатов исследований

Приведенные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что в определенных условиях (а именно, при блокаде выходящих потенциалозависимых калиевых токов ТЭА) можно получить ПД с длительным плато и в отсутствие ионов натрия в омывающем растворе. Уже сам факт, что в безнатриевом растворе наблюдаются продленные ПД, свидетельствует о том, что они могут быть только кальциевой

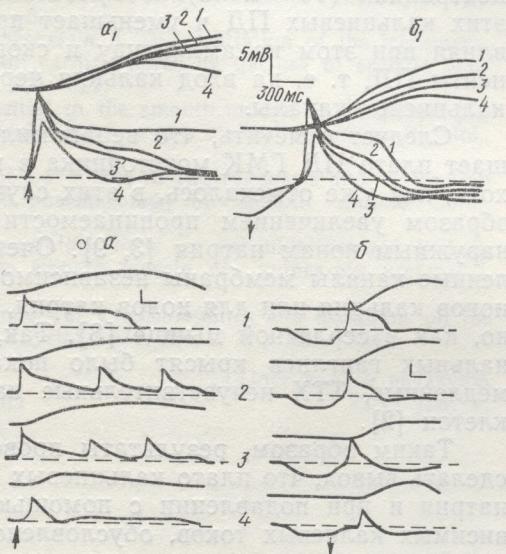


Рис. 3. Влияние верапамила на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника в безнатриевом растворе Кребса в присутствии ТЭА.

а (1) — активность ГМК в растворе Кребса в присутствии ТЭА в ответ на действие деполяризующего тока; б (1) — АЭТ и анодразмыкальный ПД и сокращение. а (2, 3, 4) и б (2, 3, 4) то же при действии верапамила в концентрации 10^{-9} , 10^{-7} и 10^{-5} моль соответственно. На вставках а₁ и б₁ — совмещены электрограммы а_{1,2,3,4} и б_{1,2,3,4} в увеличенном масштабе. Стрелкой, направленной вниз, отмечено выключение поляризующего тока. Остальные обозначения см. рис. 1.

природы. Это также подтверждается тем, что амплитуда пиковой компоненты и амплитуда плато этих ПД находятся в прямой логарифмической зависимости от наружной концентрации ионов кальция.

Вряд ли можно считать, что плато является удлинением ПД и связано с замедленной инактивацией быстрого кальциевого тока, так как кроме расширения пиковой компоненты (ее спад замедляется до 200—250 мс) наблюдается также появление следующей продолжительной волны деполяризации, собственно и представляющей собой хорошо выраженное плато, и, вероятно, обусловленной прохождением ионов кальция через дополнительные медленные каналы.

Появление ПД с продолженными плато не было связано со способом раздражения ГМК мочеточника. Они появлялись как при действии деполяризующего тока, так и при выключении гиперполяризующего тока. Однако следует отметить, что продолжительность плато анодразмыкальных ПД составляла примерно 1,0—1,5 с, а при действии деполяризующего тока плато были более длительными (2,0—3,0 с). С помощью метода фиксации напряжения было показано, что часть калиевых каналов в ГМК мочеточника находится в инактивированном состоянии при потенциале покоя, и кондиционирующая гиперполяризация удаляет эту инактивацию [6], исходя из этого одной из причин меньшей продолжительности плато анодразмыкальных ПД могла быть активация части калиевых каналов, которые не были заблокированы ТЭА, во время действия гиперполяризующего тока.

Плато ПД нельзя обнаружить в безнатриевом растворе в отсутствие ТЭА, так как в этих условиях медленный входящий кальциевый ток, очевидно, настолько мал по величине, что он не может проявиться вследствие значительно большего по величине выходящего калиевого тока. В нормальных же условиях медленный входящий натриевый ток достаточно большой, чтобы генерировать плато ПД, и продолжительность

ность плато определяется соотношением между входящим натриевым и выходящим калиевым токами.

Наше предположение о том, что ионы кальция могут формировать плато ПД, проходя через медленные каналы, подтверждают опыты с применением блокатора медленных кальциевых каналов — верапамила. При исследовании действия верапамила на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника в безнатриевом растворе и в присутствии ТЭА было обнаружено, что верапамил в очень малых концентрациях (10^{-9} моль) избирательно и эффективно подавляет плато этих кальциевых ПД и уменьшает продолжительность сокращения, не влияя при этом на амплитуду и скорость нарастания пиковой компоненты ПД, т. е. на вход кальция через быстрые потенциалозависимые кальциевые каналы.

Следует отметить, что верапамил (10^{-9} — 10^{-7} моль) также уменьшает плато ПД ГМК мочеточника в нормальном растворе Кребса [4], хотя, как уже отмечалось, в этих случаях плато определяется главным образом увеличением проницаемости мембранны мышечных клеток к наружным ионам натрия [3, 9]. Очевидно, верапамил блокирует медленные каналы мембранны независимо от того, проницаемы ли они для ионов кальция или для ионов натрия, или для обоих ионов одновременно, как в сердечной мышце [8]. Так, на изолированных клетках спинальных ганглиев крысят было показано, что верапамил блокирует медленные, TTX нечувствительные натриевые каналы мембранны этих клеток [2].

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод, что плато кальциевых ПД в отсутствие наружных ионов натрия и при подавлении с помощью ТЭА выходящих потенциалозависимых калиевых токов, обусловлено прохождением наружных ионов кальция через медленные кальциевые каналы. В нормальных условиях решающее значение в формировании плато ПД ГМК мочеточника имеет увеличение натриевой проницаемости мембранны.

N. G. Kochemsova

THE ROLE OF CALCIUM IONS IN FORMATION
OF THE ACTION POTENTIAL PLATEAU OF THE URETER SMOOTH
MUSCLE CELLS IN SODIUM-FREE SOLUTION

Summary

Experiments were performed on isolated guinea-pig ureter muscle strips using a double sucrose-gap method. Action potentials (APs) consisting of a spike component and a plateau were recorded. The amplitude of the spike and plateau components depended on the logarithm of the calcium ion external concentration. Verapamil (10^{-9} M) selectively blocked the plateau of these APs and decreased the duration of contraction. It is supposed that under these conditions the AP plateau may be due to passing of external calcium ions through slow channels. Under normal conditions the formation of the AP plateau is mainly due to passing of sodium ions through slow channels.

Department of Neuromuscular Physiology,
A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev

Список литературы

1. Артеменко Д. П., Шуба М. Ф. Методика дослідження електрических властивостей нервових і м'язових волокон за допомогою поверхневих позаклітинних електродів.—Физiol. журн., 1964, 10, № 3, с. 403—407.
2. Веселовский Н. С., Костюк П. Г., Цындренко А. Я. Разделение ионных токов, ответственных за генерацию ПД в соматической мембране нейронов спинальных ганглиев новорожденных крысят.—Докл. АН УССР, 1979, 249, № 6, с. 1466—1470.
3. Кочемасова Н. Г. Роль ионов натрия и кальция в генерации потенциалов действия в

гладких мышечных к.
1971, 72, № 9, с. 9—13.

4. Шуба М. Ф., Таранен памила на электрограф журн. СССР, 1980, 64,
5. Bury V. A., Shuba M. F. Effect of verapamil on the smooth muscle of the guinea-pig ureter during excitation.—Pflüg. Arch., 1977, 364, p. 32—38.
6. Bury V. A. Superposition of the action potential of the smooth muscle of the guinea-pig ureter during excitation.—In: *Smooth Muscle Cells*, New York, 1977, p. 147—153.
7. Inomata H., Kao C. Y. Effect of verapamil on the smooth muscle of the guinea-pig ureter.—Jpn. J. Physiol., 1977, 27, 1, p. 18—24.
8. Kohlhardt M., Bauer E. Effect of verapamil on the smooth muscle of the guinea-pig ureter.—Pflüg. Arch., 1977, 364, p. 32—38.
9. Kuriyama H., Tomita I. Effect of verapamil on the smooth muscle of the guinea-pig ureter.—Pflüg. Arch., 1977, 364, p. 32—38.
10. Shuba M. F., Kochemsova. Effect of verapamil on the smooth muscle of the guinea-pig ureter.—Pflüg. Arch., 1977, 364, p. 32—38.
11. Shuba M. F. The effect of verapamil on the smooth muscle of the guinea-pig ureter.—Pflüg. Arch., 1977, 364, p. 32—38.
12. Shuba M. F. Mechanism of the action of verapamil on the smooth muscle of the guinea-pig ureter.—Pflüg. Arch., 1977, 364, p. 32—38.

Отдел нервно-мышечной физиологии
Института физиологии им.
АН УССР, Киев

- гладких мышечных клетках мочеточника.— Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1971, 72, № 9, с. 9—13.

 4. Шуба М. Ф., Тараненко В. М., Кочемасова Н. Г. Действие ионов марганца и верапамила на электрогенез и сокращение в гладких мышцах мочеточника.— Физiol. журн. СССР, 1980, 64, № 8, с. 1209—1216.
 5. Bury V. A., Shuba M. F. Transmembrane ionic currents in smooth muscle cells of ureter during excitation.— In: Physiology of smooth muscle. New York, 1976, p. 65—77.
 6. Bury V. A. Superposition of inward and outward currents in the ureter smooth muscle during excitation.— In: Physiology and pharmacology of smooth muscle. Sofia, 1977, p. 32—38.
 7. Inomata H., Kao C. Y. Ionic currents in an intestinal smooth muscle.— In: Physiology of smooth muscle. New York, 1976, p. 49—53.
 8. Kohlhardt M., Bauer B., Krause H., Fleckenstein A. Differentiation of the transmembrane Na and Ca channels in mammalian cardiac fibres by the use of specific inhibitors.— Pflüg. Arch., 1972, 335, N 4, S. 309—322.
 9. Kuriyama H., Tomita T. The action potential in the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli and ureter studied by the double sucrose-gap method.— J. Gen. Physiol., 1970, 55, N 2, p. 147—162.
 10. Shuba M. F., Kochemassova N. G. Role of Ca^{++} ions in electrogensis and contraction of smooth muscle.— In: Physiology and pharmacology of smooth muscle. Sofia, 1977, p. 18—24.
 11. Shuba M. F. The effect of Na and K free solution, ionic current inhibitors and ouabain on electrophysiological properties of the smooth muscle of guinea-pig ureter.— J. Physiol., 1977, 264, N 3, p. 837—864.
 12. Shuba M. F. Mechanism of excitatory action of catecholamines and histamine on the smooth muscle of guinea-pig ureter.— J. Physiol. 1977, 264, N 3, p. 853—864.

Отдел нервно-мышечной физиологии
Института физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Поступила в редакцию
22 VI 1981 г.