

1. Балденков Г. Н., Меньшиков М. Ю., Феоктистов И. А., Ткачук В. А. Действие нейротропных соединений на кальмодулин- и тропонин С-зависимые процессы // Биохимия.— 1985.— № 8.— С. 16—21.
2. Богданов К. Ю., Захаров С. И., Розенштраух Л. В. Изменение возбудимости клеточной мембраны во время осцилляции тонуса папиллярной мышцы морской свинки // Физиол. журн. СССР.— 1980.— 66, № 6.— С. 859—865.
3. Капелько В. И., Горина М. С. Реституция сократимости в изотоническом и изометрическом режимах работы сердечной мышцы // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1983.— № 3.— С. 3—5.
4. Капелько В. И., Горина М. С. Катионная регуляция сокращения и расслабления миокарда при увеличении частоты сокращений // Бюл. ВКНЦ.— 1984.— № 1.— С. 26—31.
5. Cheung W. J. Calmodulin: an overview // Fed. Proc.— 1982.— 65, N 7.— P. 2258—2264.
6. Cohen C. J., Fozzard H. A., Sheu S. S. Increase in intracellular sodium ion activity during stimulation in mammalian cardiac muscle // Circ. Res.— 1982.— 50, N 11.— P. 651—662.
7. Kirchberger M. A., Antonetz T. Calmodulin-mediated regulation of calcium transport and $(Ca^{2+} - Mg^{2+})$ -activated ATPase activity in isolated cardiac sarcoplasmic reticulum // J. Biol. Chem.— 1982.— 10.— P. 5685—5691.
8. Langer G. A. The «Sodium pump lag» revisited // J. Mol. and Cell. Cardiol.— 1983.— 15, N 11.— P. 647—651.
9. Lipsius S. L., Fozzard H. A., Gibbons W. R. Voltage and time dependence of restitution in heart // Amer. J. Physiol.— 1982.— 12, N 1.— P. 68—76.
10. Masher D. Electrical and mechanical events in depolarized cardiac muscle fibres during low sodium perfusion // Pflug. Arch.— 1971.— 323.— P. 284—296.
11. Walsh M. P., Le Peuch C. J., Vallet B. et al. Cardiac calmodulin and its role in the regulation of metabolism and contraction // J. Mol. and Cell. Cardiol.— 1980.— 12.— P. 1091—1101.
12. Wendt I. R., Langer G. A. The sodium-calcium relationship in mammalian myocardium effect of sodium deficient perfusion on calcium fluxes // Ibid.— 1977.— 9.— P. 551—564.
13. Werth D. K., Hathaway D. R., Watanabe A. M. Regulation of phosphorylase kinase in rat ventricular myocardium: Role of Calmodulin // Circ. Res.— 1982.— 51.— P. 448—456.

Ин-т эксперим. кардиологии, Москва

Поступила 29.07.85

УДК 612.17:616.127—005.8:615.373.3:546.41

Г. А. Чередниченко, З. Д. Воробец, М. Д. Курский,
Г. И. Марченко, А. А. Мойбенко

О НЕКОТОРЫХ МЕМБРАННЫХ МЕХАНИЗМАХ НАРУШЕНИЙ ФУНКЦИИ СЕРДЦА ИММУННОГО ГЕНЕЗА

В настоящее время все большее внимание патофизиологов и клиницистов привлекают иммуноаллергические аспекты заболеваний сердечно-сосудистой системы. При различных заболеваниях сердца показаны появление в крови антикардиальных антител и их фиксация на тканях миокарда, а также высказаны предположения о патогенном действии иммунных факторов на сердце [2, 4, 6]. В экспериментальных исследованиях установлено, что под влиянием антикардиальных антител и сенсibilизированных лимфоцитов наблюдаются существенные нарушения коронарного кровообращения и сократительной функции миокарда, которые рассматриваются как следствие повреждающего действия иммунных факторов на мембраны кардиомиоцитов, что приводит, как предполагают, к нарушению ионного транспорта в сарколемме мышечных клеток сердца [8]. Вместе с тем доказательства этого положения в определенной мере являются косвенными и основаны на результатах морфологических [9] и электрофизиологических [13] исследований.

В связи с этим в настоящей работе проведено исследование изменений показателей ионного транспорта (интенсивности $Na^+ - Ca^{2+}$ -обмена и активности Na^+ , K^+ -АТФазы) в препаратах везикул сарколеммы кардиомиоцитов при иммунном повреждении сердца.

Проведены две серии экспериментов на собаках под хлоралозно-уретановым наркозом с сохранением естественных условий кровообращения и дыхания. Очаговое иммунное повреждение левого желудочка воспроизводили путем введения антикардиальной цитотоксической сыворотки (АКС, средний титр в РСК 1:800) в огибающую или нисходящую ветвь левой коронарной артерии, как детально описано ранее [5, 11].

В первой серии (9 собак) опытов до и после внутрикоронарного введения регистрировали следующие показатели кардио- и гемодинамики: системное артериальное давление (САД), давление в левом желудочке и его первую производную (dp/dt), индекс сократимости ($\frac{dp/dt_{\max}}{I_p}$) и ЭКГ в трех стандартных и усиленных отведениях. Через 2 ч после воспроизведения очагового иммунного повреждения левого желудочка грудную клетку животного вскрывали и из поврежденного (зона первичного действия антикардиальных антител) и контрольного участков левого желудочка брали ткань для последующего биохимического исследования. Во второй серии (6 собак) экспериментов сердце извлекали через 24 ч после его локального иммунного повреждения.

Из гомогенатов ткани контрольного и поврежденного участков левого желудочка получали высокоочищенную фракцию плазматических мембран кардиомиоцитов комбинацией методов дифференциального центрифугирования и центрифугирования в градиенте плотности сахарозы, описанной ранее [14], и модифицированной нами.

Для морфологического исследования осадки мембран фиксировали 2,5 %-ным раствором глутаральдегида, приготовленным на 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4) и постфиксировали в течение 1 ч при 4 °C 1 %-ным OsO_4 , приготовленным на фосфатном буфере. После этого производили обезвоживание препарата растворами этилового спирта повышающей концентрации и заключали в смесь эпон—аралдит. Тонкие срезы делали с помощью микротомы LKB 8800, окрашивали цитратом свинца и исследовали на микроскопе Jetm-7a.

Определяли биохимические показатели с помощью следующих описанных ранее методов: активность натрий-калиевой и азид-чувствительной АТФазы во фракции мембран [16], Na^+ , K^+ -АТФазы после предварительной обработки суспензии мембран детергентом додецилсульфатом натрия [16], Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы [22], 5'-нуклеотидазы [19]; содержание неорганического фосфата [23], белка методом Лоури.

Натрий-кальциевый обмен в препаратах сарколеммы регистрировался при 50-кратном разведении суспензии везикул (предварительно «нагруженных» 140 ммоль/л NaCl) в буфере, содержащем (в ммоль/л) 140 KCl, 0,05 $^{45}CaCl_2$, 20 Трис-HCl; pH 7,4 при 37 °C.

В контрольных опытах пассивное накопление $^{45}Ca^{2+}$ определялось в отсутствие градиента натрия (140 ммоль/л NaCl в среде разведения).

Через определенные интервалы времени аликвоты из реакционной среды быстро фильтровали через мембранный фильтр («Супрог» 0,3 мкм) и промывали холодным раствором, содержащим (в ммоль/л) 140 KCl, 10 $CoCl_2$, 20 Трис-HCl; pH 7,4. Радиоактивность на фильтре определяли с помощью сцинтилляционного счетчика «Beckman» LS 7000.

Количественно $Na^+ - Ca^{2+}$ -обмен определялся разностью значений накопления $^{45}Ca^{2+}$ при наличии и отсутствии градиента натрия.

Результаты обрабатывались методами вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

Результаты

Как показали проведенные исследования, внутрикоронарное введение 2,5—3 мл АКС сопровождалось развитием типичных признаков кардиоцитотоксического шока. Системное артериальное давление снижалось (в %) в среднем на $34 \pm 6,2$ ($P < 0,01$), давление в левом желудочке, $dp/dt_{\max}$ и $dp/dt_{\min}$ падали (в %) на $31,7 \pm 4$ ($P < 0,01$), $30,2 \pm 5,7$ ($P < 0,01$) и $35,2 \pm 1,9$ ($P < 0,01$) соответственно, а индекс сократимости — на $15,8 \pm 4,8$ ($P < 0,05$) по сравнению с исходным уровнем.

Несмотря на тенденцию к восстановлению в течение 0,5 ч наблюдения, нарушения кардио- и гемодинамики и сократительной активности миокарда сохранялись в течение всего периода наблюдений

и ко 2-му часу реакции достигали наиболее низких значений (рис. 1).

Изменения ЭКГ свидетельствовали о развитии очагового трансмурального повреждения миокарда, соответствующего месту введения АКС (передняя или задне-боковая стенка левого желудочка). Изменения ЭКГ увеличивались в течение последующих 24 ч наблюдения, сопровождаясь резкими нарушениями ритма сердца и проводимости в нем.

Из контрольного и поврежденного участков левого желудочка были получены изолированные фракции плазматических мембран, элек-

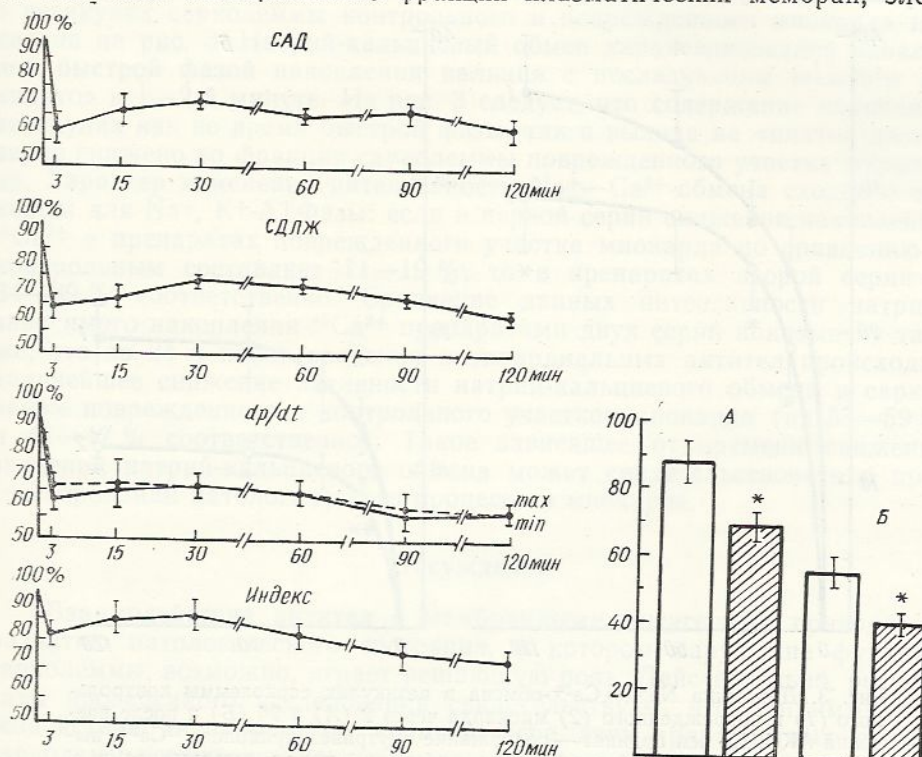


Рис. 1. Результаты изменений кардио-гемодинамики и сократительной активности миокарда при внутрикорономарном введении АКС. По оси абсцисс — время в минутах от момента введения

Рис. 2. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы в сарколемме контрольного (светлые столбики) и поврежденного (заштрихованные столбики) миокарда через 2 (А) и 24 (Б) ч после введения АКС. По оси ординат — активность фермента, выраженная в мкмоль Фн/мг/ч. $P < 0,01$.

тронно-микроскопическое исследование которых показало, что они имеют везикулярную структуру, при этом видимые морфологические отличия препаратов отсутствовали.

Меру чистоты определяли в препаратах, полученных из интактных сердец, на основании активности Na^+ , K^+ -АТФазы и 5'-нуклеотидазы — специфических ферментов, локализованных в сарколемме. Установлено (таблица), что мера очистки этих ферментов во фракции сарколеммы по отношению к гомогенату ткани составляет соответственно 12 и 10. Примеси мембран митохондрий, по-видимому, являются незначительными, так как мера очистки митохондриальной азид-чувствительной АТФазы не превышала 0,6. Такое же значение получено для Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы, однако оценка меры загрязнения фракции сарколеммы мембранами саркоплазматического ретикулума на основании активности этого фермента затруднительна ввиду наличия Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы и кальциевого насоса в сарколемме [17]. Показателем высокой чистоты препарата служит значение максимальной активности Na^+ — Ca^{2+} -обмена, составлявшее 27—48 нмоль Ca^{2+} /1 мг белка.

Предварительные результаты показывают, что получаемая фракция мембран также характеризуется высоким уровнем связывания специфического β -адренергического антагониста [^3H]-дигидроалprenолола.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о высокой чистоте и активности полученного препарата и согласуются с результатами, полученными при изучении аналогичных препаратов сарколеммы другими авторами [22, 24].

Результаты определения активности убаин-чувствительной Na^+ , K^+ -АТФазы в препаратах сарколеммы, выделенных из контрольного и поврежденного участков миокарда представлены на рис. 2. Активность

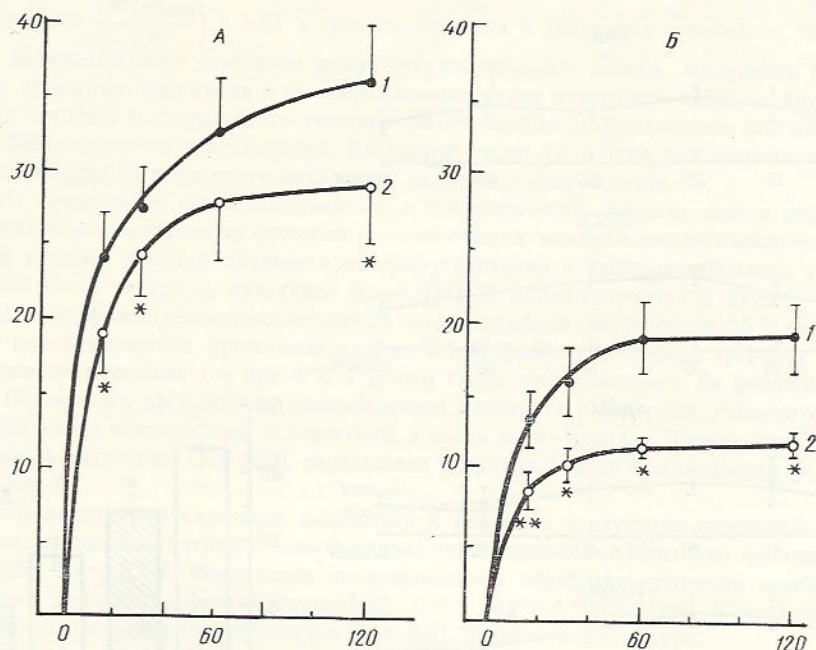


Рис. 3. Динамика $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена в везикулах сарколеммы контрольного (1) и поврежденного (2) миокарда через 2 (А) и 24 (Б) ч после введения АКС. По оси ординат — содержание внутривезикулярного $^{45}\text{Ca}^{2+}$, выраженный в нмоль/мг белка, по оси абсцисс — время, выраженное в с. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

фермента определяли в препаратах, предварительно обработанных додецилсульфатом Na — детергентом, который увеличивает проницаемость мембран для убаина и АТФ, тем самым приводя к максимальному проявлению активности Na^+ , K^+ -АТФазы [16]. Как следует из рис. 2, активность (в %) фермента во фракции сарколеммы поврежденного миокарда достоверно снижена — на $20,7 \pm 3,8$ ($P < 0,01$, $n = 6$) в первой и на $27,1 \pm 0,9$ ($P < 0,01$, $n = 4$) во второй сериях экспериментов по сравнению с соответствующим контролем. Таким образом, уже через

Активность маркерных ферментов во фракции сарколеммы и гомогенате интактного миокарда собаки, мкмоль Фн/мг белка/ч

Фермент	Сарколемма	Гомогенат	Сарколемма Гомогенат	n
Na^+ , K^+ -АТФаза*	$28,1 \pm 2,2$	$2,3 \pm 0,1$	12	4
5'-нуклеотидаза	$14,9 \pm 2,0$	$1,46 \pm 0,09$	10	4
Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза	$3,6 \pm 1,2$	$6,4 \pm 0,6$	0,6	3
Азид-чувствительная АТФаза	$8,9 \pm 0,5$	$15,5 \pm 2,0$	0,6	5

* Активность измерялась без обработки детергентом

2 ч после начала действия иммунного фактора активность одного из ключевых ферментов сарколеммы, ответственного за поддержание ионного гомеостаза клетки, снижается. Обращает на себя внимание также факт достоверного снижения активности фермента в сарколемме контрольного препарата второй серии по сравнению с первой в среднем на 36 % ($P < 0,01$) и более существенного ингибирования активности фермента (на 41 % исходного значения, $P < 0,001$) в препаратах, полученных из поврежденных зон левого желудочка через 24 ч после иммунного повреждения сердца.

Динамика натрий-зависимого накопления $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ($\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен) в везикулах сарколеммы контрольного и поврежденного миокарда показана на рис. 3. Натрий-кальциевый обмен характеризовался начальной быстрой фазой накопления кальция с последующим выходом на «плато» к 1—2-й минуте. Из рис. 3 следует, что содержание кальция в везикулах как во время быстрой фазы, так и выхода на «плато» достоверно снижено во фракции сарколеммы поврежденного участка миокарда. Характер изменения интенсивности $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмена сходен с таковым для Na^+ , K^+ -АТФазы: если в первой серии снижение накопления $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в препаратах поврежденного участка миокарда по сравнению с контрольным составляет 11—19 %, то в препаратах второй серии — 34—39 % соответственно. Сравнение данных интенсивности натрий-зависимого накопления $^{45}\text{Ca}^{2+}$ препаратами двух серий показывает также, что за 24 ч после введения антикардиальных антител происходит дальнейшее снижение активности натрий-кальциевого обмена в сарколемме поврежденного и контрольного участков миокарда (на 55—59 % и 41—47 % соответственно). Такое зависящее от времени снижение значений натрий-кальциевого обмена может свидетельствовать о прогрессировании патологического процесса в миокарде.

Обсуждение

Взаимодействие антител с мембранными антигенами приводит к развитию патологического состояния, в котором нарушение функции сарколеммы, возможно, играет решающую роль. Действительно, результаты проведенного исследования свидетельствуют, что при иммунном воздействии активность по крайней мере двух транспортных систем сарколеммы существенно изменена. Из факта снижения активности Na^+ , K^+ -АТФазы, являющейся ферментативным компонентом натрий-кальциевого насоса вытекает ряд важных следствий. Ингибирование Na^+ , K^+ -АТФазы должно вести к потере клеткой ионов калия и увеличению уровня внутриклеточного натрия. Как было показано ранее [7] такого рода сдвиги ионного обмена действительно могут происходить при иммунопатологии сердца. В экспериментах на изолированном перфузируемом кровью сердце собаки было обнаружено, что при введении АКС в коронарный кровоток значительно (уже в первые минуты реакции) повышается концентрация ионов калия в оттекающей от сердца венозной крови. Ранее быстрый выход калия показан Адо и соавт. [1] при аллергическом повреждении тонкого кишечника, а также при ишемии сердечной мышцы [20, 21]. Следует полагать, что это один из наиболее общих и быстро развивающихся признаков нарушения барьерной функции плазматической мембраны клетки, который может быть связан с возникновением нарушений ритма, возбудимости и проводимости, описанных ранее при ишемии миокарда [10, 21] и иммунном повреждении сердца [12].

Подъем уровня внутриклеточного натрия может стать причиной увеличения входа кальция в клетку через $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен, однако этот механизм, по-видимому, не реализуется в полной мере, поскольку $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмен при иммунном воздействии на сердце в значительной мере подавлен. Вместе с тем морфологические исследования показали, что при иммунном воздействии на сердце развиваются контрактуры миофибрилл [9], что является косвенным свидетельством нарушения

регуляции концентрации ионизированного Ca^{2+} в миоплазме. В основе этого явления могут лежать изменения в тех транспортных системах, которые обеспечивают удаление Ca^{2+} из цитоплазмы. Na^{+} — Ca^{2+} -обмен в сарколемме способен осуществлять трансмембранный перенос кальция с высокой скоростью в обоих направлениях и его вклад в снижение концентрации кальция в диастоле может быть существенным. В таком случае обнаруженное нами снижение активности этого механизма могло бы привести к уменьшению скорости изгнания кальция из клетки, чему также способствовали бы частичная деполяризация и уменьшение градиента натрия, вызванных ингибированием Na^{+} , K^{+} -АТФазы. Поскольку способность саркоплазматического ретикулула секвестрировать кальций не беспредельна, снижение скорости выброса кальция через Na^{+} — Ca^{2+} -обмен приведет к увеличению внутриклеточного уровня этого катиона в диастоле и уменьшению скорости расслабления. Следует отметить, что в наших опытах при введении АКС действительно происходило существенное снижение значений $dp/dt_{\min}$, причем эта реакция развивалась раньше, чем начинали изменяться другие показатели сократительной активности миокарда.

Важным представляется выяснение природы угнетения ион-транспортных механизмов сарколеммы кардиомиоцитов при иммунном воздействии на сердце. Комплексные функциональные и гистохимические исследования миокарда, проведенные ранее, показали, что наряду с иммунным компонентом (прямое или опосредованное через комплемент цитотоксическое действие антител на мембраны кардиомиоцитов) в патогенезе нарушений деятельности сердца иммунного происхождения принимают участие гипоксия миокарда [8], возникающая либо как следствие спазма коронарных сосудов, либо окклюзии сосудов сердца микротромбами [9]. Следует, однако, отметить, что сопутствующая иммунному воздействию на сердце гипоксия миокарда циркуляторного типа, по-видимому, не играет основной роли в нарушении процесса транспорта ионов через мембрану кардиомиоцитов. В особенности это относится к изменениям Na^{+} — Ca^{2+} -обмена. Как было показано в работе [18], даже тотальная гипоксия сердца в течение длительного срока (1 ч) не приводила к изменению активности Na^{+} — Ca^{2+} -обмена в сарколемме. В наших экспериментах нарушения коронарного кровообращения были гораздо менее существенны, напряжение O_2 в миокарде снижалось в среднем на 29 % его исходного значения [3] в течение первых 10—15 мин реакции, затем постепенно восстанавливалось. В ряде экспериментов гипоксические изменения ЭКГ наблюдались лишь в первые минуты реакции.

Обнаруженные нами изменения Na^{+} — Ca^{2+} -обмена были более выражены, чем при полной ишемии миокарда [15, 18], при которой отмечено снижение начальной скорости процесса. По-видимому это нельзя объяснить только нарушением кровоснабжения миокарда и следует с наибольшей вероятностью считать специфическим проявлением иммунного воздействия на структуры мембраны кардиомиоцитов, в частности, на блок-переносчик Na^{+} — Ca^{2+} -обмена.

Выводы

1. Развитие иммунного повреждения сердца, воспроизводимого путем внутрикоронарного введения антикардиальной цитотоксической сыворотки, сопровождается угнетением активности Na^{+} , K^{+} -АТФазы и Na^{+} — Ca^{2+} -обмена.

2. Угнетение Na^{+} — Ca^{2+} -обмена, по-видимому, является проявлением воздействия вводимых антител на белок-переносчик Na^{+} — Ca^{2+} -обмена.

SOME MEMBRANE MECHANISMS BREAKING IMMUNE
GENESIS HEART FUNCTION

The local immune heart damage produced in dogs by injection of anticardiac cytotoxic serum (ACS) into a branch of the left coronary artery results in a development of typical sings of the cardiocytotoxic shock. Na^+ , K^+ -ATPase and $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchange activities in sarcolemmal fraction obtained from the damaged myocardium 2 and 24 hours after ACS injection were reduced comparing to those found in the sarcolemma from the intact myocardium. Inhibition of these activities was more pronounced in the second group (24 hours). This may testify to a further development of pathological process in the myocardium.

The depression of the $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchange mechanism seems to be a result of the specific action of ACS on the sarcolemmal membrane.

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

1. Адо А. Д., Ишимова Л. М., Польшер А. А. Об аллергической альтерации гладкомышечных органов // Вестн. АМН СССР.— 1963.— № 4.— С. 8—20.
2. Алексеева Т. А., Медунцын Н. В. Аутоаллергия при экспериментальном инфаркте миокарда // Там же.— 1967.— № 2.— С. 43—45.
3. Березовский В. А., Сагач В. Ф., Бураков И. Е., Марченко Г. И. Зональные изменения напряжения кислорода, сократительной и электрической активности в миокарде при очаговом повреждении сердца // Физиология и патофизиология сердца и коронарного кровообращения: Тез. докл. I Всесоюз. симпозиум.— Киев: Наук. думка, 1983.— С. 10—11.
4. Виноградский О. В. Иммунологическое исследование при инфаркте миокарда и постинфарктном синдроме // Кардиология.— 1968.— № 8.— С. 37—41.
5. Горев Н. Н., Король С. А., Сагач В. Ф., Зайченко А. П. Экспериментальные цитотоксические некрозы миокарда: Моделирование и гемодинам. характеристика острого кардиоцитотокс. шока // Там же.— 1973.— № 2.— С. 11—18.
6. Кечкер М. И., Данилова Т. А., Калашникова Т. А., Сотскова Т. В. Клинико-иммунологические и электрокардиографические параллели при инфаркте миокарда // Там же.— 1976.— № 7.— С. 104—110.
7. Марченко Г. И., Чередниченко Г. А., Шабловская О. В., Воробец З. Д. К ионным механизмам нарушения функции сердца иммунного генеза // Актуальные проблемы современной физиологии.— Киев, 1985.— 298 с.
8. Мойбенко А. А., Попович Л. Ф. Коронарные сосуды и сократительный аппарат миокарда при иммунном повреждении сердца (гистохимические и ультраструктурные исследования) // Вестн. АМН СССР.— 1982.— № 7.— С. 58—64.
9. Попович Л. Ф. Характеристика морфо-функциональных изменений в миокарде и коронарных сосудах при локальном воздействии антикардиальных антител на сердце: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1980.— 24 с.
10. Фролькис В. В., Кульчицкий К. И., Милько В. Н., Кузьминская У. А. Коронарное кровообращение и экспериментальный инфаркт миокарда.— Киев: Наук. думка, 1963.— 455 с.
11. Хомазюк А. И., Нещерет А. П., Кузьминский Н. П. О некоторых новых путях экспериментального изучения инфаркта миокарда // Кардиология.— 1965.— № 4.— С. 19—23.
12. Шабловская О. В., Сагач В. Ф., Попович Л. Ф. Влияние на сердце иммунных сывороток различной специфичности // Физиол. журн.— 1985.— № 1.— С. 38—44.
13. Янций Р. И. Электрофизиологическое исследование действия антикардиальных антител на сердечную мышцу: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1980.— 25 с.
14. Bers D. M. Isolation and characterisation of cardiac sarcolemma // Biochim. et biophys. acta.— 1979.— 555, N 1.— P. 131—146.
15. Bersohn M. M., Philipson K. D., Fukushima J. Y. Sodium-calcium exchange and sarcolemmal enzymes in ischemic rabbit hearts // Amer. J. Physiol.— 1982.— 242, N 5.— P. 288—295.
16. Besch H. R., Jones L. R., Watanabe A. M. Intact vesicles of canine cardiac sarcolemma. Evidence from vectorial properties of Na^+ , K^+ -ATPase // Circulat. Res.— 1976.— 39, N 4.— P. 586—595.
17. Caroni P., Carafoli E. Regulation of Ca^{2+} -pumping ATPase of heart sarcolemma by a phosphorylation—dephosphorylation process // J. Biol. Chem.— 1981.— 256, N 18.— P. 9371—9373.
18. Daly M. J., Elz J. S., Nayler W. G. Sarcolemmal enzymes and $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchange in hypoxic, ischemic, and reperfused rat hearts // Amer. J. Physiol.— 1984.— 247, N 2.— P. H177—H185.
19. Edwards M. J., Maguire M. H. Purification and properties of rat heart 5'-nucleotidase // Mol. Pharmacol.— 1970.— 6, N 6.— P. 641—648.

20. Hill J. L., Gettes L. S. Effect of acute coronary artery occlusion on local myocardial extracellular K^+ activity in swine // *Circulation*.—1980.—61, N 4.—P. 768—778.
21. Hirche H. J., Franz C. H. R., Bos L. et al. Myocardial extracellular K^+ and H^+ increase and noradrenaline release as possible cause of early arrhythmias following acute coronary occlusion in pigs // *J. Mol. and Cell. Cardiol.*—1980.—12, N 6.—P. 579—593.
22. Jones L. R., Maddock S. W., Besch H. R., Jr. Unmasking effect of alamethicin on the (Na^+ , K^+) ATPase, β -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase, and cAMP-dependent protein kinase activities of cardiac sarcolemmal vesicles // *J. Biol. Chem.*—1980.—255, N 20.—P. 9971—9980.
23. Taussky H. H., Shorr E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus // *J. Biol. Chem.* 1953.—202, N 2.—P. 675—685.
24. Van Alstyne E., Burch R. M., Knickelbein R. G. et al. Isolation of sealed vesicles highly enriched with sarcolemma markers from canine ventricle // *Biochim. et biophys. acta.*—1980.—602, N 1.—P. 131—143.

Ин-т биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев
Ин-т физиологии им. А. А. Богомольца АН УССР, Киев

Поступила
26.04.85

УДК 612.17

В. И. Пидопличко, А. Н. Верхратский

ПАРАДОКСАЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ СНИЖЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО НАТРИЯ НА ПАРАМЕТРЫ ВХОДЯЩЕГО ТОКА В МЕМБРАНЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ

Результаты проведенных нами экспериментов на изолированных, внутриклеточно перфузированных кардиомиоцитах показали необычное действие низкой (10^{-13} — 10^{-10} моль/л) концентрации тетродотоксина, которое заключалось в увеличении амплитуды и изменении кинетики спада входящего ионного тока. Этот эффект был объяснен как следствие блокады тетродотоксином особого выходящего тока, переносимого анионами хлора и накладывающегося на входящий натриевый ток; подавление этого выходящего тока токсином должно приводить к возрастанию амплитуды регистрируемого входящего тока [1, 2]. Для подтверждения этого предположения мы предприняли попытку зарегистрировать хлорный ток в чистом виде путем устранения из внеклеточного раствора ионов натрия для исключения входящего натриевого тока. Однако замена ионов натрия во внеклеточных растворах непроницаемыми катионами привела к получению парадоксальных результатов, описанию которых посвящено настоящее сообщение.

Методика

Эксперименты проводили на миоцитах, изолированных из левого желудочка сердца крыс одномесячного возраста. Трансмембранные ионные токи исследовали в условиях внутриклеточной перфузии в сочетании с фиксацией потенциала на мембране [6, 7]. Для управления экспериментом и регистрации ионных токов использовали вычислительный комплекс в составе микро-ЭВМ «Электроника ДЗ-28» и анализатора NTA-1024. Все измерения производили при температуре 18—20 °C.

Исходный внеклеточный раствор содержал (в ммоль/л): NaCl — 160, $Ca(NO_3)_2$ — 1,8, Трис/MOPS — 10; pH — 7,4. Для замены ионов Na^+ во внеклеточном растворе использовали ионы Трис⁺, для замены ионов Cl^- — анионы метансульфоновой кислоты. Внутриклеточный раствор содержал 135 ммоль/л Трис(HF) (pH 7,2).

Тетродотоксин («Serva», ФРГ) разводили в деионизированной воде для получения исходной концентрации 10^{-6} моль/л. Желаемую концентрацию токсина получали путем добавления соответствующего количества исходного раствора непосредственно во внеклеточные растворы.