

Двухкомпонентность натриевого тока в мембране изолированных кардиомиоцитов

А. Н. Верхратский, В. И. Пидопличко

В возникновении и проведении возбуждения в сердечной мышце большую роль играют изменения проницаемости клеточной мембраны для ионов натрия [7, 15]. Детальное изучение натриевого тока (I_{Na}) мембраны клеток миокарда было долгое время практически невозможным вследствие значительных методических затруднений, которые связаны с недостатками, присущими многоклеточному препарату миокарда, используемому как объект для фиксации потенциала [3, 4]. Адекватная регистрация I_{Na} мембраны клеток миокарда стала возможной только после применения в качестве объекта для электрофизиологических исследований функционально стабильных одиночных клеток сердечной мышцы.

Однако проведенные исследования I_{Na} изолированных клеток миокарда [5, 12, 13, 14] оставили нерешенными ряд вопросов, в частности вопрос о многокомпонентности быстрого натриевого тока мембраны сердечных клеток. Согласно существующим в настоящее время данным, инактивационный спад I_{Na} имеет две экспоненты, постоянные времени которых различаются в 4—4,5 раза [5, 6, 13, 17]. Этот факт объясняется существованием нескольких инактивационных состояний натриевого канала или возможностью повторного открытия каналов на протяжении одного деполяризующего смещения мембранного потенциала [6, 13]. Возможно альтернативное объяснение двухэкспоненциальной инактивации с точки зрения двух фракций натриевых каналов, обладающих различными кинетическими параметрами.

При детальном изучении действия тетродотоксина (иначе ТТХ) на трансмембранные ионные токи одиночных кардиомиоцитов крыс [2] было обнаружено существование двух компонентов натриевого тока, различных по чувствительности к ТТХ. В настоящем сообщении приводятся результаты дальнейшего изучения натриевой проводимости мембраны одиночных кардиомиоцитов, свидетельствующие в пользу двухкомпонентной природы I_{Na} клеток сердца.

Методика

Эксперименты проводили на миоцитах, ферментативно изолированных из левого желудочка сердца однопольных крыс. Кардиомиоциты исследовали в условиях внутриклеточной перфузии в сочетании с фиксацией потенциала на мембране [11]. Для управления экспериментом и регистрации ионных токов использовали измерительно-вычислительный комплекс в составе микро-ЭВМ «Электроника ДЗ-28» и многоканального анализатора NTA-1024. Регистрацию ионных токов производили при температуре 24—25 °C в полосе частот 0—2 кГц и записывали на магнитную ленту в цифровом виде. Обработку данных осуществляли после окончания эксперимента.

Исходный внеклеточный раствор содержал (ммоль/л) NaCl (150); $Ca(NO_3)_2$ (3,6); NaOH/HEPES (10); pH 7,4. Во все внеклеточные растворы добавляли 10^{-10} моль/л тетродотоксина для устранения ТТХ-чувствительного хлорного тока [1]. В то же время подобные концентрации ТТХ во внеклеточных растворах не оказывали никакого влияния на параметры натриевых токов [2]. Для замены ионов натрия во внеклеточных растворах использовали катионы трис. Внутриклеточный раствор содержал 160 ммоль/л трис-фторида (pH 7,2). Все растворы готовили непосредственно перед экспериментом. Тетродотоксин («Serva», ФРГ) растворяли в деионизированной воде для получения базовых растворов различной концентрации (10^{-7} — 10^{-3} моль/л). Окончательную концентрацию ТТХ создавали добавлением базовых растворов непосредственно во внеклеточные растворы.

Результаты и их обсуждение

После разрушения участка клеточной мембраны и замены внутриклеточной среды искусственным солевым раствором в ответ на деполяризующее смещение мембранного потенциала от уровня поддерживаемого потенциала (V_h составлял -120 мВ) регистрировался входящий ионный ток, инактивационный спад которого мог быть описан

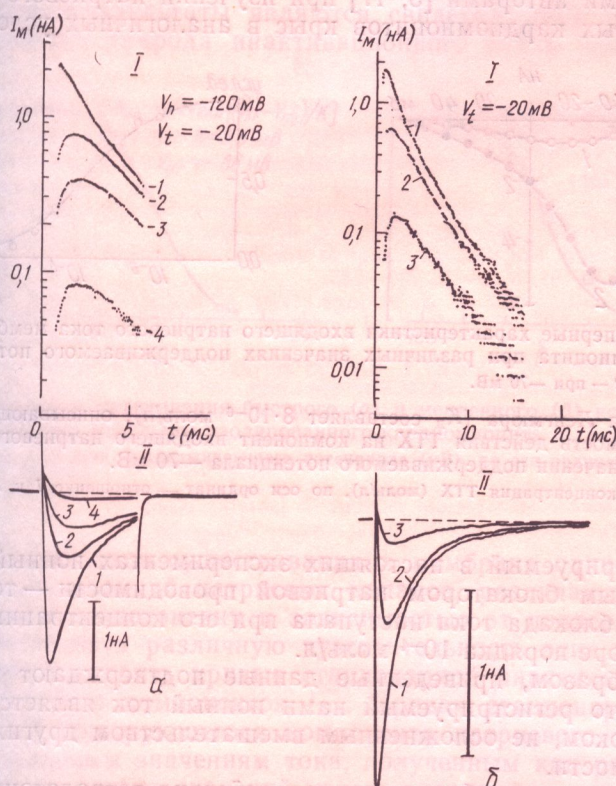


Рис. 1. Разделение компонентов натриевого тока мембраны изолированного кардиомиоцита:

а — с помощью тетродоксина (1 — регистрация входящего тока в исходном, не содержащем ТТХ, внеклеточном растворе); 2, 3 и 4 — то же в растворе, содержащем 10^{-6} , $6 \cdot 10^{-6}$ и $6 \cdot 10^{-5}$ моль/л ТТХ соответственно; б — с помощью сдвига поддерживаемого потенциала (1, 2 и 3 регистрация входящего тока при значениях поддерживаемого потенциала -120 мВ, -80 мВ и -60 мВ соответственно). По оси абсцисс — время (мс), по оси ординат — сила тока (нА). Регистрации токов представлена в полулогарифмическом (I) и обычном (II) масштабах. Постоянная инактивации быстрого и медленного компонентов I_{Na} составляет для а — 0,9 и 4,1 мс соответственно, для б — 1,1 и 4,3 мс соответственно.

двумя экспонентами с постоянными времени 0,9—1,1 мс и 4,1—4,6 мс соответственно при тестирующем потенциале (V_t) -20 мВ (рис. 1, а, б).

Мы полагаем, что регистрируемый входящий ток является результатом функционирования тетродотоксинчувствительных натриевых каналов. Возможность осложнений регистрации токов за счет калиевой проводимости устраняли заменой внутриклеточных катионов на непроницающие ионы трис⁺. Возможное вмешательство хлорного тока устраняли ТТХ, имеющимся во внеклеточных растворах (10^{-10} моль/л), которого достаточно для полной блокады Cl^- -селективных каналов [1]. Возможность создания тока через кальциевые каналы устраняли внутриклеточным приложением высоких концентраций ионов фтора, необратимо блокирующих Ca^{2+} -каналы [10]. Предположение о натриевой природе регистрируемого входящего ионного тока было подтверждено следующими результатами:

1. При сдвиге поддерживаемого потенциала положительнее $+50$ мВ никаких входящих токов обнаружить не удалось. Известно, что подобный сдвиг V_h вызывает развитие стационарной инактивации каналов

натриевого тока [5, 16]. Стационарная инактивация кальциевого тока развивается при гораздо более положительных значениях V_h , что широко используется для разделения Na^+ и Ca^{2+} -токов мембраны клеток сердца [8, 9].

2. Как упоминалось выше, инактивационный спад регистрируемого входящего ионного тока описывался двумя экспонентами. Значения постоянных времени этих экспонент были близки к значениям, полученным другими авторами [5, 17] при изучении натриевого тока мембраны одиночных кардиомиоцитов крыс в аналогичных условиях.

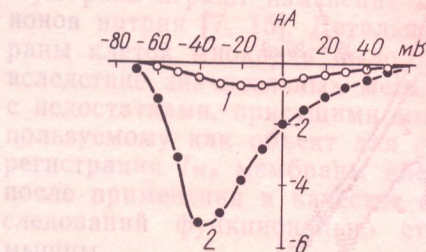


Рис. 2. Вольт-амперные характеристики входящего натриевого тока мембраны изолированного кардиомиоцита при различных значениях поддерживаемого потенциала (V_h): 1 — при -120 мВ; 2 — при -70 мВ.

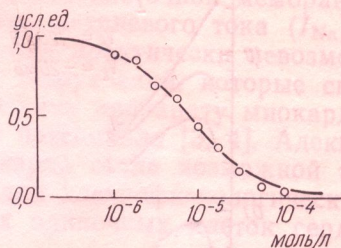


Рис. 3. Изотерма Ленгмюра (K_d составляет $8 \cdot 10^{-6}$ моль/л), описывающая концентрационную зависимость действия ТТХ на компонент входящего натриевого тока, регистрируемого при значении поддерживаемого потенциала -70 мВ.

По оси абсцисс — концентрация ТТХ (моль/л), по оси ординат — отношение I к $I_{\max}$ (усл. ед.).

3. Регистрируемый в настоящих экспериментах ионный ток подавляли известным блокатором натриевой проводимости — тетродотоксином. Полная блокада тока наступала при его концентрации во внеклеточном растворе порядка 10^{-4} моль/л.

Таким образом, приведенные данные подтверждают предположение о том, что регистрируемый нами ионный ток является входящим натриевым током, не осложненным вмешательством других видов ионной проводимости.

При исследовании блокирующего действия тетродотоксина на входящий натриевый ток мембраны одиночного кардиомиоцита оказалось, что вначале под влиянием ТТХ подавлялся быстрый компонент инактивации I_{Na} . При концентрациях тетродотоксина во внеклеточном растворе выше 10^{-6} моль/л отмечалось полное исчезновение быстрого экспоненты в инактивационном спаде натриевого тока (см. рис. 1, а). Полное подавление остававшегося медленного компонента I_{Na} наступало при концентрации ТТХ порядка 10^{-4} моль/л. Концентрационная зависимость блокирующего действия ТТХ на быстрый компонент натриевого тока описывалась изотермой Ленгмюра при K_d , составляющей $6 \cdot 10^{-8}$ моль/л, а на медленный компонент — $7 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Наряду с изменениями кинетики инактивационного спада тетродотоксин также оказывал влияние на зависимость натриевого тока от потенциала: если вольт-амперная характеристика (ВАХ) I_{Na} , регистрируемая в исходном растворе, имела максимум между -40 ÷ -35 мВ, то на фоне 10^{-6} моль/л ТТХ в наружном растворе максимум ВАХ I_{Na} определялся при -20 мВ.

При исследовании влияния на параметры натриевого тока значения поддерживаемого потенциала оказалось, что сдвиг V_h с -120 мВ до значения положительнее -70 мВ также приводил к исчезновению быстроинактивирующегося компонента I_{Na} (см. рис. 1, б). Остававшийся медленный компонент тока полностью исчезал при сдвиге поддерживаемого потенциала положительнее -50 мВ.

Сдвиг V_h видоизменял также и вольт-амперную характеристику входящего натриевого тока. ВАХ I_{Na} , зарегистрированная при поддерживаемом потенциале -120 мВ, имела максимум между -40 и

—35 мВ, а при V_h , составляющем —70 мВ, максимум ВАХ приходился на —20 мВ (рис. 2).

Регистрируемый при поддерживаемом потенциале —70 мВ медленный компонент натриевого тока подавлялся тетродотоксином. Концентрационная зависимость блокирующего действия ТТХ на медленно-инактивирующийся компонент I_{Na} описывалась изотермой Ленгмюра при K_d , составляющей $8 \cdot 10^{-6}$ моль/л (рис. 3).

Полученные результаты являются свидетельством того, что двух-экспоненциальная природа инактивационного спада быстрого натрие-

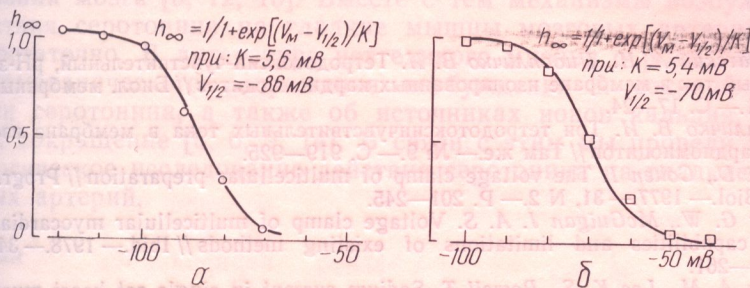


Рис. 4. Стационарная инактивация быстрого (а) и медленного (б) компонентов входящего натриевого тока мембраны изолированного кардиомиоцита.

По оси абсцисс — значения поддерживающего потенциала (мВ), по оси ординат — значения нормированной амплитуды тока.

вого тока — следствие существования в мембране одиночных кардиомиоцитов двух фракций натриевых каналов, различающихся чувствительностью к тетродотоксину и зависимостью от поддерживаемого потенциала. Используя различную чувствительность этих компонентов к ТТХ, удалось построить кривые стационарной инактивации для быстрого и медленного компонентов I_{Na} . Кривая стационарной инактивации быстроинактивирующегося компонента натриевого тока была построена по пиковым значениям тока, полученным как результат арифметического вычитания значений токов, полученных при концентрации ТТХ во внеклеточном растворе $7 \cdot 10^{-7}$ моль/л из исходных значений при различных значениях V_h ; кривую стационарной инактивации медленноинактивирующегося компонента I_{Na} определяли на фоне 5×10^{-6} моль/л ТТХ во внеклеточном растворе (рис. 4). Как видно из представленных результатов, кривая стационарной инактивации медленного компонента натриевого тока сдвинута примерно на 20 мВ в сторону положительных значений мембранного потенциала.

Таким образом, на основании полученных данных можно предположить, что так называемый «быстрый натриевый ток» мембраны одиночных кардиомиоцитов на самом деле является суммой двух натриевых токов. Эти два натриевых тока в свою очередь являются результатом функционирования двух типов натриевых каналов, различающихся чувствительностью к ТТХ, зависимостью от потенциала и кинетическими параметрами. Эти два типа каналов могут быть определены как каналы быстрого натриевого тока (I_{Na}^f) и каналы медленного натриевого тока (I_{Na}^s).

Проведенное исследование характеристик быстрого и медленного натриевых токов мембраны одиночных кардиомиоцитов позволяет осуществлять их уверенное разделение, что является основой для дальнейшего изучения натриевой проводимости клеток сердца.

TWO-COMPONENT CHARACTER OF SODIUM INWARD CURRENT IN THE MEMBRANE OF ISOLATED CARDIOMYOCYTES

A. N. Verkh ratsky, V. I. Pidoplichko

The existence of two sodium inward currents in the membrane of single rat cardiomyocytes carried by different channel populations with various pharmacological and voltage-dependent properties has been postulated.

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

1. *Верхратский А. Н., Пидопличко В. И.* Тетродотоксин-чувствительный, pH-зависимый хлорный ток в мембране изолированных кардиомиоцитов // Биол. мембраны.—1985.— 2, № 1.— С. 17—24.
2. *Пидопличко В. И.* Три тетродотоксинчувствительных тока в мембране изолированных кардиомиоцитов // Там же.— № 9.— С. 919—925.
3. *Attwel D., Cohen I.* The voltage clamp of multicellular preparation // Progr. Biophys. Mol. Biol.—1977.— 31, N 2.— P. 201—245.
4. *Beeler G. W., McGuigan J. A. S.* Voltage clamp of multicellular myocardial preparation: capabilities and limitations of existing methods // Ibid.—1978.— 34, N 2.— P. 219—261.
5. *Brown A. M., Lee K. S., Powell T.* Sodium current in single rat heart muscle cells // J. Physiol. (London).—1981.— 318.— P. 479—500.
6. *Fozzard H. A., January C. T., Makielski J. C.* New studies of the excitatory sodium currents in heart muscle // Circulat. Res.—1985.— 56, N 4.— P. 475—485.
7. *Hoffman B. F., Cranefield P. F.* Electrophysiology of the heart.—New York et al.: McGraw—Hill, 1960.— 357 p.
8. *Isenberg G., Klockner U.* Calcium current of isolated bovine ventricular myocytes are fast and of large amplitude // Pflügers Arch.—1982.— 395, N 1.— P. 30—41.
9. *Kokubun S., Irisawa H.* Effects of various intracellular Ca ion concentrations on the calcium current of guinea-pig single ventricular cells // Jap. J. Physiol.—1984.— 34, N 4.— P. 599—611.
10. *Kostyuk P. G., Krishtal O. A., Pidoplichko V. I.* Effects of internal fluoride and phosphate on membrane currents during intracellular dialysis of nerve cells // Nature.—1975.— 257, N 5528.— P. 691—693.
11. *Kostyuk P. G., Krishtal O. A., Pidoplichko V. I.* Intracellular perfusion // J. Neurosci. Meth.—1981.— 4, N 3.— P. 201—210.
12. *Lee K. S., Weeks T. A., Kao R. L. et al.* Sodium current in single heart muscle cells // Nature.—1979.— 278, N 5731.— P. 269—271.
13. *Pattlak J. B., Ortiz M.* Slow current through single sodium channels of the adult rat heart // J. Gen. Physiol.—1985.— 86, N 1.— P. 89—104.
14. *Undrovinas A. I., Yushmanova A. V., Hering S., Rosenshtraukh L. V.* Voltage clamp method on single cardiac cells from adult rat heart // Experientia.—1980.— 36, N 5.— P. 572—573.
15. *Weidmann S.* Electrophysiologie der Herzmuskelfaser.—Bern: Huber, 1956.— 276 S.
16. *Weidmann S.* The effect of the cardiac membrane potential on the rapid availability of the sodium-carrying system // J. Physiol. (London).—1955.— 127.— P. 213—224.
17. *Yatani A., Brown A. M., Akaike N.* Effects of extracellular pH on sodium current in isolated single rat ventricular cells // J. Membrane Biol.—1984.— 72, N 2.— P. 163—168.

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

Поступила 23.09.86

УДК 612.743:615.225.1

Действие серотонина на электрогенез и сокращение гладких мышц основной артерии

Н. И. Гокина, А. В. Гурковская, И. Г. Бутенко, М. Ф. Шуба

К настоящему времени установлено, что в стенке мозговых сосудов помимо адренергических и холинергических имеются нервные волокна, содержащие серотонин [10, 13]. Серотонинергические нейроны, иннервирующие как крупные, так и мелкие мозговые артерии и артериолы,