

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,

расположены в ядрах шва [13]. Серотонин является также одним из биогенных аминов, обнаруженных в моноаминоцитах мозговых артерий [4]. Исследования, проведенные на мышечных полосках крупных мозговых артерий различных животных, показали, что серотонин вызывает значительно большее сокращение, чем норадреналин, гистамин, ацетилхолин и некоторые другие сосудосуживающие вещества [6, 7, 11]. Все эти данные свидетельствуют о возможном участии серотонина в физиологической регуляции мозгового кровообращения. Кроме того, серотонину отводится важная роль в возникновении ряда сосудистых заболеваний мозга [5, 12, 15]. Вместе с тем механизмы возбуждающего действия серотонина на гладкие мышцы мозговых артерий изучены недостаточно. В литературе нет единого мнения о роли электро- и фармакомеханического сопряжения возбуждения и сокращения при действии серотонина, а также об источниках ионов кальция, активирующих сокращение [5, 6, 9, 14]. В связи с этим мы провели электрофизиологическое исследование действия серотонина на гладкие мышцы мозговых артерий.

Методика

Опыты проведены на спиральных мышечных полосках основной артерии мозга крупного рогатого скота с помощью модифицированного метода сахарозного мостика [1]. Состав раствора Кребса, способ регистрации и отведения электрических и сократительных реакций описаны нами ранее [2, 3].

Результаты и их обсуждение

Серотонин вызывал зависимое от дозы сокращение мышечных полосок основной артерии ($n=16$). Минимальная концентрация серотонина, приводящая к сокращению, составляла 10^{-9} моль/л (рис. 1, а, 1). Сокращение при этом носило тонический характер и не сопровождалось изменением мембранного потенциала (МП) гладкомышечных клеток (ГМК). В более высоких концентрациях ($10^{-8} - 10^{-6}$ моль/л) серотонин вызывал деполяризацию ГМК, в начале которой генерировались потенциалы действия (ПД). При этом сократительная реакция мышечных полосок состояла из двух компонентов — фазного и тонического.

На рис. 1, а, 3 видно, что фазный компонент — результат суммации отдельных сокращений, сопровождающих ПД. После прекращения генерации ПД сокращение устанавливалось на постоянном уровне до начала отмывания серотонина.

При действии серотонина в концентрации $10^{-7} - 10^{-6}$ моль/л в ряде случаев после генерации ПД в начале деполяризации наблюдалось появление повторных разрядов ПД, сопровождавшихся фазными сокращениями. В промежутке между разрядами ПД сокращение имело тонический характер (рис. 1, б).

На рис. 1, в показаны графики зависимости амплитуды сократительных реакций и деполяризации ГМК от концентрации серотонина в омывающем мышечные полоски растворе. Максимальное сокращение наблюдалось при действии серотонина в концентрации 10^{-6} моль/л. Серотонин в концентрации 10^{-5} моль/л вызывал либо такое же, либо несколько меньшее сокращение мышечных полосок. Значение D_{50} , рассчитанное по кривой доза — эффект для сокращения, составляло 5×10^{-8} моль/л, что близко к значению D_{50} , полученному для гладких мышц мозговых артерий различных животных и человека, и на порядок выше, чем для гладких мышц других сосудов [6, 7, 11, 12]. Эти данные свидетельствуют о более высокой чувствительности ГМК мозговых артерий к возбуждающему действию серотонина, чем ГМК других сосудистых областей.

На рис. 2 показаны ан- и катэлектротонические потенциалы ГМК основной артерии в ответ на действие импульсов гипер- и деполяризу-

ющего тока в нормальном растворе Кребса (а) и в растворе, содержащем серотонин в концентрации 10^{-6} моль/л (б). Видно, что под влиянием серотонина наблюдалось уменьшение амплитуды электротонических потенциалов, что свидетельствует об уменьшении сопротивления мембраны ГМК. Это также отражено на вольт-амперной характеристике (см. рис. 2, в). По-видимому, под влиянием серотонина увеличивается проницаемость мембраны ГМК основной артерии к ионам Na и/или Cl что, в свою очередь, и является причиной деполяризации ГМК. При действии серотонина наблюдалось также повышение возбудимости мембраны ГМК основной артерии: если в нормальном растворе Кребса при деполяризации электрическим током возникало только локальное возбуждение, то в растворе с серотином генерировались полноценные ПД (см. рис. 2, а, б). Кроме того, в ряде случаев на

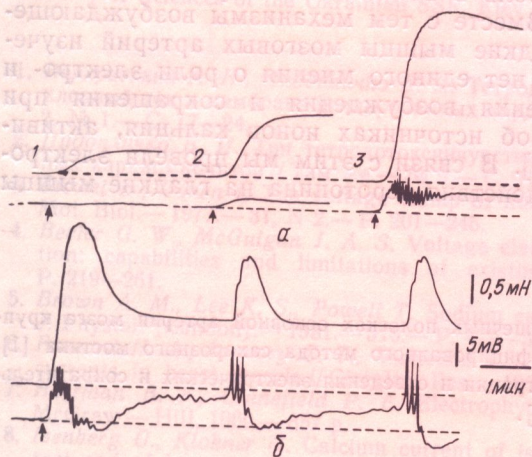
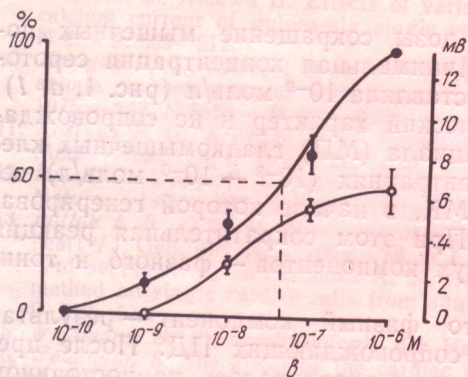


Рис. 1. Электрические и сократительные реакции гладкомышечных клеток основной артерии на действие серотонина в различных концентрациях:

а — реакции мышечной полоски на действие серотонина (1 — концентрация 10^{-9} ; 2 — 10^{-8} ; 3 — 10^{-6} моль/л); б — генерация повторных разрядов ПД на деполяризации, вызванной серотином в концентрации 10^{-7} моль/л; в — графики зависимости сократительных реакций (черные кружки) и деполяризации ГМК (белые кружки) от концентрации серотонина в омывающем полостях растворе. За 100 % принято значение сокращения, вызываемого серотином в концентрации 10^{-6} моль/л. На а и б пунктирной линией обозначен исходный уровень мышечного напряжения исходных полосок и МП ГМК; стрелками — начало действия серотонина. Верхняя запись — сократительные, нижняя — электрические реакции.



фоне действия серотонина появлялся анод-размыкательный ответ: ПД возникали на выключение гиперполяризующего тока.

Результаты экспериментов по исследованию влияния деполяризации ГМК основной артерии ионами калия на электрические и сократительные реакции, вызываемые серотином, показаны на рис. 3. Серотонин в концентрации 10^{-6} моль/л приводил к деполяризации, генерации ПД и сокращению мышечной полоски. После отмывания серотонина на мышечную полоску действовали ионами калия в концентрации 60 ммоль/л. Серотонин на фоне действия этих ионов не приводил к дополнительной деполяризации ГМК, а вызываемое им сокращение составляло $22 \pm 2,8 \%$ ($n=12$) значения тонического сокращения в контроле.

На 10–15-й минуте действия бескальциевого раствора серотонин в концентрации 10^{-9} моль/л не приводил к сокращению мышечных полосок. Однако при действии серотонина в концентрации 10^{-6} моль/л в бескальциевом растворе наблюдалось сокращение мышечных полосок, которое было кратковременным и составляло $19 \pm 1,3 \%$ ($n=8$) значения сокращения в контроле. Отмывание мышечных полосок нормальным раствором Кребса приводило к восстановлению исходных сократительных и электрических реакций на серотонин.

Согласно литературным данным, серотонин оказывает пре- и пост-синаптическое влияние на гладкие мышцы сосудов [12]. Известно, что десимпатизация животных, разрушение адренергических нервных окончаний 6-гидроксидопамином, блокаторы α -адренорецепторов не влияют на чувствительность гладких мышц мозговых артерий к серотонину. Поэтому возбуждающее влияние серотонина обусловлено прямым его действием на специфические серотонинчувствительные рецепторы мембраны ГМК этих сосудов [7, 9, 11, 12].

Как показали наши исследования, характер электрических и сократительных реакций гладких мышц основной артерии на серотонин

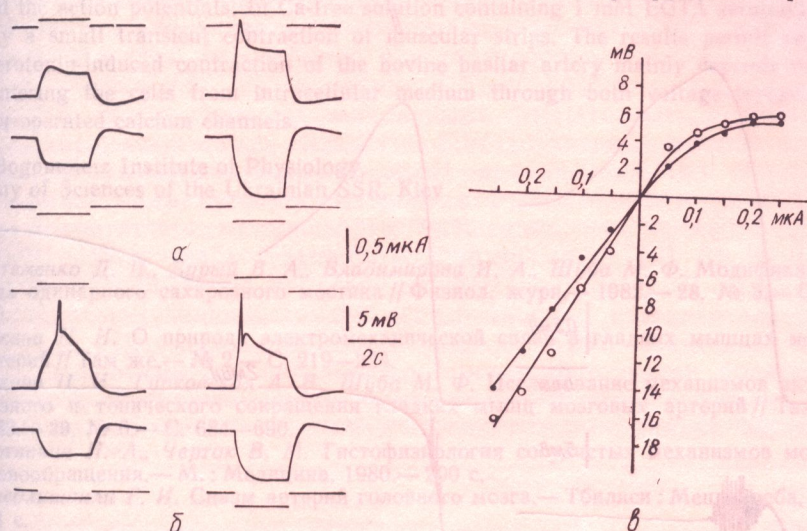


Рис. 2. Влияние серотонина на электротонические потенциалы, вызванные гипер- и деполяризующим током:

α — ан- и катэлектротонические потенциалы на действие электрического тока различной силы в нормальном растворе Кребса; $\circ$ — то же в растворе, содержащем серотонин в концентрации 10^{-6} моль/л; $\bullet$ — вольт-амперные характеристики в нормальном растворе Кребса (белые кружки) и в присутствии серотонина (черные кружки).

определяется его концентрацией в омывающем мышечные полоски растворе. В низких концентрациях (10^{-9} моль/л) серотонин вызывает сокращение без деполяризации ГМК. Удаление ионов кальция из омывающего раствора приводит к полному угнетению сократительной реакции на действие серотонина в этой концентрации. Таким образом, активация сокращения в этих условиях осуществляется ионами кальция, поступающими в ГМК из внеклеточной среды, по-видимому, через хемоправляемые кальциевые каналы, открываемые при активации серотониновых рецепторов мембраны ГМК.

Серотонин в более высоких концентрациях — 10^{-8} — 10^{-6} моль/л вызывает зависящую от дозы деполяризацию ГМК основной артерии. Сокращение при этом активируется преимущественно ионами кальция, поступающими в ГМК из внеклеточной среды: в бескальциевом растворе при действии серотонина наблюдалось только небольшое кратковременное сокращение мышечных полосок. В предыдущих исследованиях нами было показано, что гладкие мышцы мозговых артерий отвечают сокращением даже при небольшой (на 2–3 мВ) деполяризации ГМК электрическим током или ионами калия [3]. Предполагается, что активация сокращения при этом происходит за счет поступления ионов кальция в ГМК через потенциалзависимые неинактивирующиеся кальциевые каналы в мембране ГМК [3]. Серотонин в концентрации 10^{-6} моль/л приводит к деполяризации ГМК в среднем на 7 мВ. Сопоставление значений деполяризации и тонического сокращения, вызываемых гиперкальциевым раствором и серотонином, показывает, что такая деполяризация не может полностью обеспечить вход ионов кальция, достаточный для активации всей сократительной ре-

акции. На рис. 3 видно, что деполяризация на действие ионов калия в четыре раза больше, чем в случае действия серотонина. В то же время тонический компонент сокращения, вызываемого серотонином, в два раза превышает амплитуду калиевой контрактуры. Поэтому можно считать, что вход ионов кальция в ГМК при действии серотонина осуществляется не только через потенциалзависимые кальциевые каналы, открываемые деполяризацией, но и через хемоправляемые. Этот вывод подтверждают результаты опытов по исследованию действия серотонина на фоне деполяризации ГМК ионами калия. Так как серотонин в

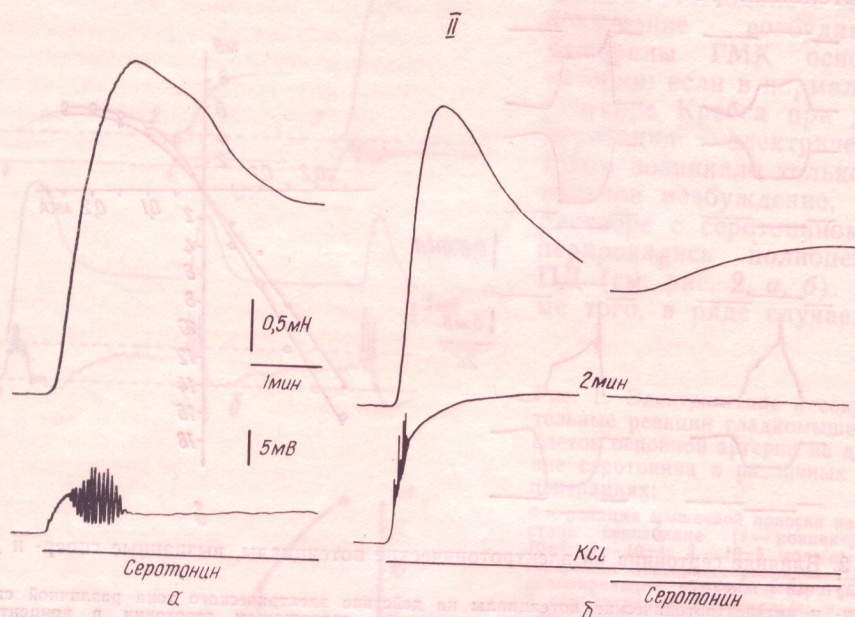


Рис. 3. Влияние деполяризации ГМК основной артерии на электрические и сократительные реакции, вызываемые серотонином:

а — электрические и сократительные реакции мышечной полоски, вызванные серотонином в концентрации 10^{-6} моль/л; б — реакции, вызванные серотонином на 5-й минуте действия гиперкалиевого раствора (60 ммоль/л). Верхняя запись — сократительные реакции, нижняя — электрические.

этих условиях не вызывает деполяризации, дополнительное сокращение на фоне калиевой контрактуры активируется главным образом ионами кальция, поступающими в ГМК через хемоправляемые кальциевые каналы.

В наших опытах в начале вызванной серотонином деполяризации возникали ПД. Известно, что в ГМК мозговых артерий ПД имеют кальциевую природу [2, 3, 8]. Поэтому в активации начального компонента сокращения при действии серотонина принимают участие также ионы кальция, поступающие в ГМК через инактивирующиеся кальциевые каналы, ответственные за генерацию ПД и активацию быстрых фазных сокращений.

Таким образом, проведенные исследования показали, что сокращение, вызываемое серотонином в гладких мышцах основной артерии, активируется преимущественно ионами кальция, поступающими в мышечные клетки из внеклеточной среды, и значительно меньше — ионами кальция, высвобождающимися из внутриклеточных депо. При этом вход ионов кальция осуществляется через хемоправляемые, а также инактивирующиеся и неинактивирующиеся потенциалзависимые кальциевые каналы мембраны ГМК.

SEROTONIN ACTION ON ELECTROGENESIS AND CONTRACTION IN SMOOTH MUSCLES OF BASILAR ARTERY

N. I. Gokina, A. V. Gurkovskaya, I. G. Butenko, M. F. Shuba

The effects of serotonin on smooth muscle cells of the bovine basilar artery were investigated by the sucrose-gap method with simultaneous recording of isometric tension. Serotonin in concentrations of 10^{-9} - 10^{-6} mol/l induced dose-dependent contraction of vascular smooth muscles. Under the action of serotonin in concentration of 10^{-9} mol/l the contraction was followed by no modifications of the membrane potential. Serotonin in higher concentrations (10^{-8} - 10^{-6} mol/l) depolarized the membrane, decreased its resistance and induced the action potentials. In Ca-free solution containing 1 mM EGTA serotonin induced only a small transient contraction of muscular strips. The results permit supposing that serotonin-induced contraction of the bovine basilar artery mainly depends on Ca^{2+} -ions entering the cells from intracellular medium through both voltage-dependent and receptor-operated calcium channels.

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

1. Артеменко Д. П., Бурый В. А., Владимиров И. А., Шуба М. Ф. Модификация метода одинарного сахарозного мостика // Физиол. журн.— 1982.— 28, № 3.— С. 374—380.
2. Гокина Н. И. О природе электромеханической связи в гладких мышцах мозговых артерий // Там же.— № 2.— С. 219—224.
3. Гокина Н. И., Гурковская А. В., Шуба М. Ф. Исследование механизмов активации фазного и тонического сокращения гладких мышц мозговых артерий // Там же.— 1983.— 29, № 6.— С. 684—690.
4. Мотакини П. А., Черток В. М. Гистофизиология сосудистых механизмов мозгового кровообращения.— М.: Медицина, 1980.— 200 с.
5. Мchedlishvili Г. И. Спазм артерий головного мозга.— Тбилиси: Мецниереба, 1977.— 181 с.
6. Allen G. S., Gross C. J., Henderson L. M., Chou S. N. Cerebral arterial spasm. Part 4: In vitro effects of temperature, serotonin analogues, large nonphysiological concentrations of serotonin and extracellular calcium and magnesium on serotonin-induced contractions of the canine basilar artery // J. Neurosurg.— 1976.— 44, N 5.— P. 585—593.
7. Edvinsson L., Hardebo J. E., Owman Ch. Pharmacological analysis of 5-hydroxytryptamine receptors in isolated intracranial vessels of cat and man // Circulat. Res.— 1978.— 42, N 2.— P. 143—151.
8. Fujiwara S., Itoh T., Suzuki H. Membrane properties and excitatory neuromuscular transmission in the smooth muscle of dog cerebral arteries // Brit. J. Pharmacol.— 1982.— 77, N 2.— P. 197—208.
9. Harder D. R., Waters A. Electromechanical coupling in feline basilar artery in response to serotonin // Eur. J. Pharmacol.— 1983.— 93, N 2.— P. 95—100.
10. Griffith S. G., Burnstock G. Immunohistochemical demonstration of serotonin in nerves supplying human cerebral and mesenteric blood vessels // Lancet.— 1983.— March.— P. 561—562.
11. Lamar J.-C., Edvinsson L. 5-Hydroxytryptamine receptors. Contractile activity and mode of inhibition by methysergide in mammalian intracranial and extracranial vessels // Arch. Int. Pharmacodyn.— 1980.— 243, N 2.— P. 245—254.
12. Peroutka S. J. Vascular serotonin receptors. Correlation with 5-HT₁ and 5-HT₂ binding sites // Biochem. Pharmacol.— 1984.— 33, N 15.— P. 2349—2353.
13. Reinhard J. F., Leibmann J. E., Schlosberg A. J., Moskowitz M. A. Serotonin neurones project to small vessels in the brain // Science.— 1979.— 206, N 4414.— P. 85—87.
14. Towart R. The selective inhibition of serotonin-induced contractions of rabbit cerebral vascular smooth muscle by calcium antagonistic dihydropyridines // Circulat. Res.— 1981.— 48, N 5.— P. 650—657.
15. Vanhoutte P. M. 5-Hydroxytryptamine and vascular disease // Fed. Proc.— 1983.— 42, N 2.— P. 233—237.

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

Поступила 29.01.86