

22. Takahashi Y., Satoh K., Sakumoto T. et al. A major source of catecholamine terminals in the nucleus tractus solitarius // Brain Res.—1979.—172, N 2.—P. 372—377.
23. Talman W. T., Snyder D. S., Reis D. J. Chronic lability of arterial pressure produced by destruction of A2 catecholaminergic neurons in the rat brainstem // Circulat. Res.—1980.—46, N 7.—P. 842—853.
24. West M. J., Blessing W. W., Chalmers J. Arterial baroreceptor reflex function in the conscious rabbit after brainstem lesions coinciding with the A1 group of catecholamine neurons // Ibid. 1981.—49, N 4.—P. 959—970.
25. Westlund K. N., Bowker R. M., Ziegler M. G., Coulter J. D. Descending noradrenergic projections and their spinal termination // Prog. Brain Res.—1982.—57.—P. 219—238.
26. Yamasoe M., Shiosaka S., Shibasaki T. et al. Distributions of six neuropeptides in the nucleus tractus solitarius on the rat: an immunohistochemical analysis // Neuroscience.—1984.—13, N 4.—P. 1243—1266.

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

Поступила 03.06.86

УДК 577.4:576.342:547.582.2

Механизм физиологического действия краун-эфиров на возбудимые образования

Т. А. Савенко, Е. И. Назаров, В. Г. Вонгай, А. И. Ундровинас,
Т. В. Бирюкова, Н. Г. Лукьяненко

Известно, что некоторые краун-эфиры проявляют выраженное антиаритмическое свойство на строфантиновой модели аритмии [3]. Предложено два объяснения названного свойства краун-эфиров: первое — ингибирование проводимости ионных каналов электровозбудимой мембраны [6], второе — влияние на механизм натрий-кальциевого обмена в сарколемме кардиомиоцитов [5]. В настоящей работе изучена применимость приведенных выше предположений для объяснения механизма противодействия краун-лактоном развитию строфантиновой аритмии.

Методика

Исследование влияния краун-лактона на электровозбудимую мембрану проводили на примере входящего натриевого тока сарколеммы изолированных кардиомиоцитов. Выбор этого показателя электровозбудимой мембраны определялся важной ролью, которую играют механизмы генерации натриевого тока клеток миокарда в патогенезе аритмий [10]. Измерение параметров натриевого тока проводили в режиме фиксации потенциала на малом участке сарколеммы изолированной клетки (метод «микроотведений») согласно ранее описанной методике [2]. Использовали V-образную пластиковую пипетку, в которой прокалывали отверстие диаметром около 7 мкм. Изолированные клетки подсаживали к отверстию посредством создания перепада давления (35—40 мм рт. ст.). Измерительную камеру заполняли раствором (ммоль/л), содержащим NaCl—140, KCl—5,4, MgCl₂—1,5, CaCl₂—0,5, глюкозы—11, трис-Cl—10; pH раствора 7,4; температура—20—22 °C. Внутренний объем пипетки заполняли тем же раствором, содержащим 1 ммоль/л 4-аминопиридина для подавления калиевых токов. Тестирующие импульсы задавали в зависимости от уровня потенциала покоя. Регистрацию токов осуществляли фотооптическим регистратором ФОР-2 с экрана осциллографа С-1-48Б. Изолированные клетки миокарда желудочков крысы выделяли согласно описанной ранее методике [12]. Натрий-кальциевый обмен в сарколемме кардиомиоцитов изучали радиоизотопным методом. В этих экспериментах использовали растворы (ммоль/л) следующего состава: NaCl—120, KCl—5,8, NaHCO₃—4,3, KH₂PO₄—1,4, MgSO₄—1,5, глюкозы—11,1, HEPES-NaOH—18,7; pH раствора 7,3. В растворе с пониженной концентрацией ионов Na (60 ммоль/л) NaCl заменяли на эквивалентное количество трис-HCl. Суспензию клеток (0,4 мл; концентрация белка составляла 50—70 мкг/мл) фильтровали под давлением 1 атм через фильтры фирмы «Mil-

Пирог» (диаметр пор составлял 0,45 мкм). Затем фильтры промывали средой (ммоль/л) следующего состава: KCl—100, ЭДТА—1,0, трис-Cl—5; pH среды 7,4 и растворяли в сцинтилляционной жидкости марки ЖС-8. Использовали радиоактивный ^{45}Ca удельной активностью $5,4 \cdot 10^5$ Бк/мкг (фирма «Amersham»). Ферментативное выделение изолированных клеток миокарда взрослых крыс осуществляли согласно описанной ранее методике [12]. Во всех опытах концентрация краун-лактона во внеклеточной среде составляла $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

Краун-эфиры являются комплексонами щелочных и щелочноземельных металлов [11]. Сравнение концентраций комплексона и катионов во внеклеточной среде показывает, что возможное комплексообразование краун-лактона с катионами может существенно сказаться только на активности ионов кальция. Влияние краун-лактона на

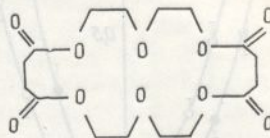


Рис. 1. Структурная формула используемого в исследованиях краун-лактона.

активность ионов кальция во внеклеточном растворе моделировали в среде (ммоль/л), содержащей следующие вещества: краун-лактон—0,5, CaCl_2 —0,5, NaCl—10, трис-Cl—2; pH среды 7,4. Концентрацию кальция измеряли потенциометрически Са-селективным электродом фирмы «Radelkis». Полученные результаты обрабатывали статистически с применением двустороннего критерия Фишера [1]. В работе использовали коллагенезу фирмы «Sigma»; тип II; 400 U/мг), сывороточный альбумин (фирма «Reanal», ВНР).

Результаты и их обсуждение

Краун-лактон изменяет потенциалозависимость стационарной активации и инактивации входящего натриевого тока (рис. 1, а), но не влияет на амплитуду тока (рис. 1, б). Смещение графиков зависимости m_∞ — E_m и h_∞ — E_m в сторону более отрицательных значений мембранного потенциала можно достигнуть деполяризацией клеточной мембраны или уменьшением концентрации катионов в двойном электрическом слое над поверхностью мембраны [8]. Показано [5], что краун-лактон не изменяет потенциал покоя сердечных клеток при концентрации до $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Концентрация катионов на поверхности мембраны зависит от трех следующих параметров: 1-й—активность катионов во внеклеточном растворе; 2-й—плотность поверхностных зарядов на мембране; 3-й константа связывания катионов с мембраной. Потенциометрическое измерение концентрации ионов кальция в условиях, приведенных в разделе «Методика», показало, что краун-лактон не изменяет концентрацию названных ионов в водных средах. Плотность поверхностных зарядов зависит от химического состава мембраны и не может изменяться под действием электрически нейтрального комплексона. На основании этого мы предполагаем, что смещение графиков зависимости m_∞ — E_m и h_∞ — E_m в сторону более отрицательных потенциалов связано с уменьшением внутримембранного поля за счет возрастания поверхностного потенциала внешней поверхности мембраны, вызванного уменьшением константы связывания катионов с поверхностью. Такой механизм воздействия краун-лактона на сарколемму мы моделировали ранее на примере бимолекулярной липидной мембраны [4]. Показанное в цитированной работе ослабление краун-лактоном индуцированных кальцием изменений поверхностного потенциала качественно соответствует уменьшению внутримембранного поля, показанному на рис. 2.

Очевидно, что смещение потенциалозависимости стационарной активации и инактивации натриевых токов сарколеммы кардиомиоцитов на 10—15 мВ не может определять антиаритмический эффект краун-лактона. Однако возможность влияния названного соединения на процес-

сы связывания катионов с мембраной может иметь существенные последствия для развития действия аритмогенных агентов на сердечную клетку. Как указано выше, краун-лактон ослабляет развитие нарушений сердечного ритма под действием сердечного гликозида — строфантина [5]. Известно, что нарушение функционального состояния сердечных клеток при действии строфантина связано с повышением внутри-

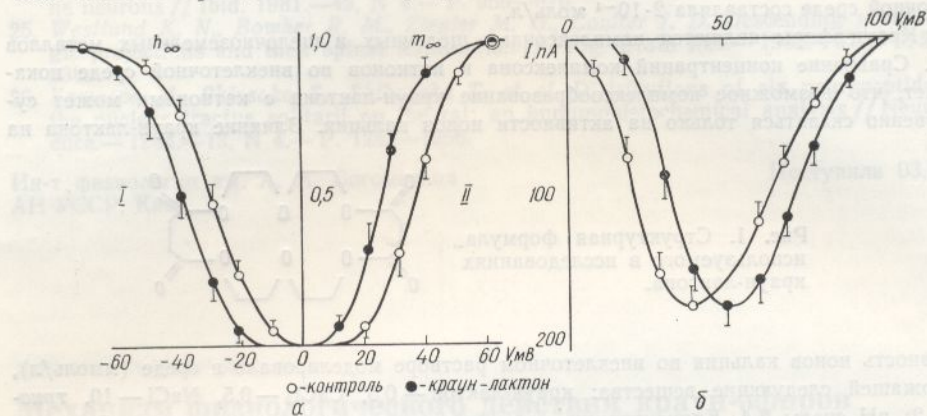


Рис. 2. Влияние краун-лактона (10^{-4} моль/л) на характеристики быстрых натриевых токов изолированных кардиомиоцитов крысы:

а — потенциалозависимая характеристика (I — стационарная инактивационная и II — активационная); б — вольтамперная характеристика.

клеточного уровня кальция [9]. Активацию входа кальция в клетки вызывали помещением их в среду с уменьшенной концентрацией ионов натрия. Этот прием является общепринятым для изучения транспорта кальция в клетки при инвертировании направления натрий-кальциевого обмена, вызванного снижением натриевого трансмембранного электрохимического потенциала [9]. В этих условиях краун-лактон су-

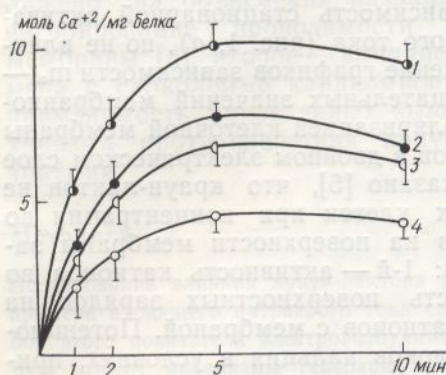


Рис. 3. Влияние краун-лактона на накопление кальция кардиомиоцитами в растворах с различной концентрацией ионов натрия:

1 — 60 ммоль/л NaCl; 2 — 60 ммоль/л NaCl и $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л доксорубина; 3 — 60 ммоль/л NaCl и 10^{-4} моль/л краун-лактона; 4 — 120 ммоль/л NaCl.

щественно ослабляет вход кальция в клетки миокарда (рис. 3). Аналогичным эффектом обладает известный ингибитор натрий-кальциевого обмена — рубомицин. Согласно имеющимся данным, кардиотоксичность рубомицина связана с необратимым конкурентным ингибированием натрий-кальциевого обмена, играющего значительную роль в поддержании кальциевого динамического равновесия в норме [7]. Учитывая это и исходя из данных о чрезвычайно низкой токсичности краун-лактона [3], можно сделать вывод, что механизмы влияния краун-эфира и рубомицина на натрий-кальциевый обмен различны. Возможно, что ослабление краун-лактоном опосредованного натрий-кальциевым обменом входа кальция в кардиомиоциты определяется взаимодействием этого соединения со связанными на поверхности мембраны катионами кальция.

На основании приведенных данных можно сделать вывод, что противодействие краун-лактона нарушению сердечной деятельности при действии строфантина связано не с модификацией проницаемости электровозбудимой мембраны, а с противодействием перегрузке клеток ионами кальция, вызванной инверсией натрий-кальциевого обмена.

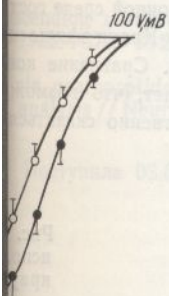
It is shown that
inactivation of
wards the re-
weakening of
dium-calcium
surface.

University, O
Physicochemi-
of the Ukrain
All-Union Ca
Academy of M

1. Бальшев
1983.— 18
2. Зильберт
отведени
клеток /
3. Лукьяне
тиаритми
1984.— N
4. Лукьяне
ность кр
вые кана
5. Лукьяне
макроге
эфиров
6. Лукьяне
ропикли
же.— С.
7. Caroni
the Na⁺
130, N 2
8. Chandler
lution of
(London
9. Goshima
nesis of
Cardiol.
10. Federma
1979.— 5
11. Tosteson
and nat
12. Wittenb
membra
Res.— 1

Одес. ун-т
М-ва высш
Физ.-хим.
Всесоюз. к

существенные по-
гов на сердечную
развитие наруше-
озид — строфан-
состояния сердеч-
ышением внутри-



стрых натриевых то-
ая и II — активацион-

ция в клетки вы-
ентрацией ионов
ения транспорта
при инвертиро-
натрий-кальцие-
ного снижением
мбранного элек-
отенциала [9].
раун-лактон су-

лактона на накопле-
татами в растворах
ей ионов натрия:

60 ммоль/л NaCl и
ина; 3—60 ммоль/л
краун-лактона; 4—

(рис. 3). Анало-
-кальциевого об-
рдиотоксичность
бированием нат-
в поддержании
ывая это и исхо-
ктона [3], можно
рубомидина на
абление краун-
входа кальция
соединения со
ия.

вывод, что про-
ятельности при
проницаемости
егрузке клеток
то обмена.

1987, т. 33, № 5

A MECHANISM OF THE PHYSIOLOGICAL EFFECT OF CROWN-ETHERS ON THE EXCITABLE FORMATIONS

T. A. Savenko, E. I. Nazarov, V. G. Vongai, A. I. Undrovins,
T. V. Biryukova, N. G. Lukyanenko

It is shown that crown-lactone shifts the curves of potential-dependent activation and inactivation of sodium input current of the isolated cardiomyocytes by 10-15 mV towards the region of more negative membrane potentials. It is suggested that the weakening of the calcium input in cardiomyocytes by crown-lactone mediated by sodium-calcium exchange is due to its interaction with calcium cations on the membrane surface.

University, Odessa;
Physicochemical Institute, Academy of Sciences
of the Ukrainian SSR, Odessa;
All-Union Cardiological Scientific Centre,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

1. *Большев Л. Н., Смирнов Н. В.* Таблицы математической статистики // М.: Наука, 1983.— 180 с.
2. *Зильбергер Ю. И., Тимин Е. Н., Бендукидзе З. А., Бурнашев Н. А.* Метод микроотведения для регистрации ионных токов через мембрану одиночных сердечных клеток // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1981.— № 12.— С. 759—761.
3. *Лукьяненко Н. Г., Богатский А. В., Ярошенко И. М. и др.* Поиск и изучение антиаритмических веществ в ряду краун-эфиров // Фармакология и токсикология.— 1984.— № 5.— С. 29—31.
4. *Лукьяненко Н. Г., Богатский А. В., Савенко Т. А. и др.* Антиаритмическая активность краун-лактона 1 и его действие на модифицированные аконитином натриевые каналы // Биофизика.— 1985.— 30, № 3.— С. 427—429.
5. *Лукьяненко Н. Г., Назаров Е. И., Богатский А. В. и др.* Биологическая активность макрогетероциклов. II. О механизме совместного действия строфантина и краун-эфиров на сердечную ткань // Биол. мембраны.— 1985.— 2, № 6.— С. 588—592.
6. *Лукоянов Н. В., Ванкин Г. И., Журавлева Л. В. и др.* Влияние некоторых макроциклических полиэфиров на биологические и искусственные мембраны // Там же.— С. 71—76.
7. *Caroni P., Villani F., Carafoli E.* The cardiotoxic antibiotic doxorubicine inhibits the $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchange of dog heart sarcolemmal vesicles // FEBS Lett.— 1981.— 130, N 2.— P. 184—185.
8. *Chandler W. K., Hodgkin A. U., Meves H.* The effect of changing the internal solution on sodium inactivation and related phenomena in giant axons // J. Physiol. (London).— 1965.— 180.— P. 821—836.
9. *Goshima K., Wakabayashi S.* Involvement of the $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchange system in genesis of ouabain-induced arrhythmias of cultured myocardial cells // J. Mol. and Cell. Cardiol.— 1981.— 13.— P. 489—509.
10. *Federman J., Vlietstra R. E.* 2. Antiarrhythmic drug therapy // Mayo Clin. Proc.— 1979.— 54.— P. 531—542.
11. *Tosteson D. C.* Effect of macrocyclic compounds on ionic permeability of artificial and natural membranes // Fed. Proc.— 1968.— 27.— P. 1269—1277.
12. *Wittenberg B. A., Robinson Th. E.* Oxygen requirements morphology cell count and membrane permeability of calcium-tolerant myocytes from adult rats // Cell. Tissue Res.— 1981.— 216, N 2.— P. 231—251.

Одес. ун-т им. И. И. Мечникова
М-ва высш. и сред. спец. образования УССР;
Физ.-хим. ин-т им. А. В. Богатского АН УССР, Одесса;
Всесоюз. кардиол. науч. центр АМН СССР, Москва

Поступила 11.12.85