

В. В. Алабовский, Е. J. Cragoe, А. А. Винокуров

Механизмы влияния гипернатриевой среды на сократительную активность изолированного сердца крыс

Увеличение внеклеточной концентрации натрия (от 140 до 200 ммоль/л) вызывает начальное уменьшение развиваемого давления левого желудочка, сменяющееся увеличением амплитуды сокращений на 40–50 % по сравнению с исходным состоянием. Хлорид лития (60 ммоль/л) не вызывал аналогичных изменений. Начальное уменьшение сократительной функции миокарда под действием гипернатриевой среды не было чувствительно к верапамилу, этмозину, лидокаину, кофеину или блокатору Na–H-обмена НМА. Верапамил (0,1 мкмоль/л) или НМА (1 мкмоль/л) не влияли на вызываемое гипернатриевой средой увеличение развиваемого давления. Положительное инотропное действие гипернатриевой среды проявлялось после остановки сердца верапамилом (2 мкмоль/л). Кофеин (10 ммоль/л), или блокаторы натриевых каналов: 6-IA (2,4 мкмоль/л), бензамил (0,04 мкмоль/л), фенамил (0,02 мкмоль/л) ослабляли положительное инотропное действие гипернатриевой среды.

Введение

В сократительной деятельности сердечной мышцы особое место принадлежит ионам натрия, которые не только участвуют в процессах электрического возбуждения миокарда, но и регулируют силу сокращений и потоки Ca^{2+} в клетки [1, 4, 6, 9, 10]. Известна также способность высокой внеклеточной концентрации ионов натрия препятствовать реперфузионным повреждениям сердца, стимулировать быстрое восстановление электрической активности кардиомиоцитов, активировать ионные насосы после ишемии [1–3]. Однако механизм действия повышенной концентрации ионов натрия на интактные сердечные клетки остается еще во многом неясным [11, 12]. Учитывая, что существенное изменение концентрации Na^+ наблюдается при патологических состояниях и использовании некоторых лекарственных препаратов, целью нашего исследования было изучение механизма влияния гипернатриевой среды на сократительную активность изолированного сердца крыс.

Методика

Эксперименты проводили на изолированных сердцах белых беспородных крыс, перфузированных по методу Лангендорфа оксигенированным раствором следующего состава (в ммоль/л): $NaCl$ – 140; $NaHCO_3$ – 2; NaH_2PO_4 – 0,5; KCl – 3; трис-ОН – 5 (рН 7,4); глюкозы – 11; $CaCl_2$ – 2. Крыс декапитировали под эфирным наркозом. После вскрытия грудной клетки сердце помещали в охлажденный раствор. В аорту вводили канюлю и со скоростью 10 мл/мин подавали исходный раствор (37 °С) в течение 20 мин для стабилизации сократительной функции. Затем сердце перфузи-

© В. В. Алабовский и др.

ровали гипернатриевой средой (200 ммоль/л Na^+). Используемые блокаторы или модификаторы ионотранспортных систем вводили за 5 мин до перфузии и в течение всего ее периода. Использовали высокоспецифичные блокаторы $\text{Na}-\text{H}$ -обмена — 3-амино-6-хлоро-N-диаминометил-5-(1-гомопиперидил)-пиразинокарбоксамид (НМА), натриевых каналов (фенамил или 3,5-диамино-6-хлоро-N-[амино-(анилино)метил]пиразинокарбоксамид; бензамил или 3,5-диамино-6-хлоро-N-[амино-(бензиламино)метил]пиразинокарбоксамид гидрохлорид; 6-IA или 3,5-диамино-6-иодо-N-(диаминометил)пиразинокарбоксамид (таблица).

Константы ингибирования (мкмоль/л) для натриевых каналов, $\text{Na}-\text{H}$ - и $\text{Na}-\text{Ca}$ -обмена некоторыми блокаторами — производными амилорида

Блокатор	Натриевые каналы	$\text{Na}-\text{H}$ -обмен	$\text{Na}-\text{Ca}$ -обмен
6-IA	2,4	18,2	1100
Бензамил	0,038	>500	200
Фенамил	0,02	>400	200
НМА	>300	0,16	100

Перед экспериментом препараты предварительно растворяли в диметилсульфоксиде (конечная концентрация составляла менее 0,01 %) и добавляли к перфузионным средам. В параллельных сериях экспериментов диметилсульфоксид также добавляли к растворам, но без препаратов. Сократительную активность миокарда изучали в изоволюмическом режиме с помощью латексного баллончика, введенного в полость левого желудочка. В работе был использован электроманометр фирмы «Bentley lab. Europe» и аналого-цифровой преобразователь для IBM PC. Полученные результаты обрабатывали с помощью программы «AWPE» и математически методом вариационной статистики с использованием критерия t Стьюдента, анализа вариации ANOVA и непараметрических критериев статистики.

Результаты и их обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют, что увеличение внеклеточной концентрации ионов натрия до 200 ммоль/л вначале вызывает ослабление силы сокращений на 80 % по сравнению с исходным состоянием. Продолжение перфузии гипернатриевой средой не только восстанавливает исходное развиваемое давление, но и увеличивает его на 40—60 %. Положительный инотропный эффект гипернатриевой среды не сопровождался увеличением диастолического давления (рис. 1).

После остановки сердца (2 мкмоль/л верапамила), гипернатриевая среда восстанавливала силу сокращения к 4-й минуте перфузии (рис. 2). Систолическое давление в этих экспериментах было выше исходных значений на 30—40 % несмотря на наличие верапамила.

Добавление 1 мкмоль/л гексаметиленамилорида, высокоспецифичного блокатора $\text{Na}-\text{H}$ -обмена, не влияло на вызываемые гипернатриевой средой изменения сократительной активности миокарда (см. рис. 1). Следовательно,

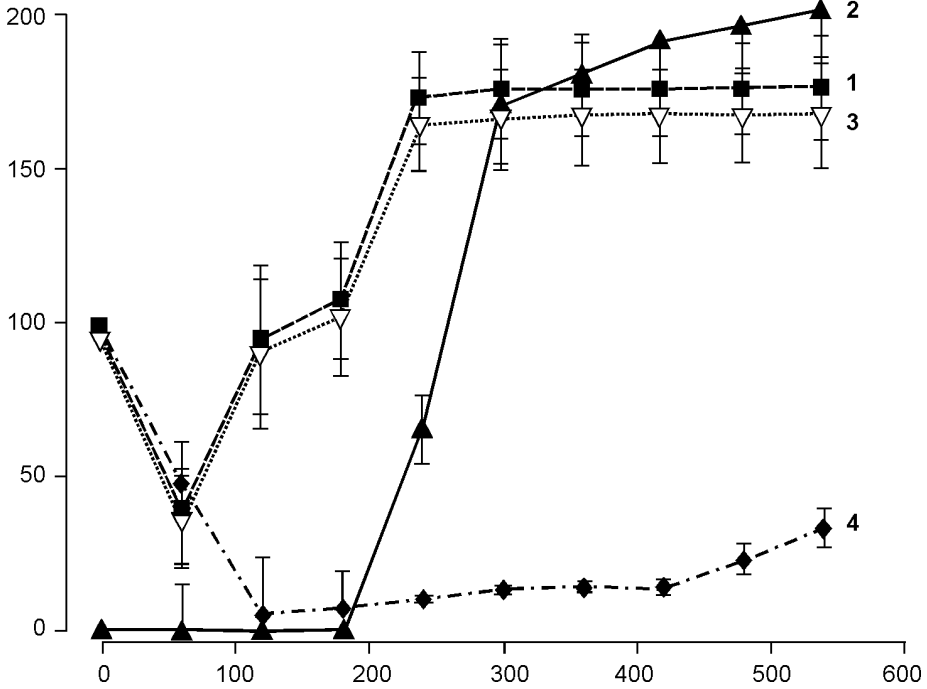


Рис. 1. Влияние верапамила, кофеина и НМА на развиваемое давление левого желудочка после увеличения внеклеточной концентрации натрия: 1 – контроль; 2 – верапамил (2 мкмоль/л); 3 – НМА (1 мкмоль/л); 4 – кофеин (10 ммоль/л). По оси абсцисс – время перфузии гипернатриевой средой. По оси ординат – развиваемое давление в процентах к исходному.

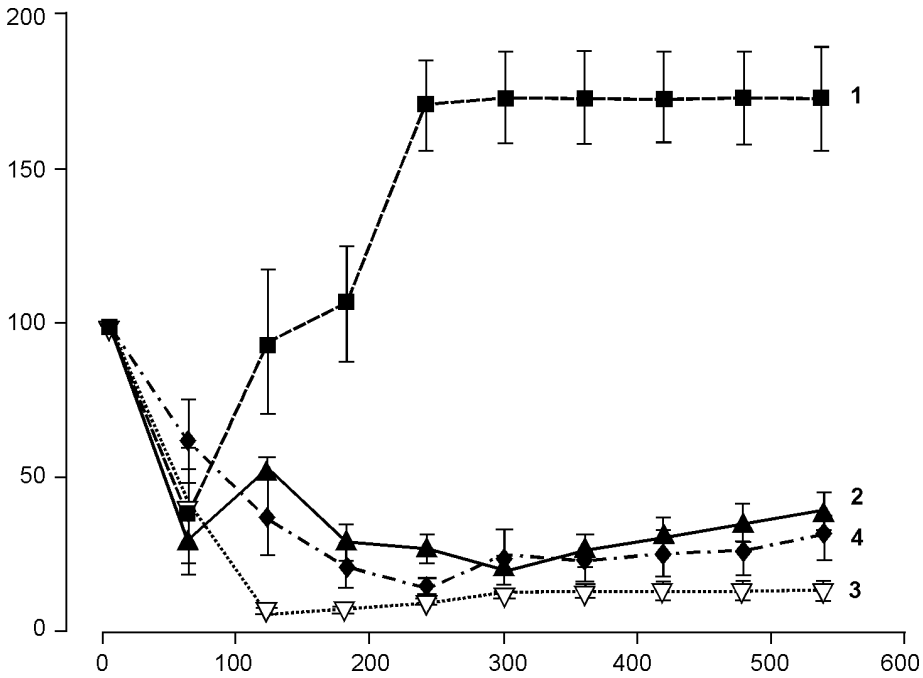


Рис. 2. Влияние верапамила, этomidина, лидокаина на развиваемое давление левого желудочка после увеличения внеклеточной концентрации натрия: 1 – контроль; 2 – бензамил; 3 – 6-IAA; 4 – фенамил. По оси абсцисс – время перфузии гипернатриевой средой. По оси ординат – развиваемое давление в процентах к исходному.

положительное инотропное действие гипернатриевой среды не было обусловлено процессом Na—H-обмена и сопряженного с ним Na—Ca-обмена.

Кофеин (5 ммоль/л) к 5-й минуте перфузии уменьшал развиваемое давление в левом желудочке по сравнению с контролем. Увеличение концентрации натрия до 200 ммоль/л также вызывало вначале ослабление силы сердечных сокращений, как и без кофеина. Однако, последующего усиления сокращений не наблюдалось (см. рис. 1). Таким образом, кофеин подавлял положительное инотропное действие гипернатриевой среды.

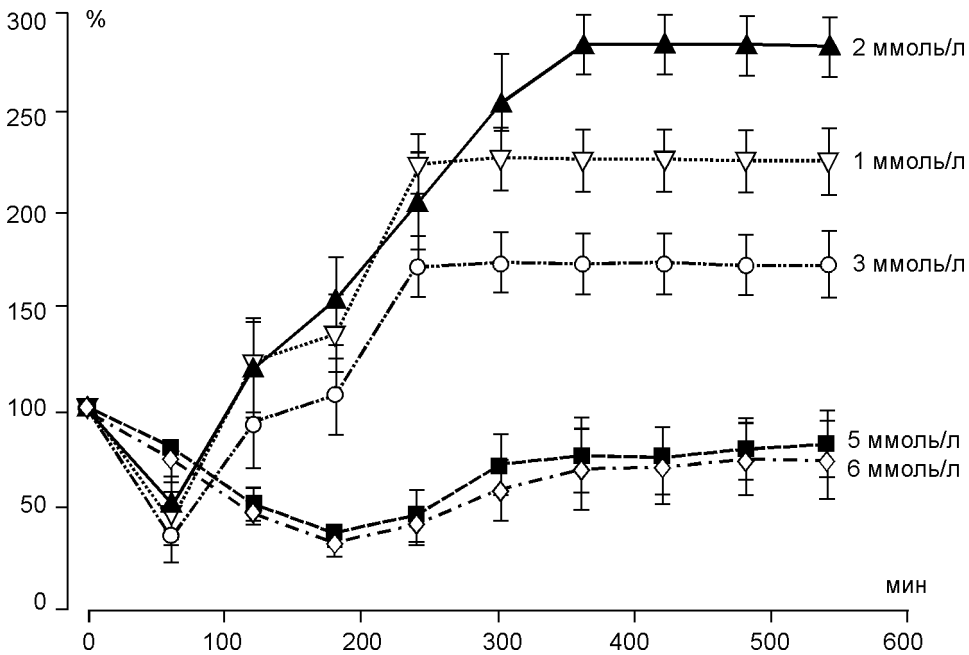
Аналогичные результаты были получены при использовании блокаторов натриевых каналов: 6-IA (2,4 мкмоль/л), бензамила (0,04 мкмоль/л) или фенамила (0,02 мкмоль/л). Данные вещества при добавлении в перфузионный раствор вызывали отрицательный инотропный эффект, на фоне которого гипернатриевая среда утрачивала свойство увеличивать силу сердечных сокращений (см. рис. 2).

Таким образом, блокирование натриевых каналов препятствует усилению сокращений миокарда, вызываемых гипернатриевой средой.

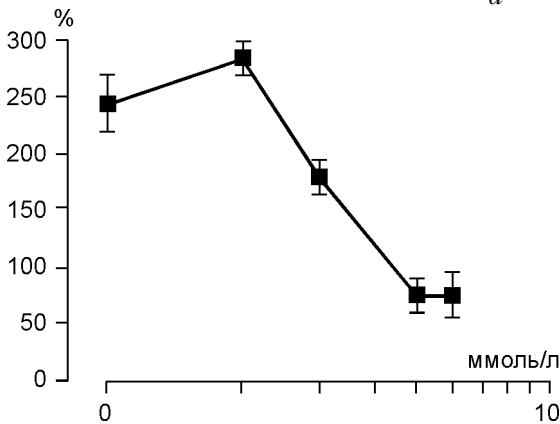
Для изучения роли натриевого насоса в осуществлении положительного инотропного действия гипернатриевой среды, нами были проведены эксперименты в условиях, способствующих снижению активности Na⁺,K⁺-АТФазы. Для этого концентрацию K⁺ в растворе снижали до 1—2 ммоль/л. Следует отметить, что положительное инотропное действие ионов натрия высокой концентрации увеличивается параллельно со снижением содержания K⁺ (рис. 3). Высокие концентрации K⁺ (6 ммоль/л), напротив, препятствовали увеличению давления, развиваемого левым желудочком.

Проведенные эксперименты показали S-образную зависимость положительного инотропного действия гипернатриевой среды от внеклеточной концентрации K⁺ (см. рис. 3, б). Увеличение внеклеточного содержания Na⁺ существенно усиливало сердечные сокращения при низких концентрациях K⁺ в растворе.

Механизм развития сокращений миокарда млекопитающих очень сложен и до конца не изучен [4, 10]. Установлено, что в увеличении внутриклеточной концентрации Ca²⁺, необходимой для сокращения, участвуют как внеклеточный, так и внутриклеточный пулы Ca²⁺ [4, 7]. Считают, что во время деполяризации мембраны именно кальций, связанный на сарколемме, обеспечивает максимальную силу сокращения. Вытеснение Ca²⁺ из его связей на сарколемме другими ионами, близкими по размеру к Ca²⁺, оказывает негативный инотропный эффект. Поскольку ионный радиус Na⁺ (0,095 мкм) очень близок к радиусу Ca²⁺ (0,099 мкм), можно предположить, что начальное снижение амплитуды сокращений под действием гипернатриевой среды связано с вытеснением Ca²⁺ из мест его связывания на сарколемме. Данное предположение подтверждается наблюдениями, в которых установлено отсутствие влияния на сократимость ионов лития. Его ионный радиус намного меньше (0,06 мкм) радиуса Ca²⁺ [5]. Кроме того, этот факт также дает основание считать, что осмотический компонент гипернатриевой среды не имеет существенного значения в ее действии на миокард (в проведенных нами экспериментах концентрация хлорида лития составляла 60 ммоль/л). Наше предположение подтверждает также неэффективность примене-



а



б

Рис. 3. Влияние концентрации ионов калия на развиваемое давление левого желудочка после увеличения внеклеточной концентрации натрия: а — динамика изменения развиваемого давления в зависимости от времени перфузии; б — зависимость развиваемого давления от концентрации K^+ .

ния различных блокаторов или модификаторов ионообменных систем (НМА, кофеина, 6-IA, бензамила или фенамила) изменять сократимость миокарда в первые минуты увеличения внеклеточной концентрации натрия. Увеличение внеклеточной концентрации ионов натрия усиливает конкуренцию между внеклеточным Na^+ и Ca^{2+} на внешней стороне $Na-Ca$ -обменника [9], увеличивает градиент Na^+ . Вследствие этого содержание кальция, поступающего внутрь клеток через систему $Na-Ca$ -обмена, может существенно уменьшаться. Другие ионы (в частности ионы лития) не могут заменять Na^+ на внешней стороне $Na-Ca$ -обменника.

Через несколько минут после увеличения внеклеточной концентрации натрия, постепенно возрастает его внутриклеточное содержание. Это вызывает реверсию $Na-Ca$ -обмена, поток Ca^{2+} внутрь клеток увеличивается, что сопровождается усилением сокращений сердца. Косвенным доказательством

этого предположения является усиление положительного инотропного действия гипернатриевой среды в условиях, способствующих снижению активности Na^+ , K^+ -АТФазы (низкая концентрация K^+). Вероятно, важное место занимает и кальцийиндуцируемое высвобождение ионов Ca из саркоплазматического ретикулума. Опустошение внутриклеточных запасов Ca^{2+} кофеином ослабляет триггерные свойства входящего Ca [4]. Возможно, поэтому не наблюдается второй фазы действия повышенной концентрации натрия — усиления силы сокращений.

Предполагалось, что положительное инотропное влияние гипернатриевой среды может быть вызвано активированием $\text{Na} - \text{H}$ -обмена. Однако это не подтвердилось, поскольку высокоспецифичный блокатор $\text{Na} - \text{H}$ -обмена НМА не влиял на вызванные высокой внеклеточной концентрацией натрия изменения сократительной функции.

Недавно проведенные исследования свидетельствуют о существовании тесной функциональной связи между натриевыми каналами и саркоплазматическим ретикулумом в миокарде млекопитающих. Как показали Leblanc и Hume [7], потока натрия, входящего через натриевые каналы, может быть достаточно для увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , обеспечивающей сокращения сердца. Важно отметить, что блокаторы натриевых каналов (6-IA, бензамил или фенамил) не только полностью подавляют вызываемое гипернатриевой средой увеличение силы сокращений, но и обладают в этих условиях негативным инотропным эффектом.

Кроме того, входящий через систему $\text{Na} - \text{H}$ -обмена поток Ca^{2+} способен активировать высвобождение дополнительного количества Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума миокарда млекопитающих, что сопровождается усилением сокращения [7, 9]. Другая система поступления Ca^{2+} в клетку (кальциевые каналы) вероятно не участвует в положительном инотропном влиянии высокой внеклеточной концентрации натрия. На это указывает обнаруженное нами свойство гипернатриевой среды восстанавливать сокращения миокарда после остановки сердца верапамилом.

V. V. Alabovskiy, E. J. Cragoe, A. A. Winokurov

MECHANISMS OF ACTION OF HYPERSODIUM MEDIUM ON CONTRACTILE ACTIVITY OF ISOLATED RAT HEART

Despite the high efficiency of elevated concentrations of sodium ions during myocardial ischemia and calcium paradox, the molecular mechanism of action of hypersodium media on heart contractions remains unknown. The purpose of the investigation was to study mechanisms by which raised concentrations of sodium ions alter cardiac contractility. Subsequent to initially developed reduced pressure in the left ventricle, elevated concentrations of sodium ions (200 mM instead of 140 mM NaCl, 3 mM KCl) produced an increased force of contractions of about 50%. The first stage of decrease in developed pressure did not relate to elevated tonicity of extracellular ionic milieu because lithium chloride (60 mM) did not produce the same effect. This action of elevated concentrations of sodium ions has been shown to be independent of blockers of ion-transporting systems (caffeine, verapamil, ethmozine, HMA or lidocaine). Raising the contractions by elevating the concentration of sodium ions (second stage) has been shown to be susceptible to sodium channel blockers (6-IA,

benzamil, of phenamil) and to caffeine. Decreasing of potassium concentration (from 3 mM to 1–2 mM amplified, and increasing of K^+ level (from 3 mM to 6 mM) attenuated the positive inotropic action of the elevated concentration of sodium ions. The positive inotropic effect due to elevated concentrations of sodium ions remains even after heart arrest by high concentrations of verapamil (2 μ M). Lithium chloride (60 mM) failed to elevate left ventricle developed pressure which was raised by elevated concentrations of sodium ions. These data suggest that the elevated concentration of sodium ions could effect Na^+/Ca^{2+} exchange and provoke Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum by changing the sodium gradient and resulting in Ca^{2+} entry via Na^+/Ca^{2+} exchange. These observations are consistent with the hypothesis of Leblanc N., Hume J.R. (1990) regarding sodium-induced calcium ion release from sarcoplasmic reticulum.

Department of Biochemistry Voronezh State Medical Academy, Russia

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алабовский В.В. Энергозависимые процессы миокарда при изменении внеклеточной концентрации натрия и активировании $Na-Ca$ -обмена: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М.: Университет Дружбы народов, 1986. — С. 63.
2. Алабовский В.В., Винокуров А.А., Кобрин В.И., Олейников О.Д. Предупреждение искусственным увеличением трансмембранного градиента натрия реперфузионных повреждений сердца при «кальциевом парадоксе» и постишемической реперфузии // Физиол. журн. — 1991. — **37**, №3. — С.25-30.
3. Кобрин В.И., Алабовский В.В., Алипов Н.Н., Олейников О.Д. Электрическая активность клеток сердца и сократительная активность миокарда при изменении внеклеточной концентрации натрия // Физиол. журн. СССР. — 1988. — **24**, № 9. — С.1257-1262.
4. Chapman R.A. Control of cardiac contractility at the cellular level // Amer. J. Physiol. — 1983. — **245**. — P. H535-H552.
5. Gilbert J.C., Shirayama T., Pappano A.J. Inositol triphosphate promotes $Na-Ca$ exchange current by releasing calcium from sarcoplasmic reticulum in cardiac myocytes // Circulat. Res. — 1991. — **91**. — P. 1632-1639.
6. Frantisek K., Cole W., Ostadal B., Dhalla N.S. Transient inotropic effect of low extracellular sodium in perfused rat heart // Amer. J. Physiol. — 1990. — **259**. — P.H712-H719.
7. Leblanc N., Hume J.R. Sodium current — induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum // Science. — 1990. — **248**, N 4953. — P. 372-375.
8. Mclaghlin A., Eng W.K., Vaio G. et al. Dimethonium, a divalent cation that exerts only a screening effect on the electrostatic potential adjacent to negatively charged phospholipid bilayer membranes // J.Membr. Biol. — 1983. — **76**. — P. 183-193.
9. Miura Y., Kimura J. Sodium- calcium exchange current. Dependence on internal Ca and Na and competitive binding of external Na and Ca // J. Gen. Physiol. — 1989. — **93**. — P. 1129-1145.
10. Nathan R.D. Negative surface charge: its identification and regulation of cardiac electrogenesis. In: Cardiac Muscle. The regulation of excitation and contraction. — N.-Y.: Academ. Press, 1986. — P. 255-298.
11. Sheu S.S., Blaustein M.P. Sodium- Calcium exchange and control of Cell Calcium and contractility in cardiac and vascular smooth muscles. In: The Heart and Cardiovascular system. N.-Y.: Raven Press, 1992. — P. 903-942.
12. Tillish J.H., Langer G.A. Myocardial mechanical responses and ionic exchange in elevated sodium perfusate // Circulat.Res. — 1974. — **34**. — P. 211-213.

*Воронеж. мед. академия им. Н. Н. Бутенко
МЗ и мед. промышленности РФ*

*Материал поступил
в редакцию 21.03.98*