

**DE DEPOLARISATIE VAN
ATRIUMSPIER**

J.H. PASMOOIJ

ERRATA:

- p. 35, 9e regel van boven: -60 moet zijn: 60
- p. 40, 5e regel van onderen: op moet zijn: voor
- p. 53, 8e regel van onderen: membraan- moet zijn:
membraanrust-
- p. 56, 12e regel van onderen: Figuur 9 toont een experiment...
moet zijn: Figuur 9 toont uit
een experiment....
- p. 64, 14e regel van boven:elektrogene natriumpomp door..
moet zijn: ...elektrogene natrium-
pomp werd steun geleverd door ...
- p. 65, 4e regel van boven: tegengewekt moet zijn: tegengewerkt
- p. 70, fig. 13, onderschrift: $|K^+|_i$ moet zijn: $|K^+|$
Op tijdstip A... moet zijn:
Na 30 sec
- p. 86, 20e regel van boven: dot moet zijn: doet
- p. 94, fig. 21: In de figuur: 10^{-7} mol/l moet zijn:
 $5 \cdot 10^{-7}$ mol/l
- p. 96, 3e regel van boven: velmembraan moet zijn: celmembraan
16e regel van onderen: to moet zijn: tot
- p. 98, 5e regel van onderen: g_{Na} moet zijn: g_K
- p. 101, 7e regel van onderen: ...van dV/dt max.... moet zijn:
...op dV/dt max...

DE DEPOLARISATIE VAN ATRIUMSPIER

DE DEPOLARISATIE VAN ATRIUMSPIER

Academisch proefschrift

ter verkrijging van de graad van
doctor in de Geneeskunde
aan de Universiteit van Amsterdam
op gezag van de Rector Magnificus
Dr. A. de Froe, hoogleraar in
de faculteit der Geneeskunde,
in het openbaar te verdedigen in de aula der Universiteit
(tijdelijk in de Lutherse Kerk, ingang Singel 411, hoek Spui)
op donderdag 6 juni 1974 te 16.00 uur

door

Jakob Herbert Pasmooij
geboren te Polsbroek

Promotor: Prof. Dr. L.N. Bouman

Co-promotor: Prof. Dr. J.Th.F. Boeles

Co-referent: Dr. M.J. Janse

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek werd verricht in het Fysiologisch Laboratorium van de Universiteit van Amsterdam (direkteur: Prof. Dr. J.Th.F. Boeles).

voor Christine

Duco

Tessa

Woods (1984) 100
Jones
The Day

INHOUDS-OPGAVE.

	blz.
HOOFDSTUK 1. Inleiding en probleemstelling	9
HOOFDSTUK 2. Literatuur: elektrochemische eigenschappen van hartspeer	13
HOOFDSTUK 3. Methodiek	39
HOOFDSTUK 4. Prikkelfrekwentie en de diastolische membraanpotentiaal	50
HOOFDSTUK 5. Prikkelfrekwentie en de aktiveringskurve	69
HOOFDSTUK 6. Prikkelfrekwentie en de invloed van ouabaine op de aktiepotentiaal	91
HOOFDSTUK 7. Poging tot een verklaring van de frekwentie-afhankelijke potentiëring van de kontraktiekracht	100
SAMENVATTING	105
SUMMARY	109
APPENDIX	113
LITERATUURLIJST	116
NAWOORD	133

Woods Street 100
June
1924

HOOFDSTUK 1

INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING

Het is reeds lang bekend, dat de kontraktie van het hart voorafgegaan wordt door een elektrisch proces. Aan het begin van iedere hartcyclus plant zich vanuit de sino-auriculaire knoop, een groepje cellen gelegen in het rechter atrium bij de inmondingsplaats van de vena cava superior, een kortdurende potentiaalverandering over het hart voort. Deze potentiaalverandering wordt actiepotentiaal genoemd. De voortgeleiding van de actiepotentiaal vindt plaats volgens een konstant patroon: eerst over beide atria, vervolgens door de atrio-ventriculaire knoop en het geleidingssysteem en tenslotte over beide ventrikels. Door de actiepotentiaal wordt het kontraktie-mechanisme van de hartspier in werking gezet. Het konstante voortgeleidingspatroon van de actiepotentiaal heeft tot gevolg, dat de beide atria eerder tot kontraktie komen dan de ventrikels.

Er is veel onderzoek gedaan over de voortgeleidingssnelheid van de actiepotentiaal in het hart. Hierbij is gebleken, dat er binnen het hart zelf enorme verschillen bestaan, variërend van enige centimeters per seconde in bepaalde delen van de sino-auriculaire knoop tot enige meters per seconde in delen van het geleidingssysteem. Na de ontwikkeling van de mikro-elektrode (Ling en Gerard, 1949) heeft men kunnen aantonen, dat de voortgeleidingssnelheid van de actiepotentiaal in sterke mate afhankelijk is van het verloop van de actiepotentiaal. Met de mikro-elektrode techniek is aangetoond dat in de spiervezels van het hart over de celmembraan een potentiaalverschil heerst van ca. 80 mV, binnenzijde van de cel negatief ten opzichte van de buitenzijde. Dit potentiaalverschil wordt kortweg membraanpotentiaal genoemd. Tevens bleek, dat de actiepotentiaal gevormd wordt door een kortdurende afname van dit potentiaalverschil

(depolarisatie-fase) en een hierop volgende, relatief trage terugkeer naar de oorspronkelijke waarde (repolarisatie-fase), eventueel onderbroken door een periode, waarin het potentiaalverschil konstant blijft en dat om deze reden plateau-fase wordt genoemd. Volgens de ionentheorie van Hodgkin en Huxley (Hodgkin, 1951) berust de depolarisatie-fase op een snelle instroom van natrium-ionen. De maximale waarde, die de depolarisatiesnelheid van de actiepotentiaal bereikt, is een maat voor de instroom van de natrium-ionen gedurende de depolarisatie-fase. Deze maximale depolarisatiesnelheid is tevens een belangrijke faktor voor de voortgeleidingssnelheid van de actiepotentiaal. Veranderingen in de maximale depolarisatiesnelheid hebben veranderingen van de voortgeleidingssnelheid tot gevolg en wel zodanig, dat toename van de maximale depolarisatiesnelheid een verhoging van de voortgeleidingssnelheid veroorzaakt.

Volgens de genoemde ionentheorie is de maximale depolarisatiesnelheid zowel afhankelijk van de ionensamenstelling van het extracellulaire en het intracellulaire milieu, welke laatste actief in stand wordt gehouden door de spiervezels zelf, als van de verandering van het geleidingsvermogen, die de membraan van de spiervezels ondergaat tijdens de aktivatie. Viersma et al. (1968 a) hebben in het konijne-atrium aangetoond, dat ook de prikkelfrekwentie van invloed is op de maximale depolarisatiesnelheid. De oorzaak hiervan zou zijn gelegen in een falen van het actieve natriumtransport bij hogere frekwenties (Viersma et al., 1968 b). Dit mechanisme, ook wel Na/K-pomp genoemd, draagt zorg voor het transport van natrium-ionen vanuit de cel naar de extracellulaire ruimte, teneinde de intracellulaire concentratie van natrium-ionen konstant te houden. Een tekortschieten van dit actieve transport leidt tot verhoging van de intracellulaire natrium-ionen-concentratie en heeft op deze wijze een afname van de maximale depolarisatiesnelheid tot gevolg.

De alternatieve verklaring, een wijziging in het geleidingsvermogen van de celmembraan bij hogere frekwenties,

werd onwaarschijnlijk geacht. Een verandering van de membraanpotentiaal, die hieraan ten grondslag zou moeten liggen (Weidmann, 1955 a), kon namelijk pas bij relatief hoge frekventies worden aangetoond, zodat bij de meeste toegepaste frekventies een verhoging van de membraanpotentiaal niet als oorzaak voor de afname van de maximale depolarisatiesnelheid kon worden aangemerkt.

Enige jaren na de experimenten van Viersma en medewerkers hebben wij in ons laboratorium een methode ontwikkeld, waarmee het mogelijk was om de maximale depolarisatiesnelheid en de membraanpotentiaal sneller en nauwkeuriger te meten dan voorheen het geval was. Bij enkele oriënterende experimenten met deze methode in een geïsoleerd konijne-atrium bleek ons, dat er ook bij de relatief lage frekventies in het voor het konijnehart normale werkgebied een daling van de membraanpotentiaal geregistreerd kon worden, naarmate de hartfrequentie hoger was. Dit was in tegenspraak met de reeds genoemde waarneming van Viersma. Om deze reden besloten wij met onze methode de depolarisatie-fase van de actiepotentiaal van het konijne-atrium opnieuw aan een onderzoek te onderwerpen. Een additioneel motief hiervoor werd geleverd door de waarneming van Mater en Freud (niet gepubliceerd), dat een vertraging van de geleiding als gevolg van een door elektrische stimulatie opgedrongen frekwentieverhoging ook aantoonbaar was bij het konijnehart in vivo. Hierdoor werd uitgesloten, dat wij te maken hadden met een verschijnsel, dat zich uitsluitend in vitro voordeed en door de experimentele omstandigheden was geïnduceerd.

Onze vraagstelling luidde als volgt.

Welk mechanisme ligt of welke mechanismen liggen ten grondslag aan de afname van de maximale depolarisatiesnelheid, die optreedt bij verhoging van de hartfrequentie?

Deze vraagstelling viel in de volgende onderdelen uiteen:

1. Welke verandering ondergaat de membraanpotentiaal als gevolg van een frekwentieverhoging?
2. Geldt voor de atriumdepolarisatie de door Weidmann in Purkinjevezels van het schapehart vastgestelde relatie tussen depolarisatiesnelheid en membraanpotentiaal?
3. Is de verandering van de membraanpotentiaal voldoende om de reeds door Viersma waargenomen vermindering van de depolarisatiesnelheid te verklaren?

HOOFDSTUK 2

LITERATUUR: ELEKTROCHEMISCHE EIGENSCHAPPEN VAN HARTSPIER

2.1. INLEIDING

In de laatste decennia is er een overweldigende hoeveelheid publikaties verschenen over de elektrische eigenschappen van hartspier. Nadat eerst met behulp van extracellulaire meettechnieken enig inzicht was verkregen in de impulsformatie en de impulsgeleiding in het hart, is door de komst van de mikro-elektrode (Ling en Gerard, 1949) een ware revolutie uitgebroken in de voortgang van het elektrofysiologisch onderzoek van hartspier. De meting van potentiaalverschillen aan weerszijde van de celmembraan heeft de kennis over de elektrische verschijnselen van de hartspier enorm vergroot. In dit hoofdstuk zullen wij een overzicht trachten te geven van de huidige kennis. Aangezien onze experimenten uitgevoerd zijn in het konijne-atrium, zullen wij ons in dit overzicht grotendeels beperken tot de gegevens die verkregen zijn uit het zoogdierenhart.

Aangenomen wordt, dat in rust over de membraan van myocard-vezels een konstant potentiaalverschil heerst. Deze membraan-potentiaal draagt het teken van de polariteit van de binnenzijde. In het atrium van het zoogdierenhart bedraagt de membraanpotentiaal -70 mV tot -90 mV. De waarden die worden opgegeven voor vezels van het ventrikelmyocard, variëren van -75 mV tot -90 mV en hoger. In de hartliteratuur wordt algemeen aangenomen, dat de membraanpotentiaal wordt bepaald door bewegingen van ionen door de celmembraan. Wij zullen hieronder de factoren bespreken, die bijdragen tot het voortbestaan van dit potentiaalverschil.

2.2. INTRACELLULAIRE EN EXTRACELLULAIRE IONENCONCENTRATIES

Er bestaat een groot verschil in samenstelling tussen de intracellulaire en de extracellulaire vloeistof. De extracellulaire concentraties worden verondersteld weinig af te wijken van die van bloedplasma of van de gebruikte doorstromingsvloeistof en zijn dus eenvoudig te bepalen. In de door ons gebruikte doorstromingsvloeistof (zie blz. 40) bedragen de concentraties van de belangrijkste ionen (mmol/l): $|\text{Na}^+| = 156,0$, $|\text{K}^+| = 5,6$, $|\text{Cl}^-| = 138,4$ en $|\text{Ca}^{++}| = 2,2$. De concentraties in andere doorstromingsvloeistoffen wijken hier slechts in geringe mate van af. De intracellulaire concentratie van een ion kan worden berekend uit de extracellulaire concentratie, het iongehalte van het gehele weefsel en de verdeling van het weefsel in intracellulaire en extracellulaire ruimte. In theorie kan de extracellulaire ruimte (E.R.) worden bepaald door aan de doorstromingsvloeistof een stof toe te voegen, die de celmembraan slecht of in het geheel niet passeert. Meestal worden hiervoor inuline, sucrose, mannitol, natrium- of sulfaationen gebruikt. Na verdeling over de E.R. wordt uit de weefselconcentratie van de stof de grootte van de E.R. berekend. In de praktijk blijkt echter de op deze wijze bepaalde grootte van de E.R. afhankelijk te zijn van de stof waarmee wordt gemeten (Krogh et al., 1944; Barclay et al., 1960; Page, 1962 a; Page en Storm, 1966; Bosteels en Carmeliet, 1972). Op twijfelachtige gronden, o.a. door een aanname over de grootte van de intracellulaire chloorionen-concentratie, wordt door sommige onderzoekers E.R. berekend als zogenaamde chloorruimte (Robertson en Peyser, 1951). Volgens metingen van Barclay et al. (1960) in het rattehart is de chloorruimte groter dan de inuline- of de sucroseruimte. Taylor et al. (1961) echter komen in hetzelfde preparaat tot de tegenover gestelde conclusie. Deze methode van E.R.-meting is dus onjuist.

Afhankelijk van de bepalingsmethode worden in de literatuur waarden voor de E.R. van myocardweefsel opgegeven, die

variëren van 20 tot 40% van het totale weefselvolume. De verschillen worden waarschijnlijk voor een deel veroorzaakt door de ongelijke veronderstellingen over de ionenverdeling of over de membraanpermeabiliteit voor de stof, waarmee de bepaling wordt verricht. Andere foutenbronnen kunnen gelegen zijn in binding van de stof, waarmee gemeten wordt, aan intracellulaire of extracellulaire structuren, of in extracellulaire diffusie-barrières. Page en Bernstein (1964) hebben aangetoond, dat de extracellulaire ruimte geen vrije diffusie toelaat. Zij gebruikten een katteventrikel als scheidingswand tussen twee oplossingen van verschillende samenstelling. Uit hun metingen volgde, dat de E.R. zich kinetisch niet homogeen gedraagt.

De wisselende waarden van de E.R. leiden tot verschillen in de berekende intracellulaire concentraties. Een overzicht van enige literatuurgegevens over de intracellulaire natrium- en kaliumconcentraties wordt gegeven in de onderstaande tabel.

Preparaat	Meetmethode	$ \text{Na}^+ _i$ (mmol/kg celwater)	$ \text{K}^+ _i$ (mmol/kg celwater)	Auteurs
Rat, ventrikel	sucrose	30	151	Page en Page, 1968
Rat, ventrikel	$^{35}\text{SO}_4$	30	151	Page en Page, 1968
Kat, ventrikel	inuline	49	168	Page en Solomon, 1960
Kat, ventrikel	mannitol	5	208	Page en Storm, 1966
Kat, ventrikel	chloor	6,5	151	Robertson en Dunihue, 1954
Konijn, atrium	^{24}Na	58	152	Goodford en Vaughan Williams, 1962

Tabel 1

Behalve natrium- en kaliumionen komen ook chloorionen in relatief hoge concentratie voor in hartspeer. Voor het geïsoleerde hartoorpreparaat van de rat berekende Lamb (1961) een $[\text{Cl}^-]_i$ van 25 mmol/l, terwijl Page (1962 b) voor papillairspieren van de kat op 17 mmol/l uitkwam. De intracellulaire concentratie van vrije calciumionen $[\text{Ca}^{++}]_i$ is bijzonder gering. Aangenomen wordt, dat in hartspeer, evenals in skeletspier, het contractieproces in werking wordt gezet wanneer $[\text{Ca}^{++}]_i$ stijgt boven 10^{-7} mmol/l. Het merendeel van het intracellulaire calcium is gebonden aan het sarcoplasmatisch reticulum of aan de mitochondriën.

Hoewel de beschikbare meetmethoden geen nauwkeurige bepaling van de intracellulaire concentratie mogelijk maken, is het duidelijk dat de concentratie van kalium-ionen in de extracellulaire vloeistof lager is dan in de intracellulaire vloeistof, terwijl voor natrium-, chloor- en calcium-ionen het omgekeerde het geval is.

2.3. HET GELEIDINGSVERMOGEN VAN DE CELMEMBRAAN

In 1939 is door Cole en Hodgkin de specifieke membraanweerstand gemeten van het reuzenaxon van de pijlinktvis (*Loligo Pealii*). De uiteinden van het axon bevonden zich in zeewater, het middengedeelte bevond zich in een olielaag die beide zeewatercompartimenten scheidde en in breedte was te variëren. Met behulp van een elektrode in beide elektrolytoplossingen bepaalden zij de lengte-weerstand-relatie en berekenden vervolgens de specifieke membraanweerstand, ongeveer 1000 ohm.cm^2 .

Hodgkin, Huxley en Katz (1952) hebben het gedrag van de axonmembraan bestudeerd bij verschillende hoogten van de membraanpotentiaal. Zij gebruikten hiervoor de zogenaamde voltage clamp techniek. Deze techniek berust op het principe dat aan de celmembraan een bepaald potentiaalverschil wordt opgedrongen, dat via een terugkoppelingsmechanisme konstant wordt gehouden. De stroom benodigd voor het konstant houden

van het potentiaalniveau, wordt gemeten en is gelijk aan de stroom die gedurende de potentiaalsprong door de membraan loopt. Hodgkin, Huxley en Katz toonden ondermeer aan, dat er bij potentiaalsprongen boven een zogenaamde drempelwaarde na een initiële capacitiële stroom een kortdurende, binnenwaarts gerichte stroom van positieve ionen ging lopen die overging in een buitenwaarts gerichte stroom. Deze laatste bleef bestaan, zolang het ingestelde potentiaalniveau gehandhaafd bleef. De membraanweerstand bleek op een gecompliceerde wijze afhankelijk te zijn van de membraanpotentiaal. Zij berekenden, dat bij een voldoende grote potentiaalsprong de specifieke membraanweerstand zowel tijdens de binnenwaarts gerichte als tijdens de buitenwaarts gerichte stroom kon afnemen tot ongeveer 30 ohm cm^2 . Deze resultaten vertoonden sterke overeenkomst met de publikatie van Cole en Curtis (1939), waarin werd medegedeeld dat de axonmembraan na supraluminale prikkeling, dus tijdens een actiepotentiaal, een "resistance breakdown" onderging van 1000 naar 20 ohm cm^2 .

Door de samenstelling van de extracellulaire vloeistof te variëren, toonden Hodgkin en Huxley (1952 a) vervolgens aan, dat de kortdurende binnenwaarts gerichte membraanstroom gedragen werd door natrium-ionen en de buitenwaarts gerichte stroom door kalium-ionen. Het geleidingsvermogen voor deze ionen was dus veranderd. Zij berekenden, dat bij een depolariserende potentiaalsprong van ongeveer 100 mV het geleidingsvermogen voor natrium-ionen en kalium-ionen met respectievelijk een faktor 500 en 30 kon toenemen ten opzichte van de rustwaarde (Hodgkin en Huxley, 1952 a, fig. 9 en 10). Dit steunde de eerder door Hodgkin en Katz (1949) opgestelde hypothese, dat verandering van de doorlaatbaarheid van de celmembraan voor ionen van fundamenteel belang was voor het elektrische gedrag van de celmembraan na prikkeling. Uitgaande van aangetoonde ionen-concentratiegradiënten over de axonmembraan en van eveneens aangetoonde veranderingen in het geleidingsvermogen van de membraan voor de verschillende ionen hebben Hodgkin en Huxley (1952 a, b, c en d) hun

ionentheorie opgesteld voor de membraanpotential in rust en voor de actiepotential.

Hoewel er verschillende alternatieve hypothesen zijn opgesteld (zie b.v. de monografie van Ling, 1962) is er geen zo algemeen geaccepteerd als die van Hodgkin en Huxley. Ook voor hartspeer wordt algemeen uitgegaan van deze ionentheorie, hierbij gesteund door de ook in dit weefsel aangetoonde concentratieverschillen tussen extracellulaire en intracellulaire vloeistof en de ionenstromen gedurende een actiepotential of een opgedrongen potentialniveau.

2.4. DE MEMBRAANPOTENTIAL IN RUST

De membraanpotential in rust komt zowel door een passieve ionenbeweging door de celmembraan tot stand, als door een actieve ionenbeweging. De bijdrage van de passieve ionenbeweging, de diffusie potential, wordt hieronder besproken; de bijdrage van het actieve transport, de elektrogene natriumpomp, wordt besproken op blz. 34 e.v.

Door de beweging van een bepaald ion in de richting van de concentratiegradiënt ontstaat een potentialverschil over de membraan (V_m). Door dit potentialverschil wordt de kracht die op de ionen in de membraan op grond van de concentratiegradiënt wordt uitgeoefend, tegengewerkt. De verplaatsing van ionen van hoge naar lage concentratie gaat door, totdat de elektrochemische potential nul is, dat wil zeggen totdat de krachten als gevolg van de elektrische gradiënt en van de concentratiegradiënt elkaar opheffen. Het dan heersende potentialverschil wordt de evenwichtspotential voor de betrokken ionensoort genoemd (V_{ion}). De grootte van de evenwichtspotential kan worden berekend volgens de formule van Nernst:

$$(1) \quad V_{ion} = \frac{RT}{Fz} \ln \frac{(ion)_e}{(ion)_i} \quad \text{volt}$$

R, T en F zijn respectievelijk de gaskonstante, de absolute temperatuur en de konstante van Faraday, z geeft de valentie van het ion weer. De ionenactiviteiten in extracellulaire en

intracellulaire vloeistof zijn aangegeven met respectievelijk $(ion)_e$ en $(ion)_i$.

De ionen bewegen dus door de membraan totdat $V_m = V_{ion}$. De stroom die door bepaalde ionen wordt gedragen, is op ieder moment afhankelijk van de elektrochemische potentiaal en het geleidingsvermogen van de membraan voor deze ionen (Hodgkin en Huxley, 1952 a):

$$(2) \quad I_{ion} = g_{ion} (V_m - V_{ion})$$

De stroomdichtheid I_{ion} wordt uitgedrukt in mA/cm^2 , het geleidingsvermogen g_{ion} in mho/cm^2 ($= 1/ohm \text{ cm}^2$) en V_m en V_{ion} in mV.

In rust is V_m in myocardvezels van het atrium ongeveer -80 mV. We kunnen een schatting maken van V_{Na} en V_K door bij de berekening met de Nernst-formule in plaats van de (onbekende) ionenaktiviteiten de ionenconcentraties te gebruiken. Met de door Goodford en Vaughan Williams (1962) opgegeven waarden voor $[Na^+]_i$ en $[K^+]_i$ (zie tabel 1, blz. 15) en de concentraties in onze doorstromingsvloeistof worden voor een temperatuur van 37° Celsius berekend: $V_{Na} = +26$ mV en $V_K = -88$ mV. In rust bestaat er dus een uitstroom van kalium-ionen en een instroom van natrium-ionen.

Algemeen wordt verondersteld, dat in rust een konstant potentiaalverschil over de membraan heerst. Wanneer voorlopig aangenomen wordt dat in rust alleen de bewegingen van natrium- en kalium-ionen van belang zijn (wij komen nog op deze aanname terug), dan volgt hieruit: $I_{Na} = I_K$. Volgens vergelijking (2) is dan:

$$(3) \quad g_K (V_m - V_K) = g_{Na} (V_m - V_{Na})$$

Aangezien uit de getallen blijkt, dat in rust de elektrochemische potentiaal voor kalium-ionen aanzienlijk lager is dan voor natrium-ionen, moet in hartspier de membraan in rust beter doorlaatbaar zijn voor kalium- dan voor natrium-ionen. Dit is in overeenstemming met gegevens uit de axonmembraan (Hodgkin en Katz, 1949) en met gegevens uit de skeletspier

van de kikker (Katz, 1966). Veranderingen van de concentratiegradiënt voor kalium-ionen hebben door de relatief hoge g_K dan ook een grote invloed op I_K en daarmee op de hoogte van de membraanpotentiaal in rust.

In rust "lekker" dus voortdurend kalium-ionen naar buiten en natrium-ionen naar binnen. De intracellulaire concentratie van deze ionen wordt echter over langere tijd konstant gehouden door een actief, in de celmembraan aanwezig mechanisme, dat in staat is om natrium- en kalium-ionen te verplaatsen tegen hun respectieve elektrochemische gradiënt in. Dit mechanisme wordt Na/K-pomp genoemd. Op blz.30 wordt uitvoerig op dit actieve mechanisme ingegaan.

Uit het bovenstaande is duidelijk, dat ionen invloed hebben op de membraanpotentiaal, wanneer zij in staat zijn om de celmembraan te passeren en wanneer voor deze ionen een actief pompmechanisme bestaat. In het axon en in skeletspierweefsel is de doorlaatbaarheid van de celmembraan voor chloor-ionen zeer hoog (Hodgkin en Katz, 1949; Giebisch et al., 1957; Hodgkin en Horowitz, 1959; Hutter en Noble, 1960). In het zoogdierenhart, waarvan gegevens bekend zijn uit papillairspieren en Purkinje-vezels, lijkt de doorlaatbaarheid voor chloor-ionen in rust echter betrekkelijk laag te zijn (Carmeliet, 1961; Hutter en Noble, 1961; Page, 1962). Er is nimmer een actief transportmechanisme voor chloor-ionen aangetoond. Mede op grond hiervan wordt verondersteld, dat in de meeste weefsels, waaronder hartspeer, de chloor-ionen verdeeld zijn volgens het heersende potentiaalverschil.

Volgens de concentratiegradiënt moet de elektrochemische gradiënt voor calcium-ionen betrekkelijk groot zijn bij de in rust heersende membraanpotentiaal. Algemeen wordt daarom aangenomen, dat de doorlaatbaarheid van de membraan in rust voor calcium-ionen gering is. Deze opvatting wordt gesteund door de waarneming, dat wijziging van $[Ca^{++}]_e$ in myocard-vezels geen of slechts geringe verandering van de membraanpotentiaal in rust tot gevolg heeft (Weidmann, 1955 b; Hoffman en Suckling, 1956; Ware, 1961; Matsubara en

Matsuda, 1969). Ook van andere ionen is geen noemenswaardig effect op de membraanpotential van myocardvezels in rust beschreven.

Samenvattend kan dus worden vastgesteld dat in rust de membraanpotential voornamelijk bepaald wordt door de intracellulaire en de extracellulaire concentratie van de kalium-ionen, alsmede door het geleidingsvermogen van de celmembraan voor deze ionen.

2.5. DE AKTIEPOTENTIAL

2.5.1. De actiepotential in een zenuwvezel

Verlaging van de membraanpotential tot de zogenaamde drempelwaarde veroorzaakt een actiepotential. Volgens de ionentheorie van Hodgkin en Huxley (1952 a, b, c, d) ligt aan de actiepotential een verandering van het geleidingsvermogen van de membraan voor ionen ten grondslag. De dichtheid van de totale membraanstroom (I_m) wordt op elk moment tijdens de actiepotential gegeven door de som van de dichtheid van de netto ionenstroom (I_{ion}) en de capacitieve stroom (Hodgkin en Huxley, 1952 d):

$$(4) \quad I_m = C_m \frac{dV}{dt} + I_{ion}$$

I_m en I_{ion} worden weergegeven in $\mu A/cm^2$. C_m is de membraan-capaciteit ($\mu F/cm^2$). V is de afwijking van de membraanpotential ten opzichte van de rustwaarde. V wordt uitgedrukt in millivolt, de tijd t in msec.

Beneden de drempelwaarde is I_m uitsluitend capacitief, aangezien de netto ionenstroom nul is. Depolarisatie tot de drempelwaarde veroorzaakt toename van g_{Na} . De grotere natrium-influx die hiervan het gevolg is, overtreft de kalium-efflux: er ontstaat een netto binnenwaarts gerichte stroom. Dit leidt tot verdere afname van de membraanpotential. Hierdoor neemt g_{Na} verder toe, etc. De zeer snel toenemende depolarisatie vormt de depolarisatie-fase van de actiepotential. De

initiële toename van g_{Na} ten gevolge van de depolarisatie wordt spoedig gevolgd door een afname (Hodgkin en Huxley, 1952 c). Deze afname van g_{Na} tot de waarde van voor de depolarisatie zou op zich voldoende zijn om de membraanpotentiaal weer te laten terugkeren naar de rustwaarde. Bij een zenuwvezel wordt echter ook de kalium-efflux groter als gevolg van een relatief traag op gang gekomen toename van g_K (delayed rectification). De repolarisatie-fase van de actiepotentiaal van een zenuwvezel is dus het gecombineerde effect van een afname van g_{Na} en een toename van g_K .

2.5.2. De actiepotentiaal in hartspleier

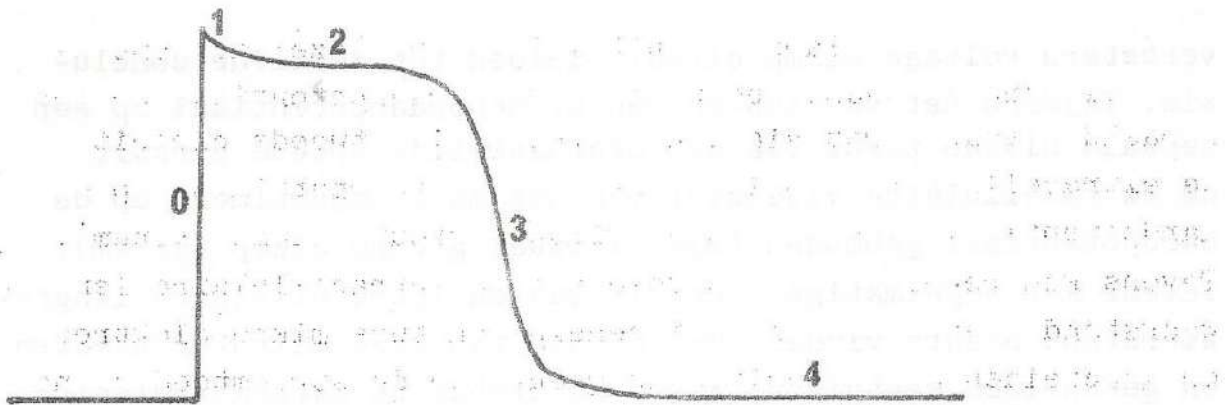
Ook in hartspleier wordt de actiepotentiaal veroorzaakt door reversibele veranderingen in het geleidingsvermogen van de celmembraan. De informatie hiervan is evenals in zenuwweefsel voornamelijk verkregen door de voltage-clamp techniek. Om uit de vorm en de grootte van de ionenstroom juiste conclusies te trekken over de aard van de veranderingen in het geleidingsvermogen, moet het gebruikte preparaat uniform worden gepolariseerd. Er loopt dan geen stroom tussen de verschillende membraandelen. In het reuzenaxon, waarmee Hodgkin en Huxley hun experimenten uitvoerden, was aan deze voorwaarde relatief eenvoudig te voldoen door in de lengterichting in het axoplasma een metalen elektrode op te schuiven (zie voor uitvoerige beschrijving Hodgkin et al., 1952 en Cole, 1968). In hartspleier is een dergelijke ingreep door de veel kleinere celdiameter en de complexe geometrie niet uitvoerbaar. Om de problemen van een puntvormige, dus niet-uniforme polarisatie te omzeilen, wordt voor stroomtoediening aan hartspleierpreparaten vaak gebruik gemaakt van de "sucrose-gap" methode (zie voor beschrijving b.v. Beeler en Reuter, 1970 a of De Hemptinne, 1971). Ook bij deze methode kan echter een spanningsgradiënt over het preparaat bestaan, zoals ondermeer blijkt uit een bespreking van deze methodiek door Johnson en Liebermann (1971). Experimenten van New en Trautwein (1972 a) met een

verbeterd voltage clamp circuit leiden tot dezelfde conclusie. Tijdens het vasthouden van de membraanpotentiaal op een bepaald niveau wordt via een onafhankelijk tweede circuit de extracellulaire vloeistof van het meetcompartiment op de aardpotentiaal gehouden (zgn. virtual ground clamp system). Tevens kan regelmatige controle van de intracellulaire lengte-weerstand plaats vinden. Met behulp van twee mikro-elektroden en gescheiden meetcircuits was gedurende de stroomtoediening een verschil in membraanpotentiaal meetbaar tussen cellen die zich dicht bij de rubber membraan van de sucrose gap bevonden en cellen aan het einde van het preparaat (afstand mikro-elektroden ca. 0,5 mm). Werd echter het preparaat zo kort mogelijk gemaakt (0,25 mm), dan was bij voldoende grote diameter de spanningsverdeling wel homogeen. Metingen onder deze omstandigheden toonden aan, dat de meeste gegevens uit vroegere voltage clamp experimenten althans kwalitatief han-teerbaar blijven.

De aktiepotentiaal in hartspier heeft een verloop (fig. 1), dat wat afwijkt van die in zenuwweefsel. In ons onderzoek zijn voornamelijk fase 0 en fase 4 van belang. Deze laatste is reeds uitvoerig besproken. De nu volgende bespreking van de aktiepotentiaal in hartspier zal zich dan ook hoofdzakelijk richten op de gebeurtenissen in fase 0.

2.5.3. Depolariserende stromen van positieve ionen

In myocardvezels bestaan gedurende de aktiepotentiaal twee binnenwaarts gerichte, dus depolariserende stromen van kationen, een snelle en een langzame instroom. De snelle instroom, die oorzaak is van de snelle potentiaalverandering gedurende fase 0, is vergelijkbaar met de natrium-influx in de zenuwvezel. De snelste verandering van de membraanpotentiaal tijdens fase 0, dV/dt max, is een maat voor de ionenstroom gedurende deze fase. Is het preparaat namelijk opgebouwd uit cellen die in de lengterichting zijn georiënteerd zoals het geval is in de trabekels van het hart, dan kan de



Figuur 1. Schematische weergave van een actiepotentiaal van een myocardvezel.

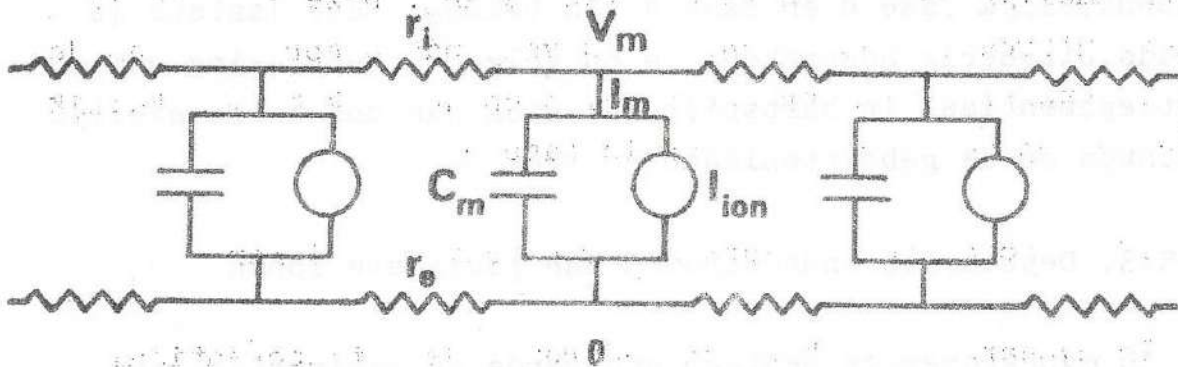
Fase 0: snelle depolarisatie

1: initiele snelle repolarisatie

2: plateau-fase

3: snelle repolarisatie

4: diastole



Figuur 2. Schema van een eendimensionele kabel (naar Cole, 1968)

I_m : totale membraanstroom

I_{ion} : ionenstroom

C_m : membraancapaciteit

r_i en r_e : lengte-weerstand van resp. intracellulaire en extracellulaire vloeistof

V_m : potentiaalverschil over de membraan

celmembraan evenals bij het axon worden opgevat als een één-dimensionele kabel. Dit is schematisch in fig. 2 weergegeven. Voor de theorie van de één-dimensionele kabel verwijzen wij naar de uitvoerige monografie van Cole (1968). Met behulp van deze theorie kan worden berekend, dat bij een konstante voortgeleidingssnelheid van de actiepotentiaal de membraanstroom I_m evenredig is met de tweede afgeleide van de potentiaal naar de tijd. Wanneer dV/dt maximaal is, dan geldt volgens vergelijking (4):

$$(5) \quad \frac{dV}{dt} = - \frac{I_{ion}}{C_m} \quad \text{In detail, zie Appendix}$$

Wanneer, zoals algemeen wordt aangenomen, C_m niet verandert, dan is de snelste verandering van de membraanpotentiaal een maat voor de ionenstroom. Voor de zenuwvezel is dV/dt max gedurende fase 0 dus een maat voor de natrium-influx. De waarneming van Hodgkin en Katz (1949) in het axon, dat dV/dt max in sterke mate afhankelijk is van de extracellulaire natrium concentratie, is hiermee in overeenstemming.

In hartspreparaten van alle onderzochte diersoorten treedt eveneens bij afname van $[Na^+]_e$ een daling van dV/dt max op (zie b.v. voor kikkeratrium: Niedergerke en Orkand, 1966 b; voor kikkerventrikel: Brady en Woodbury, 1960; voor konijne-atrium: Hoffman en Cranefield, 1960 en Saito, 1971; voor hondenventrikel: Matsubara en Matsuda, 1969). De initiële binnenwaarts gerichte stroom, die in voltage clamp experimenten bij een voldoende grote potentiaalsprong wordt waargenomen, is eveneens in sterke mate afhankelijk van $[Na^+]_e$ (Dudel et al., 1966; Mascher en Peper, 1969). Ook het effect op hartspreparaten van tetrodotoxine, een stof die specifiek de snelle instroom van natrium-ionen (Kao, 1966; Moore en Narahashi, 1967) of natrium-substituten (Tasaka et al., 1966) remt, is gelijk aan het effect op zenuwweefsel. Tetrodotoxine veroorzaakt zonder uitzondering in myocardvezels een afname van dV/dt max (Yamagishi en Sano, 1966; Rougier et al., 1969; Lenfant et al., 1968; Walden et al., 1969; Scholz, 1969; Yanaga en Holland, 1970). De

relatie in hartspier tussen dV/dt max en de hoogte van de membraanpotentiaal waarbij de aktiepotentiaal is opgewekt, vertoont eveneens opvallende gelijkenis met die in het axon. Op blz. 28 wordt nog uitvoerig op deze relatie teruggekomen. Al deze gegevens maken het zeer waarschijnlijk, dat ook in hartspier de snelle inwaarts gerichte stroom gedurende fase 0 wordt gedragen door natrium-ionen. Deze snelle natrium-influx zou dan evenals in zenuwweefsel het gevolg zijn van een snelle toename van g_{Na} van de celmembraan.

Theoretisch zou de snelle depolarisatie ook veroorzaakt kunnen worden door een calcium-influx. Verandering van $|Ca^{++}|_e$ heeft echter slechts geringe invloed op de hoogte van dV/dt max (kikkerventrikel: Ware, 1961; papillairspier cavia: Stanley en Reiter, 1965; atrium en ventrikel van hond en konijn: Benítez en Alanís, 1970; ventrikel van cavia, kat en aap: Tritthart et al., 1972).

Wanneer aan myocardvezels een potentiaalniveau wordt opgedrongen lager dan ongeveer -30 mV, dan is na de snelle natrium-influx nog een tweede, betrekkelijk langzame binnenwaarts gerichte stroom meetbaar. Johnson en Liebermann (1971) zijn van mening dat deze stroom een artefact is als gevolg van de niet-homogene potentiaalverdeling in het preparaat. Onder omstandigheden waarin wel van homogeniteit sprake is, blijft de langzame instroom echter aantoonbaar (New en Trautwein, 1972 a). Experimenten waarbij veranderingen in de extracellulaire vloeistof worden aangebracht, hebben waarschijnlijk gemaakt, dat deze stroom gedragen wordt door natrium- en/of calcium-ionen (Niedergerke en Orkand, 1966 a; Rougier et al., 1968; Ochi, 1970; Beeler en Reuter, 1970 b; New en Trautwein, 1972 b). Tijdens de aktiepotentiaal vindt deze langzame instroom plaats gedurende het laatste deel van de depolarisatie-fase en gedurende fase 1 en 2.

2.6. DE AARD VAN DE VERANDERINGEN VAN HET GELEIDINGSVERMOGEN

Er is veel getheoretiseerd, doch weinig bekend over hetgeen ten grondslag ligt aan het geleidingsvermogen van de celmembraan voor een ion en aan de veranderingen ervan. De beschikbare gegevens hebben hoofdzakelijk geleid tot twee theorieën:

- a. De membraan bevat kleine, met water gevulde poriën (Solomon, 1960 en 1968). De selektieve doorgankelijkheid voor ionen zou worden veroorzaakt door verschillen in poriën-grootte en poriën-lading. Naar gelang de omstandigheden zouden de poriën open of dicht kunnen zijn.
- b. In de membraan bevindt zich een dragermolekuul, een zgn. carrier, dat een sterke bindingsneiging heeft met een bepaald ion (Hodgkin en Huxley, 1952 d; Weidmann, 1955 a). Na binding van een ion aan het buitenoppervlak diffundeert de carrier naar het binnenoppervlak, waar het ion loslaat van de carrier en de intracellulaire vloeistof binnengaat ("facilitated diffusion").

Voor geen van beide theorieën is het bewijs geleverd. Wel is aangetoond, dat verandering van de membraanpotentiaal leidt tot veranderingen in de membraanstructuur. Recent onderzoek van Cohen (1973) aan axonen gedurende elektrische activiteit heeft aan het licht gebracht, dat de optische eigenschappen van de celmembraan zowel tijdens de actiepotentiaal als tijdens voltage clamp experimenten een spanningsafhankelijke verandering ondergaan. Er zijn echter geen bewijzen, dat deze optische veranderingen een weerspiegeling zijn van veranderingen in het geleidingsvermogen van de membraan.

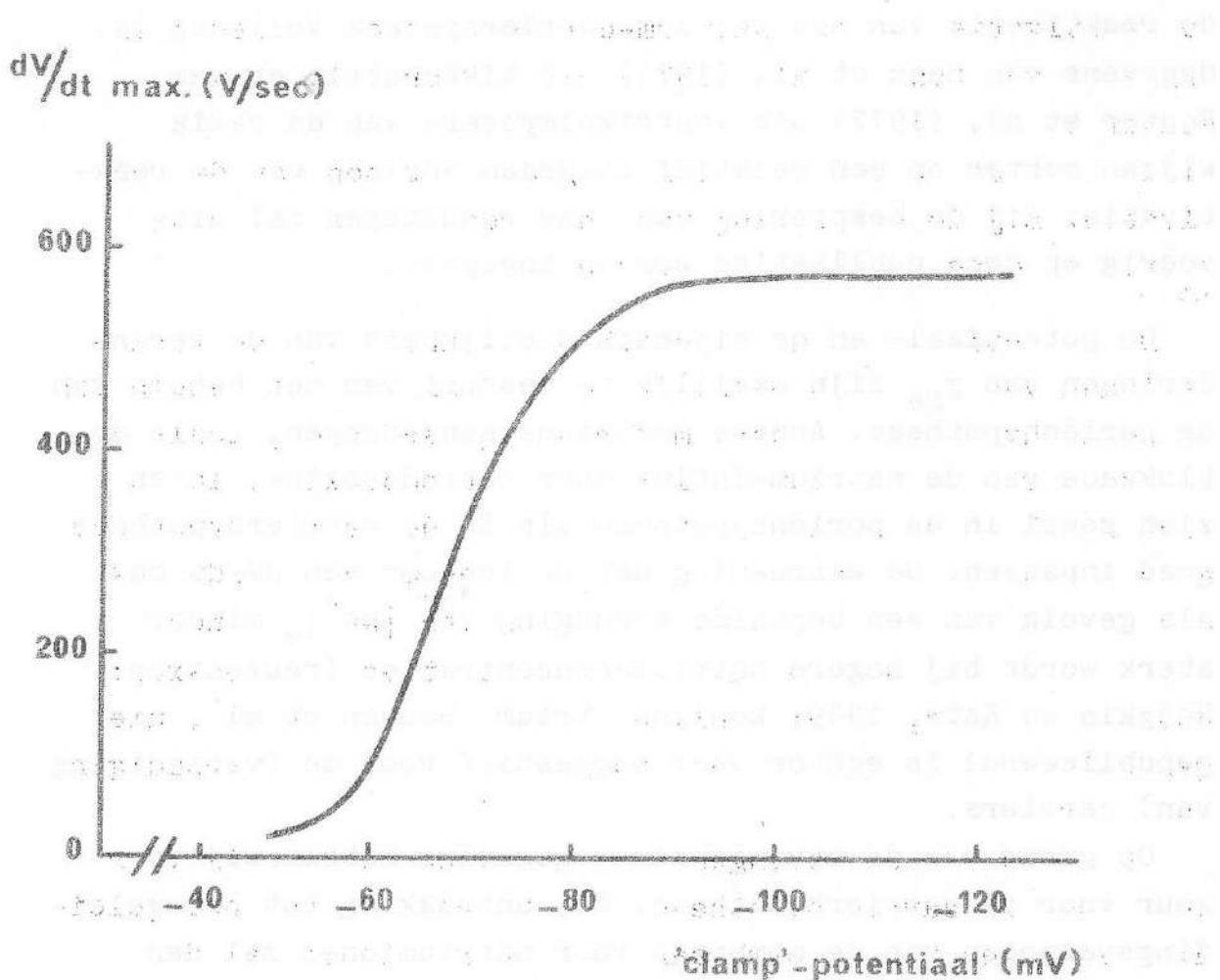
Een aantal membraaneigenschappen laten zich het best beschrijven door de carrierhypothese. De plotselinge toename van g_{Na} na supraliminale prikkeling wordt beschouwd als de "aktivatie" van in de membraan aanwezige natrium-carriers. De hierop volgende afname van g_{Na} wordt de "inaktivatie" van de carriers genoemd. Aktivatie en inaktivatie der natrium-carriers zijn potentiaal- en tijdsafhankelijke processen.

1. Potentiaal-afhankelijkheid der natrium-carriers

De natrium-influx tijdens de depolarisatie-fase van de actiepotentiaal is afhankelijk van het aantal geactiveerde carriers. Hodgkin en Huxley (1952 d) hebben in het reuzenaxon aangetoond, dat er een S-vormige relatie bestaat tussen de rustwaarde van de membraanpotentiaal en dV/dt max van de hierbij opgewekte actiepotentiaal. Het aantal natrium-carriers dat door supraliminale prikkeling geactiveerd wordt, is dus afhankelijk van de membraanpotentiaal. Weidmann (1955 a) toonde in Purkinje-vezels van het schaap aan, dat ook in dit preparaat de relatie tussen membraanpotentiaal en dV/dt max S-vormig was (fig. 3). Bij een membraanpotentiaal beneden -50 mV blijven alle carriers geïnactiveerd. Is de membraanpotentiaal groter dan -90 mV, dan vindt bij supraliminale prikkeling volledige aktivatie plaats.

2. Tijdsafhankelijkheid der natrium-carriers

Na de snelle toename van g_{Na} als antwoord op een depolariserende impuls volgt onmiddellijk een afname. Deze inaktivatie der natrium-carriers is bij zenuwvezels binnen 2 msec voltooid en vindt ook plaats, wanneer de membraanpotentiaal kunstmatig gedepolariseerd wordt gehouden (Hodgkin en Huxley, 1952 d). Inaktivatie betekent echter niet alleen een terugkeer van g_{Na} naar de waarde vóór de depolarisatie, maar tevens een vermindering van de mogelijkheid van de membraan om op een depolarisatie met een toename van g_{Na} te reageren. Na korte tijd neemt de inaktivatie weer af: reaktivatie (Hodgkin en Huxley, 1952 c). De tijdkonstante van de reaktivatie is in het reuzenaxon bij benadering dezelfde als van de aktivatie en de inaktivatie. Gegevens over het tijdsverloop van de reaktivatie in hartspier zijn niet eensluidend. Weidmann (1955 a) en Strauss en Bigger (1972) concluderen uit hun experimentele gegevens, dat de tijdkonstante van de reaktivatie in respectievelijk Purkinje-vezels van het schaap en spiervezels van het konijne-atrium zo klein is, dat aan het einde van de repolarisatie-fase van de actiepotentiaal



Figuur 3. De aktiveringskurve van Purkinje-vezels van het schapehart (naar Weidmann, 1955 a).

Zie verder tekst.

de reaktivatie van het natrium-carriersysteem volledig is. Gegevens van Haas et al. (1971) uit kikkeratria en van Reuter et al. (1972) uit ventrikelmuscard van de cavia wijzen echter op een relatief langzaam verloop van de reaktivatie. Bij de bespreking van onze resultaten zal uitvoerig op deze publikaties worden ingegaan.

De potentiaal- en de tijdsafhankelijkheid van de veranderingen van g_{Na} zijn moeilijk te beschrijven met behulp van de poriënhypothese. Andere membraaneigenschappen, zoals de blokkade van de natrium-influx door tetrodotoxine, laten zich zowel in de poriënhypothese als in de carrierhypothese goed inpassen. De waarneming dat de toename van dV/dt max als gevolg van een bepaalde verhoging van $|Na^+|_e$ minder sterk wordt bij hogere natrium-concentraties (reuzenaxon: Hodgkin en Katz, 1949; konijne-atrium: Bouman et al., niet gepubliceerd) is echter weer suggestief voor de (verzadiging van) carriers.

Op grond van de bovengenoemde gegevens hebben wij voorkeur voor de carrierhypothese. Met betrekking tot het geleidingsvermogen van de membraan voor natriumionen zal dan ook verder in termen van carriers worden gesproken.

2.7. HET AKTIEVE NATRIUM-/KALIUM TRANSPORT

De voortdurende kalium-efflux en natrium-influx, die in rust door de celmembraan plaats vinden, zijn betrekkelijk gering. Hodgkin en Horowicz (1959) berekenden voor skeletspiervezels een natrium-influx in rust van $3,5 \text{ picomol/cm}^2 \cdot \text{sec}$. Conn en Wood (1959) bepaalden in het in situ geperfundeerde hondenhart een natrium-influx van $4 \text{ picomol/cm}^2 \cdot \text{sec}$, terwijl Langer (1967) voor de geïsoleerde papillairspier van de hond $5,9 \text{ picomol/cm}^2 \cdot \text{sec}$ berekende. Metingen van Carlslake en Weatherall (1962) in het konijne-atrium leidden tot een schatting van de natrium-influx van $8 \text{ picomol/cm}^2 \cdot \text{sec}$. De toename van de natrium-influx gedurende de actiepotentiaal

is door Noble (1962) voor Purkinje-vezels berekend op 77 picomol/cm².sec. Volgens Langer (1967) bedraagt de natrium-influx in papillairspier van de hond per actie-potentiaal 71 picomol/cm².sec. Bij al deze berekeningen is uitgegaan van een vezel, die bij benadering cilindrisch is met een regelmatig oppervlak. Het oppervlak van een myocardvezel wordt echter vergroot door talrijke invaginaties van het T-systeem (Simpson en Oertelis, 1962; Nelson en Benson, 1963; Sommer en Johnson, 1970), zodat de opgegeven waarden van de natrium-influx zonder twijfel te groot zijn per eenheid van oppervlak. Bovendien kan bij fluxmetingen een mogelijke foutenbron worden gevormd door de zogenaamde exchange diffusion. De essentie van dit mechanisme, dat voor het eerst gepostuleerd is door Ussing (1949), is dat er door middel van een carrier een 1:1 uitwisseling plaats vindt tussen de intracellulaire en de extracellulaire natrium-ionen. Aangezien door exchange diffusion geen verandering van de natrium concentraties geschiedt, maar wel verplaatsing van natrium-isotopen door de celmembraan, kunnen de influx en de efflux van de tracer groter zijn dan de netto natrium-influx of -efflux. Keynes en Swan (1959) schatten, dat in kikkerskeletspier 50% van de natrium-efflux geschiedt via exchange diffusion. Van andere weefsels zijn geen gegevens bekend. Een mogelijke exchange diffusion maakt dus de tracermethoden niet volledig betrouwbaar.

In ieder geval is het duidelijk, dat er een mechanisme moet bestaan om natrium- en kalium-ionen tegen hun elektrochemische gradiënt in te verplaatsen, aangezien anders de verschillen tussen intracellulaire en extracellulaire concentraties geleidelijk zouden worden opgeheven. Experimenten van Hodgkin en Keynes (1955) met radio-actief gemerkt natrium en kalium hebben aangetoond, dat zenuwvezels kalium-ionen kunnen opnemen en natrium-ionen naar buiten kunnen pompen. Toevoeging van stofwisselingsremmers als cyanide, azide en 2,4-dinitrofenol had een afname van de natrium-efflux tot

gevolg. Verlaging van $|K^+|_e$ leidde eveneens tot afname van de natrium-efflux. Korte tijd later toonden zij (Hodgkin en Keynes, 1956) door veranderingen van de intracellulaire vloeistof via injecties door een mikro-pipet aan, dat de natrium-efflux evenredig was met $|Na^+|_i$. De gemiddelde efflux van natrium-ionen per intracellulaire mmol/l bedroeg $0,76 \text{ picomol/cm}^2 \cdot \text{sec}$. Het bestaan van een actieve Na/K-pomp met dezelfde eigenschappen is sindsdien in verschillende weefsels aangetoond (Keynes en Swan, 1959 a; Whittam en Wheeler, 1961; Glynn, 1962). Onderzoek aan zenuwvezels (Caldwell et al., 1960 a en b) en erythrocytmembraan (Hoffman, 1962; Post et al., 1960) heeft aangetoond dat adenosine-trifosfaat (ATP) als energiebron fungeert.

Er zijn verschillende theorieën opgesteld over de manier, waarop zich het actieve natrium- en kalium-transport voltrekt. Hiervan is het carriermodeel van Skou het meest gangbaar geworden. Uit de celmembraan van de zenuwvezel van de krab is door Skou een enzym geïsoleerd dat in staat is ATP te splitsen, een zogenaamd ATP-ase (voor overzicht, zie Skou, 1965). De aktiviteit van dit enzym is afhankelijk van de concentratie natrium- en kalium-ionen: Na/K-ATP-ase. Magnesium-ionen zijn nodig als aktivator. Het model van Skou heeft in tegenstelling tot andere modellen het voordeel, dat het berust op de werking van het Na/K-ATP-ase, waarvan de aanwezigheid is aangetoond (b.v. in hartspeer: Bonting et al., 1961; Schwartz, 1962; Portius en Repke, 1963). Voor geen enkel model bestaan overigens experimentele aanwijzingen.

Een bepaalde groep farmaka, de hartglycosiden, is al enige eeuwen bekend om de stimulerende werking op de kontraktiekracht van het hart. Door Schatzmann (1953) is als eerste in erythrocyten aangetoond, dat het actieve natrium transport door deze farmaka wordt geremd. Sindsdien is deze eigenschap ook in andere weefsels zoals skeletspier, hartspeer, nieren en zenuwweefsel, gedemonstreerd. De remming geschiedt waar-

schijnlijk door competitie met kalium-ionen op een plaats aan het buitenoppervlak van de celmembraan (Page et al., 1964). Voor het bestuderen van de werking van de Na/K-pomp wordt veelvuldig van de hartglycosiden gebruik gemaakt.

Het is mogelijk, dat nog een tweede enzysysteem betrokken is bij het actieve natrium transport. In erythrocyten neemt namelijk de natrium-efflux na maximale remming door ouabaine (experimenteel het meest gebruikte hartglycoside) verder af bij toevoeging van ethacryne-zuur. Hoffman en Kregnow (1966) concluderen uit hun experimenten, dat er twee mechanismen voor het actieve natrium transport aanwezig zijn: Pomp I met de reeds beschreven afhankelijkheid van $|K^+|_e$ en $|Na^+|_i$ wordt geremd door ouabaine; pomp II is ongevoelig voor ouabaine, wordt geremd door ethacryne-zuur en blijkt afhankelijk te zijn van $|Na^+|_e$. Keynes en Steinhardt (1968) en Bosteels en Carmeliet (1972) hebben in respectievelijk kikkerskeletspier en Purkinje-vezels van het runderhart aangetoond, dat ook in deze weefsels de actieve natrium-efflux kan worden onderverdeeld in twee componenten. Deze componenten hebben dezelfde eigenschappen als pomp I en II van Hoffman en Kregnow (1966).

Op basis van het aantal glycoside-molekulen, dat nodig was om 50% van het actieve Na/K-transport te remmen, schatte Glynn (1957) het aantal transportplaatsen in menselijke erythrocyten op 1000 tot 3000 per cel. Tosteson (1966) berekende voor schapenerythrocyten 5000 transportplaatsen per cel. Hiervoor werd aangenomen dat de transporttijd van een kalium-ion door de membraan of de voor hydrolyse van een ATP-molekuul benodigde tijd 1 seconde was. Tosteson meende echter dat deze tijd onwaarschijnlijk lang was, zodat het werkelijke aantal transportplaatsen per cel minder zou zijn. Dat slechts een klein gedeelte van de celmembraan bij het actieve Na/K transport is betrokken, werd bevestigd door met behulp van een bepaalde centrifugeertechniek de actieve plaatsen van de celmembraan te isoleren. De fraktie waarin

zich al het membraan-ATP-ase bevond, bevatte slechts 6,5% van de totale membraanstikstof (Tosteson, 1966).

2.8. DE ELEKTROGENE WERKING VAN HET AKTIEVE NATRIUM-TRANSPORT

In 1955 ontdekten Hodgkin en Keynes dat de natrium-efflux van het reuzenaxon afnam tot een-derde van de voorafgaande waarde, wanneer kalium uit het omgevende zeewater werd verwijderd. Zij opperden de mogelijkheid, dat de natrium-efflux die niet aan de kalium-influx was gekoppeld, een potentiaalverschil zou opwekken. Zij berekenden, dat de betrokken natrium-efflux een stroom leverde van $1,8 \mu\text{A}$, zodat de bijdrage aan de membraanpotentiaal slechts $1,8 \text{ mV}$ zou zijn bij een membraanweerstand in rust van 1000 ohm cm^2 (Cole en Hodgkin, 1939). De waarneming dat stopzetten van de Na/K-pomp door 2,4-dinitrofenol geen aantoonbare verandering van de membraanpotentiaal op korte termijn veroorzaakte, sloot volgens Hodgkin en Keynes (1955) een elektrogeen effect van de pomp dan ook niet uit. De geringe toename van de membraanpotentiaal (1 tot $4,5 \text{ mV}$) na een intracellulaire injectie met een geconcentreerde NaCl-oplossing (1 mol/l) kon daarentegen goed worden verklaard uit de elektrogeene werking van de pomp, die was gestimuleerd door de toename van $|\text{Na}^+|_i$ (Hodgkin en Keynes, 1956).

Sindsdien zijn in vele weefsels aanwijzingen gevonden, dat de Na/K-pomp een elektrogeene werking heeft. Bij de experimenten met hartspeer wordt het preparaat dan in het algemeen eerst geïncubeerd in een badvloeistof met een lage temperatuur. De lage aktiviteit van de Na/K-pomp leidt dan tot verhoging van $|\text{Na}^+|_i$ en afname van $|\text{K}^+|_i$ (Délèze, 1960; Page en Storm, 1965; Niedergerke en Orkand, 1966 b). Verwarming van het preparaat gaat gepaard met sterke stimulatie van de Na/K-pomp, enerzijds door de temperatuurverandering zelf, anderzijds door de hoge $|\text{Na}^+|_i$. Het gedrag van de membraanpotentiaal bij verwarming leidt dan tot conclusies

over de elektrogene werking van de Na/K-pomp.

Page en Storm (1965) vonden, dat bij verlaging van de temperatuur van 28°C tot 4°C de membraanpotentiaal van papillairspiervezels van de kat binnen enkele uren daalde van $-61,3\text{ mV}$ tot $-25,6\text{ mV}$. Zij beschouwden deze depolarisatie als het gevolg van de verandering van V_K en V_{Na} . Plotselinge verwarming tot 28°C deed de membraanpotentiaal binnen 9 minuten terugkeren op de uitgangswaarde. De intracellulaire concentraties waren echter pas na ongeveer 60 minuten hersteld. Wanneer de Na/K-pomp was geremd door toevoeging van ouabaine (10^{-7} mol/l), dan trad geen herstel van de membraanpotentiaal op. Page en Storm (1965) concludeerden hieruit, dat de Na/K-pomp een elektrogene werking had.

Tamai en Kagiya (1968) zagen een zeer grote toename van de membraanpotentiaal van zowel atrium- als ventrikelvezels van de kat, wanneer na een urenlange periode bij 4°C het preparaat weer werd verwarmd. De membraanpotentiaal bereikte ongeveer 3 uur na het begin van de verwarming een maximum, om vervolgens weer langzaam te dalen. Omdat de gevonden waarden te hoog waren om verklaard te kunnen worden door V_K , meenden de auteurs dat de hyperpolarisatie het gevolg was van de aktiviteit van een elektrogeen werkende Na/K-pomp. Zij baseerden deze veronderstelling op de waarneming, dat vervanging van het extracellulaire NaCl door LiCl tijdens het optreden van de hyperpolarisatie onmiddellijk tot een afname van de membraanpotentiaal leidde. Lithium kan namelijk de rol van de natrium-ionen overnemen tijdens de passieve influx, doch wordt niet meer actief naar buiten gepompt. De dalende $[\text{Na}^+]_i$ leidt dan tot vermindering van de aktiviteit van de Na/K-pomp (Keynes en Swan, 1959 a en b). Toevoeging van ouabaine ($10^{-6} - 10^{-5}\text{ mol/l}$) gedurende de hyperpolarisatie had eenzelfde effect als het vervangen van NaCl door LiCl. De maximale hyperpolarisatie was hoger bij toename van $[\text{K}^+]_e$, wat in overeenstemming was met de invloed van $[\text{K}^+]_e$ op de pompaktiviteit. Naarmate het preparaat langer

bij 4°C wordt gehouden, zal $[\text{Na}^+]_i$ hoger zijn. De verwachting dat op grond hiervan de mate van hyperpolarisatie afhankelijk was van de duur van de incubatieperiode bij 4°C, werd bevestigd.

Glitsch (1972) veranderde $[\text{Na}^+]_i$ van het cavia-hartoor door het preparaat gedurende 4 uur bij 4-6°C in een kalium-arme badvloeistof met verschillende concentraties NaCl te brengen. Hierna werd verwarmd tot 35°C. De extracellulaire ruimte, gemeten met inuline, bleek bij de lage temperatuur ongeveer 15% te zijn afgenomen. $[\text{K}^+]_i$ werd lager tijdens de hypothermie en nam toe gedurende de verwarming. $[\text{Na}^+]_i$ nam tijdens de hypothermie toe, wanneer de badvloeistof NaCl bevatte, doch nam af in NaCl-vrije of Na-vrije omgeving. Bij het verwarmen vond een netto natrium-efflux plaats uit de vezels, waarvan $[\text{Na}^+]_i$ was toegenomen, terwijl een netto natrium-influx plaats vond in atria met een lage $[\text{Na}^+]_i$. De toename van de membraanpotentialaal tijdens verwarmen vertoonde slechts een overshoot in de vezels met een hoge $[\text{Na}^+]_i$. Duur en amplitudo van de overshoot waren afhankelijk van $[\text{Na}^+]_i$. Een invloed van chloor-ionen kon worden verworpen. Wanneer namelijk 50% NaCl van de badvloeistof was vervangen door cholinechloride, dan was het gedrag van de membraanpotentialaal bij verwarmen gelijk aan dat, wat werd gezien wanneer dezelfde hoeveelheid NaCl was vervangen door sucrose. Glitsch (1972) concludeerde uit zijn experimenten, dat de membraanpotentialaal van het cavia-hartoor na hypothermie wordt beïnvloed door een actieve, elektrogene natrium-pomp, die wordt geactiveerd door intracellulaire natrium-ionen.

Ehara (1972) liet strips van de kikkerventrikel bij 1-3°C gedurende 20 tot 50 uur incuberen in een oplossing met een zeer lage kalium-concentratie. De strips werden vervolgens geplaatst in oplossingen van 18-20°C, waarvan de kalium-concentratie verschillend was. Het herstel van de membraanpotentialaal ging gepaard met een ouabaine-gevoelige overshoot, waarvan de amplitudo en de duur afhankelijk waren van $[\text{K}^+]_e$.

Hiraoka en Hecht (1973) vonden, dat ook in Purkinje-vezels van het schaap bij verwarmen, na een 24 uur durende periode bij 4°C in kalium-arm milieu, het herstel van de membraanpotentiaal geschiedde met een overshoot. Na toevoeging van ouabaine was de overshoot niet aantoonbaar, evenmin als bij verwarming in kalium-arm milieu. Vervangen van NaCl in de badvloeistof door LiCl deed ook de overshoot verdwijnen. Wanneer het preparaat slechts 15 minuten aan de lage temperatuur was blootgesteld, dan geschiedde het herstel van de membraanpotentiaal bij verwarming eveneens zonder overshoot. Evenals Ehara (1972) verklaren Hiraoka en Hecht (1973) hun waarnemingen door een elektrogeen werkende Na/K-pomp aan te nemen.

Via een ander type experimenten concludeerde ook Vasalle (1970), dat de Na/K-pomp een elektrogene werking had. Hij stimuleerde het actieve transport door aan zijn preparaat, Purkinje-vezels van schaap en hond, een betrekkelijk hoge frekwentie op te dringen ("overdrive"). Hierna werd plotse-ling weer op de spontane frekwentie overgegaan. Tijdens de overdrive trad na een initiële depolarisatie een toename van de maximale diastolische potentiaal op. In aanwezigheid van 2,4-dinitrofenol of LiCl in plaats van NaCl bleef deze hyperpolarisatie achterwege. Na het stopzetten van de prikkeling bestond er een tijdelijke onderdrukking van de spontane aktiviteit ("overdrive suppression"), een effect dat in kalium-rijk milieu was verminderd. De membraanweerstand bleek na de periode van overdrive niet veranderd. Vasalle veronderstelde, dat de hyperpolarisatie tijdens de overdrive het gevolg was van een elektrogene pompwerking, terwijl ook voor de overdrive suppression voornamelijk de aktivatie van de elektrogene pomp verantwoordelijk werd gesteld.

Uit konijne-atria zijn geen gegevens bekend over het al of niet elektrogeen zijn van het actieve natrium transport. Op grond van het bovenstaande lijkt het echter waarschijnlijk, dat in zoogdierenhartspier, dus ook van het konijn,

HOOFDSTUK 3

METHODE

3.1. KEUZE VAN HET PREPARAAT

De experimenten die in dit proefschrift worden beschreven, zijn voortgekomen uit het onderzoek dat Viersma in ons laboratorium heeft verricht. Om een goede vergelijking van de resultaten mogelijke te maken, is hetzelfde proefdier gebruikt, namelijk het konijn. Viersma deed zijn metingen aan de crista terminalis van het geïsoleerde rechter atrium. Dit preparaat is spontaan actief door de aanwezigheid van de sino-auriculaire knoop. Volledige verwijdering van de sino-auriculaire knoop gelukt zelden. Hierdoor is het meestal niet mogelijk om bij de gebruikte temperatuur van $37,5^{\circ}\text{C}$ het preparaat te drijven met frequenties lager dan 3 Hz. In het verloop van ons onderzoek ontstond de behoefte om membraanpotentiaal en dV/dt_{max} ook bij zeer lage frequenties te meten. Na aanvankelijk experimenteren in de crista terminalis is daarom overgestapt op het geïsoleerde linker atrium, dat in het algemeen niet spontaan actief is. Het linker hartoor bezit evenals het rechter hartoor aan de endocardiale zijde een trabekelstructuur. Onder een operatiemikroskoop wordt de mikro-elektrode altijd geïmpaleerd in de trabekel waarop ook de prikkelelektrode is geplaatst.

Voor zover wij hebben kunnen nagaan, bestaan tussen myocardvezels uit rechter en linker atrium geen elektrofysiologische verschillen.

3.2. VERVAARDIGING VAN HET PREPARAAT

Voor de vervaardiging van het geïsoleerde rechter atriumpreparaat wordt verwezen naar het proefschrift van Viersma

(1969). Om het linker atriumpreparaat te verkrijgen worden, nadat het hart uit de thorax is verwijderd, beide atria tezamen van de ventrikels gescheiden door met een krom schaartje het ventrikelmio-card en het interventriculaire septum vlak onder de annulus fibrosus door te knippen. Hierna wordt het rechter atrium van het interatriële septum losgeknipt. Het nu geïsoleerde linker atrium wordt vanuit het ostium atrioventriculair ingeknipt naar de rand van het hartoor. Het linker atrium kan dan worden opengeklapt. Onder lichte spanning wordt het preparaat, met de endocardiale zijde boven, op een teflon ring in het orgaanbakje gefixeerd met kleine roestvrij-stalen nietjes. Het gladde interatriële septum en de trabekels van het hartoor zijn dan duidelijk zichtbaar.

3.3. DE DOORSTROMINGSVLOEISTOF

Evenals Viersma hebben wij de doorstromingsvloeistof gebruikt, die is beschreven door McEwen (1956). De samenstelling hiervan is als volgt:

NaCl	130,6 mmol/l
KCl	5,6
CaCl ₂	2,2
NaHCO ₃	24,2
NaH ₂ PO ₄	1,2
glucose	11,1
saccharose	13,2

Hoewel in het proefschrift van Viersma (1969) wordt beschreven, dat de intracellulaire magnesium-concentratie gedurende enige uren toereikend is voor de aktivatorfunctie van het ion op het actieve ionentransport, is toch als routine MgCl₂ aan de doorstromingsvloeistof toegevoegd tot een concentratie van 1,7 mmol/l. De doorstromingsvloeistof wordt na voorverwarmen tot 37°C verzadigd met carbogeen (95% O₂ en 5% CO₂). De pH bij deze temperatuur bedraagt 7,35 ± 0,05.

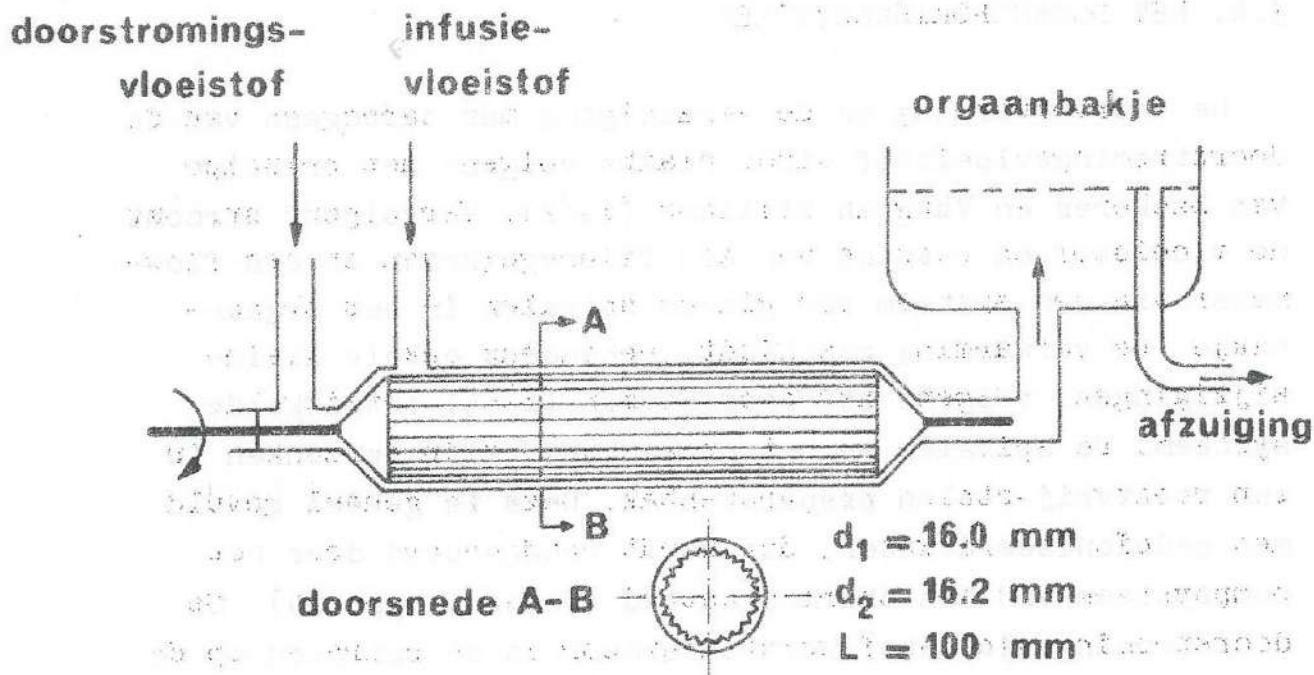
3.4. HET DOORSTROMINGSSYSTEEM

De voorverwarming en de verzadiging met carbogeen van de doorstromingsvloeistof vindt plaats volgens het principe van Szekeres en Vaughan Williams (1962). Vervolgens stroomt de vloeistof na passage van een fijnregelkraan en een flow-meter via een systeem van glazen spiralen in het orgaanbakje. De verwarming geschiedt, behoudens enkele kleine wijzigingen, volgens het door Bouman (1965) ontwikkelde systeem. De spiralen en het orgaanbakje zijn verzonken in een roestvrij-stalen preparatenbak. Deze is geheel gevuld met gedeïoniseerd water, dat wordt rondgevoerd door het pompsysteem van een thermostaatbad (Tamson, type T9). De doorstromingsvloeistof wordt hierdoor in de spiralen op de gewenste temperatuur gebracht ($37,5^{\circ}\text{C}$), alvorens het orgaanbakje te bereiken. De toevoerplaats bevindt zich in de bodem van het orgaanbakje. De afvoer van de vloeistof geschiedt aan het vloeistofoppervlak via een verticale afvoerbuis, die met een vacuumpompsysteem is verbonden (fig. 4). De inhoud van het orgaanbakje is 25 cc. Wij gebruiken een doorstromingssnelheid van 25 cc per minuut, zodat de inhoud van het orgaanbakje één maal per minuut geheel wordt verversst.

De temperatuur van de doorstromingsvloeistof in het orgaanbakje is zeer konstant: $37,5 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

3.5. HET VERANDEREN VAN DE SAMENSTELLING VAN DE DOORSTROMINGSVLOEISTOF

Zowel voor het toedienen van een extra hoeveelheid KCl teneinde de extracellulaire kalium concentratie te verhogen, als voor het toedienen van farmaka hebben wij gebruik gemaakt van het door Viersma (1969) beschreven infuussysteem. Via een regelbare infusiepomp wordt een geconcentreerde oplossing aan de doorstromingsvloeistof toegevoegd. In een mengkamer wordt met behulp van een draaiende glazen cilinder met overlangse groeven voor goede vermenging gezorgd,



Figuur 4. Het systeem waarmee de samenstelling van de vloeistof in het orgaanbakje kan worden gewijzigd.

De infusie-vloeistof kan met regelbare snelheid worden toegevoegd. Met behulp van een draaiende glazen cylinder worden de doorstromingsvloeistof en de infusie-vloeistof gemengd, voordat het orgaanbakje wordt bereikt.

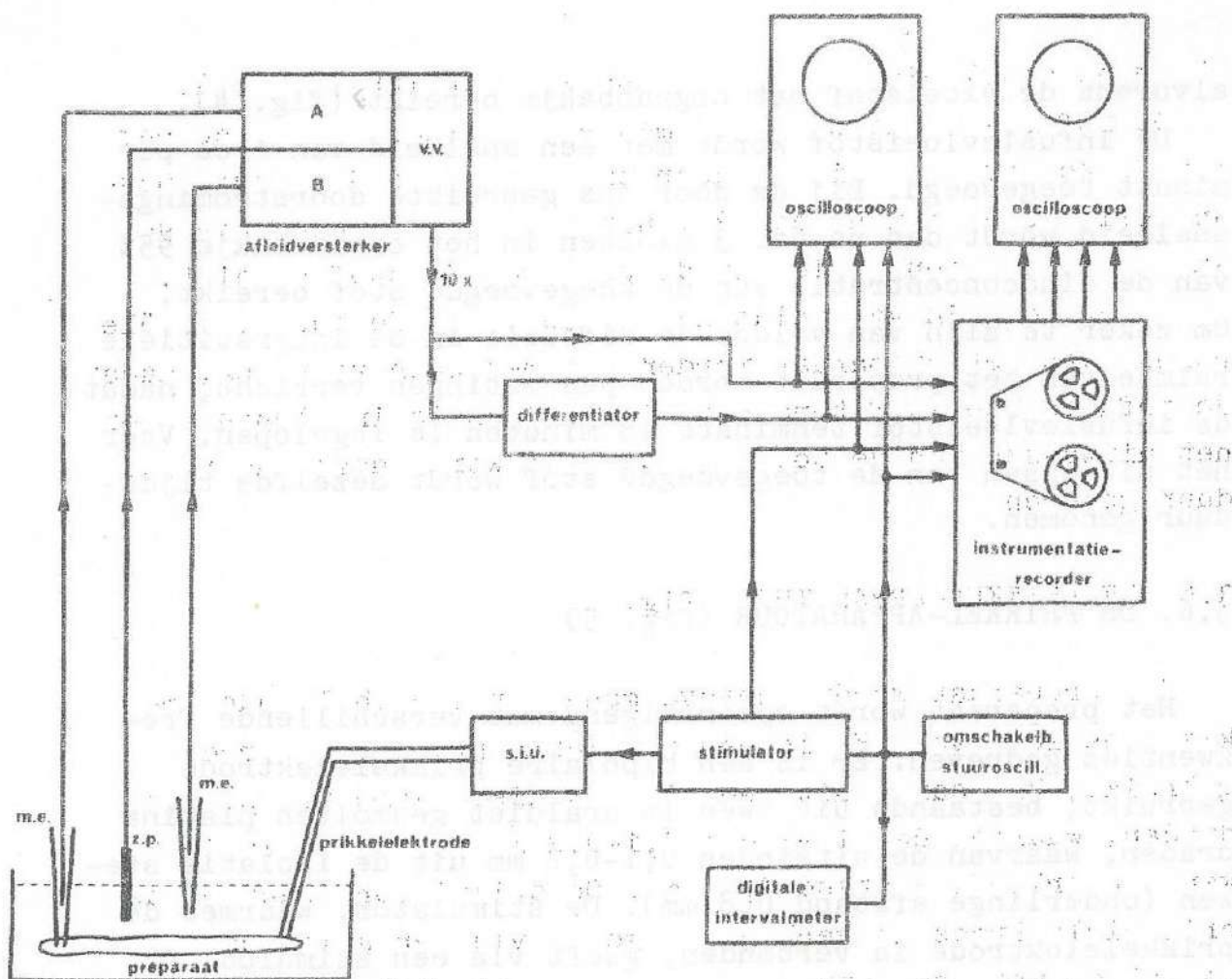
alvorens de vloeistof het orgaanbakje bereikt (fig. 4).

De infusievloeistof wordt met een snelheid van 1 cc per minuut toegevoegd. Bij de door ons gebruikte doorstromingssnelheid wordt dan na ca. 3 minuten in het orgaanbakje 95% van de eindconcentratie van de toegevoegde stof bereikt. Om zeker te zijn van voldoende diffusie in de interstitiële ruimte van het preparaat worden pas metingen verricht, nadat de infusievloeistof tenminste 15 minuten is ingelopen. Voor het uitwassen van de toegevoegde stof wordt dezelfde tijdsduur genomen.

3.6. DE PRIKKEL-APPARATUUR (fig. 5)

Het preparaat wordt opeenvolgend met verschillende frequenties gedreven. Er is een bipolaire prikkelelektrode gebruikt, bestaande uit twee in araldiet gesmolten platina draden, waarvan de uiteinden 0,1-0,2 mm uit de isolatie steken (onderlinge afstand 0,8 mm). De stimulator, waarmee de prikkelelektrode is verbonden, geeft via een stimulus isolation unit een stroompuls af. De stroomsterkte hiervan is binnen ruime grenzen onafhankelijk van de weerstand tussen de elektrodepunten. De duur en de sterkte van de prikkel zijn instelbaar. Er is steeds gewerkt met een prikkelduur van 0,5 msec. Na het bepalen van de prikkeldrempel (meestal 0,1-0,2 mA) wordt voor de prikkelsterkte een waarde van anderhalf maal de drempelwaarde ingesteld.

De stimulator wordt gestuurd door een omschakelbare stuuroscillator. Deze bevat twee onafhankelijke oscillatoren, waarmee frequenties instelbaar zijn tot 10 Hz. Wordt de stimulator door de ene oscillator met een bepaalde frequentie gestuurd, dan is de andere oscillator niet op de stimulator aangesloten. Deze kan dan worden ingesteld op de frequentie, waarop moet worden overgeschakeld. Wanneer van de ene frequentie op de andere wordt overgegaan, dan wordt het interval waarin de overschakeling plaats vindt, eerst afge maakt. Parallel aan de stimulator is een digitale interval-



Figuur 5. Schema van de apparatuur die is gebruikt voor de stimulatie van het preparaat en voor het afleiden en registreren van de gegevens.

s.i.u.: stimulus isolation unit

m.e.: mikroelektrode

z.p.: zilver-plaatje

v.v.: verschil-versterker

Zie verder tekst.

meter geschakeld ter controle van de ingeschakelde frekwentie.

In de stimulator kan een uitsteltijd (delay) worden ingeschakeld tussen de triggerpuls uit de stuuroscillator en de prikkel. Er is steeds met een uitsteltijd van 10 msec gewerkt. Dit heeft grote voordelen bij de meting van de membraanpotentiaal (zie blz. 48).

3.7. INTRACELLULAIRE POTENTIALMETING (fig. 5)

De membraanpotentiaal wordt gemeten met glazen mikro-elektroden (Ling en Gerard, 1949). De mikro-elektroden zijn vervaardigd met een gemodificeerde elektrodetrekker volgens Biersteker (1961). Na het vullen met een geleidende zoutoplossing (2,5 mol/l KCl en 2 mmol/l K-citraat) worden de elektroden geselecteerd op elektrische weerstand. De gebruikte mikro-elektroden hebben een weerstand tussen 15 en 40 megohm en een tippotentiaal kleiner dan 5 mV. Experimenteel is aangetoond, dat een elektrode met een weerstand groter dan 15 megohm een puntdiameter heeft kleiner dan 0,5 μ (Nastuk en Hodgkin, 1950). Hierdoor treedt bij impalatie geen noemenswaardige membraanbeschadiging op.

Wanneer als indifferente elektrode een gechloreerd zilverplaatje wordt gebruikt (voor uitvoerige beschrijving zie Viersma, 1969), dan treedt soms tijdens het experiment polarisatie van het oppervlak van deze elektrode op. Potentialverschillen die gemeten zijn over langere tijd, kunnen hierdoor onderling slecht vergelijkbaar zijn. Dit probleem is in onze experimenten grotendeels ondervangen door een tweekanaals afleidversterker te gebruiken. Beide kanalen zijn identiek. De ingangsweerstand is 10^{12} ohm. Hierdoor wordt een verwaarloosbare hoeveelheid stroom aan de cel onttrokken. De mogelijkheid om de tippotentiaal en de capaciteit van mikro-elektrode + verbindingkabel te compenseren, is per kanaal ingebouwd, evenals de mogelijkheid om de elektrode-weerstand te meten. Het ongewenste spanningsverloop van de uitgang van de kanalen van de afleidversterker is verwaar-

loosbaar, (minder dan 0,1 mV per uur). Het frekwentiebereik van de afleidversterkers is van 0 tot 13 kHz.

De mikro-elektrode van kanaal A wordt intracellulair gebracht, de mikro-elektrode van kanaal B wordt extracellulair gehouden. Beide kanalen meten het potentiaalverschil tussen mikro-elektrode en het gechlpreerde zilverplaatje. De signalen uit de kanalen A en B zijn aangesloten op een ingebouwde verschilversterker. Het uitgangssignaal hiervan geeft het potentiaalverschil weer tussen intracellulaire en extracellulaire ruimte weer, terwijl het nauwelijks wordt beïnvloed door eventuele veranderingen aan het zilverplaatje. Op deze manier kunnen onderling goed vergelijkbare waarden van de membraanpotentiaal worden gemeten gedurende een periode van enkele uren. Tenzij anders vermeld, is steeds gebruik gemaakt van potentiaalmeting met twee mikro-elektroden.

Iedere mikro-elektrode is bevestigd in een elektrodenhouder. Deze is gemonteerd op een mikro-manipulator die van een stappenmotor is voorzien. De elektrodenhouder kan met de hand op en neer gedraaid worden. Deze beweging kan ook worden uitgevoerd met behulp van de stappenmotor. De snelheid, waarmee de stappen (grootte: 1 mikron) op elkaar volgen, is met een elektronische stuureenheid te variëren van 1 tot 150 stappen per sekonde. De mikro-elektrode van kanaal A wordt met de bovengenoemde apparatuur (Schreurs et al., 1974) in de goede intracellulaire positie gebracht. Als criterium hiervoor wordt genomen een membraanpotentiaal in rust, die bij een prikkelfrekwentie van 1 Hz een waarde heeft groter dan -70 mV.

3.8. HET VERWERKEN VAN DE GEGEVENS

3.8.1. Het differentiëren van de aktiepotentiaal

Met behulp van elektronische schakelingen wordt de aktiepotentiaal gedifferentieerd. Tijdens het experiment worden de aktiepotentialen vastgelegd op een elektromagnetische

band van een instrumentatierecorder (zie onder), zodat het differentiëren in principe na het experiment kan plaats vinden. Een groot nadeel hiervan is, dat met het opgenomen signaal ook de ruis van de instrumentatierecorder wordt gedifferentieerd. De gedifferentieerde aktiepotentiaal kan dan in de gedifferentieerde ruis onmeetbaar worden. Om deze reden werd overgegaan tot het differentiëren van de aktiepotentiaal tijdens het experiment. De hoogste in de aktiepotentiaal voorkomende frekwentie is ongeveer 8 kHz (eigen waarneming met behulp van een frekwentie-analysator). De afsnijd-frekwentie van de differentiator dient hier dus boven te liggen. Onze differentiator voldoet aan deze eis, het -3 dB-punt ligt bij 9,2 kHz. De differentiator is zodanig ontworpen, dat de uitgangsspanning 1 volt bedraagt, wanneer de ingangsspanning 4000 volt per sekonde verandert. De maximale stijgsnelheid van de aktiepotentiaal is altijd lager dan 400 volt per sekonde. Wij bieden de aktiepotentiaal 10x versterkt aan de differentiator aan, teneinde een goed meetbaar uitgangssignaal te krijgen. Dit uitgangssignaal wordt later vergeleken met een testpuls van 1 volt.

3.2.2. Het registreren van de gegevens (fig. 5)

De aktiepotentiaal, de gedifferentieerde aktiepotentiaal, de triggerpuls van de stuuroscillator en de prikkel worden tijdens het experiment vastgelegd op de elektromagnetische band van een instrumentatierecorder (Ampex type FR 1300 of 1800). Er wordt een loopsnelheid gebruikt van 30 inch per sekonde om een frekwentieband van 0 tot 10 kHz te realiseren. De signaal-ruis verhouding van de instrumentatierecorder is het gunstigst, wanneer het opgenomen signaal een piekwaarde heeft van ± 1 volt. De aktiepotentiaal, waarvan de amplitudo 90 tot 100 mV bedraagt, wordt daarom 10x versterkt alvorens op de band te worden opgenomen. Het uitgangssignaal van de differentiator is reeds op de gewenste waarde. De prikkel

en de triggerpuls worden met behulp van potentiometerschakelingen aan het vereiste niveau aangepast. De signalen die aan de instrumentatierecorder worden aangeboden, worden evenals de opgenomen signalen zichtbaar gemaakt op verschillende oscilloscopen. Hierdoor is controle van de opname mogelijk.

3.8.3. Het meten van de membraanpotentialiaal

Na het experiment wordt voor iedere actiepotentialiaal de membraanpotentialiaal in rust gedigitaliseerd met een AD omzetter (Didac 800, Intertechnique). Een signaal kan hiermee worden uitgedrukt in maximaal 200 niveau's (counts). Tevoren wordt de gevoeligheid zodanig ingesteld, dat een op de band opgenomen signaal van 50 mV een numerieke waarde heeft van ongeveer 150 counts. Er kunnen dan hoogteverschillen van de membraanpotentialiaal worden gemeten van ongeveer 0,3 mV.

De AD omzetter wordt gestart met de triggerpuls van de stuuroscillator. Zoals vermeld op blz. 45 is de tijdsduur tussen deze triggerpuls en de erop volgende prikkel ongeveer 10 msec. Gedurende 5 msec na de triggerpuls worden vijf samples van het signaal, de membraanpotentialiaal, genomen. De gemiddelde waarde van deze samples wordt beschouwd als de membraanpotentialiaal waarbij de op de prikkel volgende actiepotentialiaal is opgewekt.

3.8.4. Het meten van dV/dt max

In het begin van ons onderzoek werd de hoogte van dV/dt max bepaald op de door Viersma (1969) beschreven wijze. Na het experiment werd de gedifferentieerde actiepotentialiaal aangeboden aan een UV-recorder (C.E.C. recording oscillograph type 5-124). De amplituden werden met een lineaal gemeten. Aangezien de galvanometers lineair waren tot 4,5 kHz, werd de instrumentatierecorder afgespeeld met de halve opnamesnelheid. In een vroeg stadium werd ertoe overgegaan om ook

dV/dt max te bepalen met de AD omzetter (Didac 800, Intertechnique). Met behulp van een topdetector wordt op de top van het signaal, de gedifferentieerde aktiepotentiaal, een kortdurend pulsje gegeven. Dit pulsje geeft het sample-commando.

HOOFDSTUK 4

PRIKKELFREKVENTIE EN DE DIASTOLISCHE MEMBRAANPOTENTIAAL

4.1. INLEIDING

In het onderzoek van Viersma (1969) is aangetoond dat in het konijne-atrium een afname van dV/dt max optreedt, wanneer de prikkelfrekwentie wordt verhoogd. De gebruikte frekwenties liggen in het traject van 2 Hz tot 9 Hz. Deze waarneming komt overeen met bevindingen in o.a. caviaventrikel (Johnson en McKinnon, 1957; Tritthart et al., 1968), konijne-atrium (Yamagishi en Sano, 1967; Strauss et al., 1968) en konijne-ventrikel (Gibbs en Johnson, 1961). Volgens de ionentheorie berust de afname van dV/dt max op een vermindering van de natrium-instroom gedurende de depolarisatiefase. Van de mogelijke oorzaken, een minder sterke toename van g_{Na} gedurende de depolarisatiefase en een afname van de elektrochemische gradiënt voor natrium-ionen, achtte Viersma de eerste onwaarschijnlijk. Uit opnamen van over elkaar gefotografeerde actiepotentialen was namelijk gebleken, dat verhoging van de prikkelfrekwentie tot waarden onder 5,9 Hz geen afname van de diastolische potentiaal veroorzaakte. Verondersteld werd, dat in het konijne-atrium, evenals in het reuzenaxon (Hodgkin en Huxley, 1952 c) en in Purkinje-vezels van het schaap (Weidmann, 1955 a), de reaktivatie van de natriumcarriers volledig was, wanneer de repolarisatie was voltooid. Viersma (1969) stelde als hypothese, dat de afname van dV/dt max bij verhoging van de prikkelfrekwentie voor frekwenties onder 5,9 Hz berustte op een verlaging van de concentratiegradiënt voor natrium-ionen als gevolg van een intracellulaire ophoping van natrium-ionen. Boven de

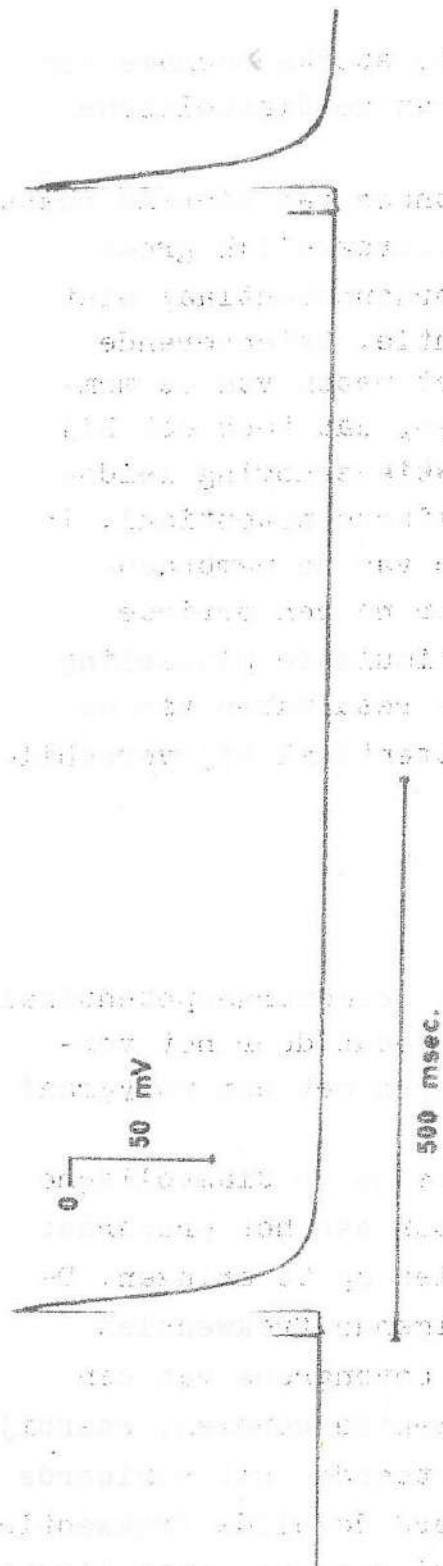
genoemde frekwentie zou ook een minder sterke toename van E_{Na} , veroorzaakt door een verlaging van de diastolische membraanpotentiala, een rol spelen.

Een van de pijlers waarop de hypothese van Viersma rustte, was dus de waarneming, dat over een betrekkelijk groot frekwentiegebied de diastolische membraanpotentiala niet werd beïnvloed door de prikkelfrekwentie. Oriënterende experimenten met onze methode voor het meten van de membraanpotentiala deden echter vermoeden, dat toch ook bij relatief lage frekwenties een frekwentieverhoging leidde tot een geringe afname van de diastolische potentiala. In dit hoofdstuk wordt eerst het verloop van de membraanpotentiala in rust beschreven, wanneer na een periode waarin het hart wordt gedreven, de stimulatie plotseling wordt gestaakt. Aansluitend volgen de resultaten van de meting van de diastolische membraanpotentiala bij verschillende frekwenties.

4.2. EXPERIMENTELE PROCEDURE

De registratie van het verloop van de membraanpotentiala na het staken van de stimulatie geschiedde door het sterkste signaal op papier vast te leggen met een polygraaf (Elema Schönander, Minograf 81).

De invloed van de prikkelfrekwentie op de diastolische membraanpotentiala werd onderzocht door aan het preparaat een serie van steeds hogere frekwenties op te dringen. De laagste frekwentie was 1 Hz. Opeenvolgende frekwenties verschilden nooit meer dan 1 Hz. Als bovengrens van een frekwentieserie werd de hoogste frekwentie genomen, waarbij het preparaat geen geleidingsblok vertoonde. Dit varieerde van 6 Hz tot 9 Hz. Indien mogelijk werd dezelfde frekwentieserie ook in omgekeerde volgorde doorlopen. De diastolische membraanpotentiala en dV/dt max werden bij een frekwentie pas gemeten, wanneer de betrokken frekwentie tenminste 1 minuut aan het preparaat was opgedrongen. In deze periode was



Figuur 6. Aktiepotentialen bij een prikkelfrekventie van 1 Hz.
Iedere aktiepotential wordt voorafgegaan door het prikkelartefakt.
De membraanpotential lijkt tussen de aktiepotentialen in konstant te zijn.

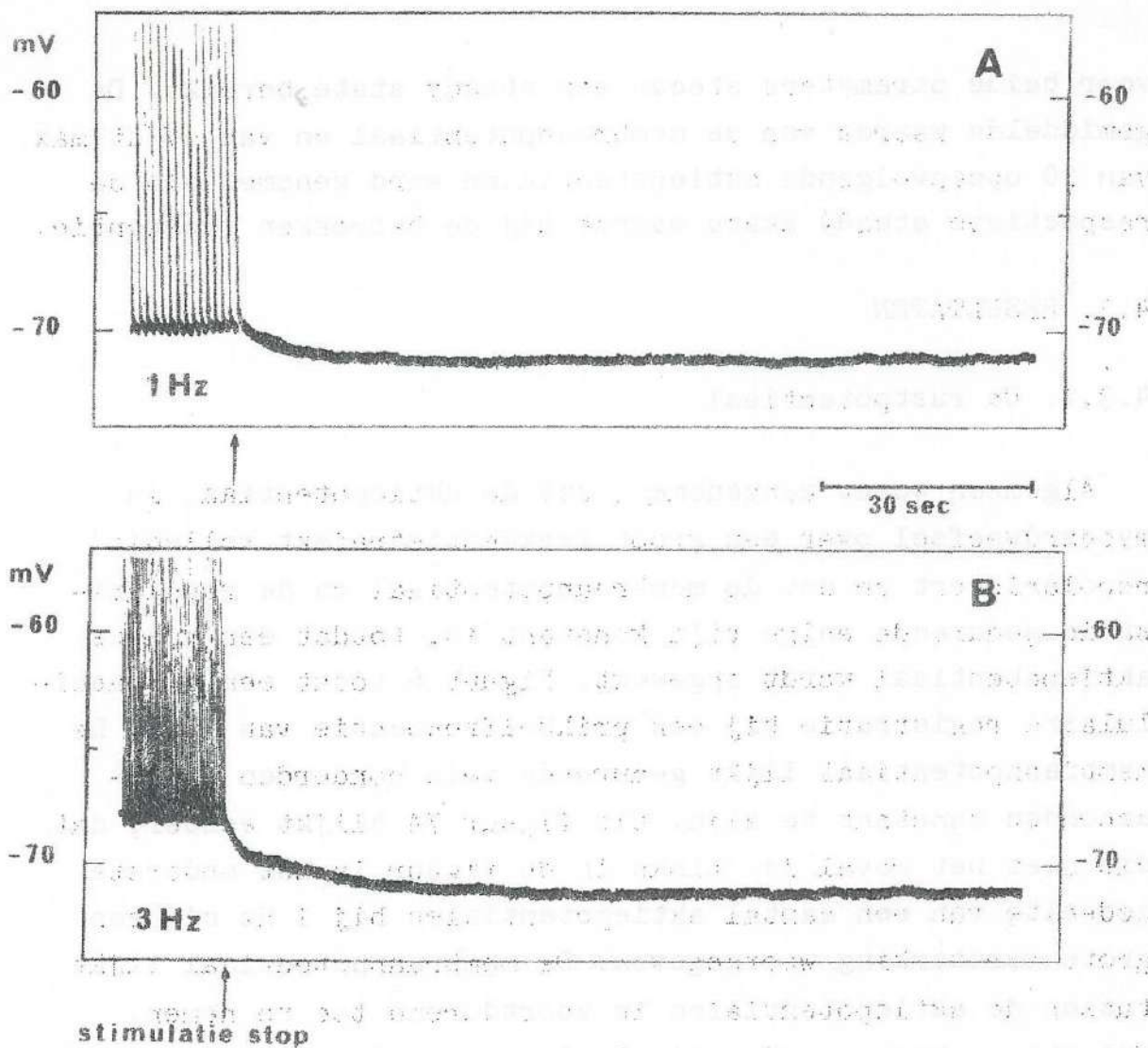
voor beide parameters steeds een steady state bereikt. De gemiddelde waarde van de membraanpotentiaal en van dV/dt max van 10 opeenvolgende actiepotentialen werd genomen als de respectieve steady state waarde bij de betrokken frekwentie.

4.3. RESULTATEN

4.3.1. De rustpotentiaal

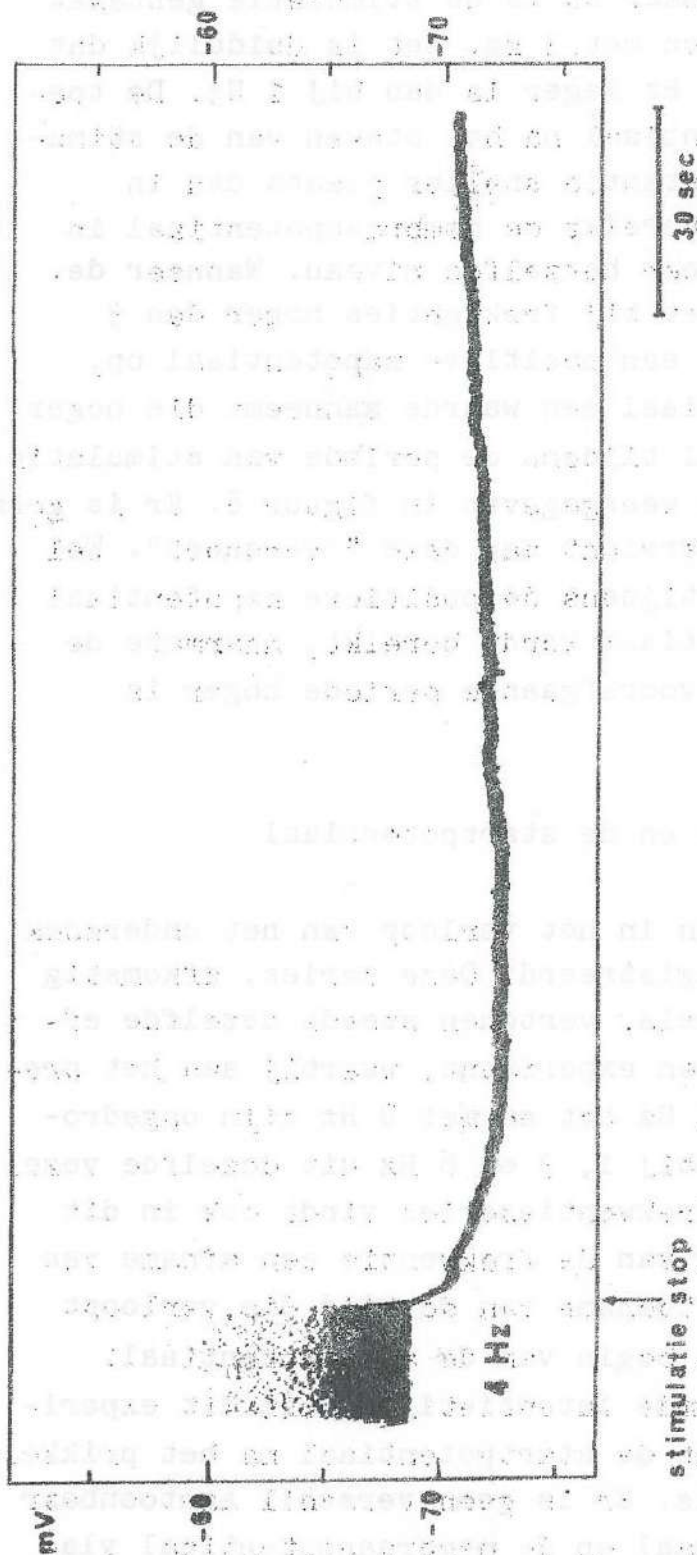
Algemeen wordt aangenomen, dat de actiepotentiaal in myocardweefsel over een groot frekwentietrajekt volledig repolariseert en dat de membraanpotentiaal na de repolarisatie gedurende enige tijd konstant is, totdat een nieuwe actiepotentiaal wordt opgewekt. Figuur 6 toont een intracellulaire registratie bij een prikkelfrekwentie van 1 Hz. De membraanpotentiaal lijkt gedurende vele honderden milliseconden konstant te zijn. Uit figuur 7A blijkt echter, dat dit niet het geval is. Links in de figuur is het onderste gedeelte van een aantal actiepotentialen bij 1 Hz bij een grote versterking weergegeven. De membraanpotentiaal lijkt tussen de actiepotentialen in voortdurend toe te nemen. Het stop zetten van de stimulatie toont, dat deze toename zich nog vele seconden lang kan voortzetten. Blijkbaar wordt de membraanpotentiaal zelfs bij een zeer lage frekwentie niet konstant, maar neemt nog steeds toe tot het moment, dat een volgende actiepotentiaal wordt opgewekt.

De membraanpotentiaal waarbij een actiepotentiaal wordt opgewekt, wordt meestal diastolische potentiaal of membraanpotentiaal genoemd. Deze laatste naam suggereert ten onrechte, dat de membraan tussen de actiepotentialen in konstante eigenschappen heeft. De membraanpotentiaal waarbij een actiepotentiaal wordt opgewekt, wordt in dit onderzoek verder "start-potentiaal" genoemd, als equivalent voor het in de angelsaksische literatuur helaas slechts weinig gebruikte begrip "take-off potential".



Figuur 7. Het verloop van de membraanpotentiaal na het stopzetten van de stimulatie.

Door de grote versterking is slechts het onderste gedeelte van de actiepotentialen zichtbaar. De registraties A en B, stimulatie-frekwentie resp. 1 Hz en 3 Hz, zijn gemaakt uit dezelfde vezel. Ondanks het verschil in startpotentiaal tussen beide frekwenties (-70,0 mV bij 1 Hz, -68,6 mV bij 3 Hz) bereikt de membraanpotentiaal na het stopzetten van de stimulatie uiteindelijk ongeveer dezelfde waarde (resp. -71,2 mV en -71,4 mV).

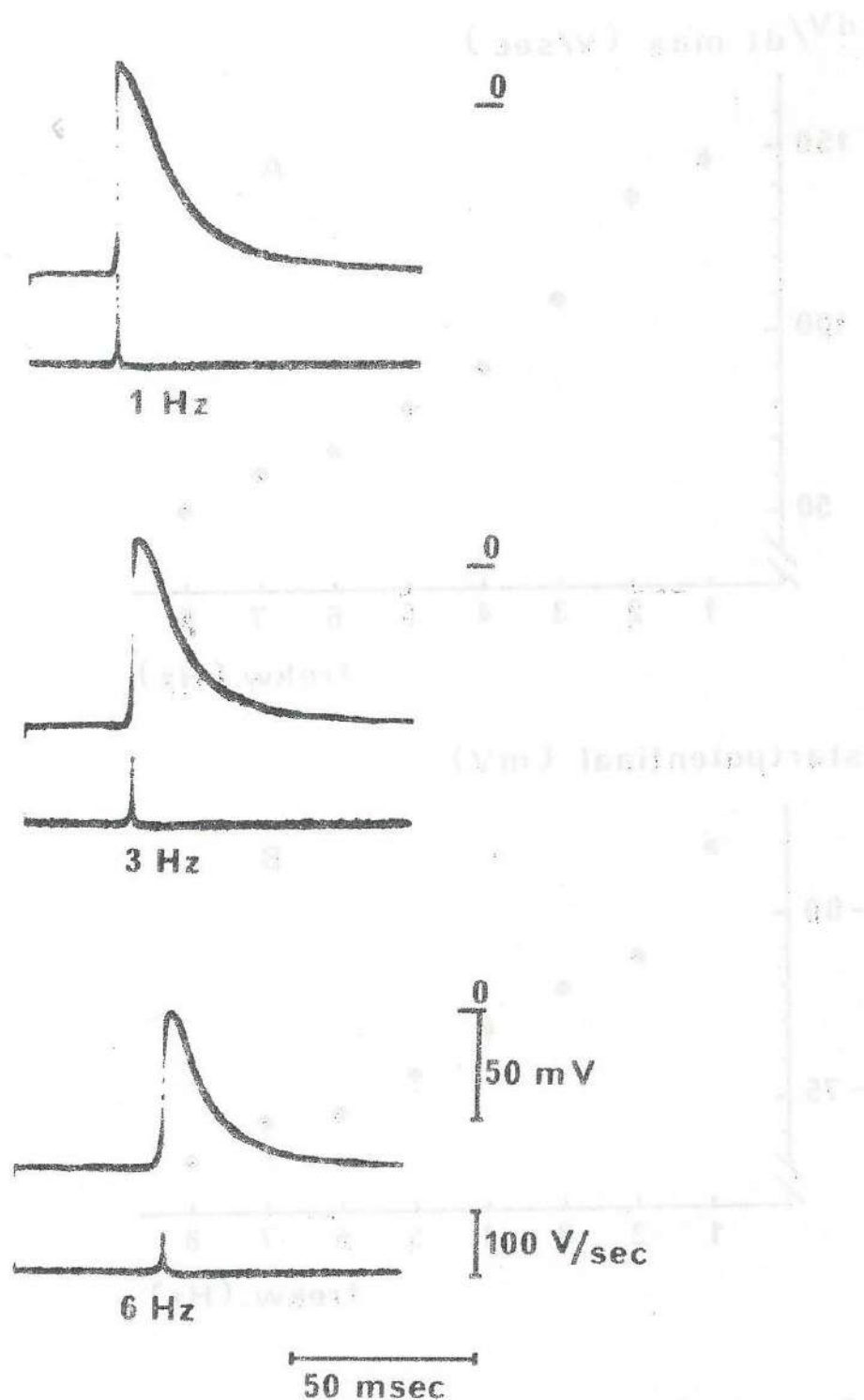


Figuur 8. Na een periode waarin met 4 Hz is gestimuleerd, is na het stop zetten van de stimulatie tijdens de hyperpolarisatie een positieve na-potentiaal waarneembaar.

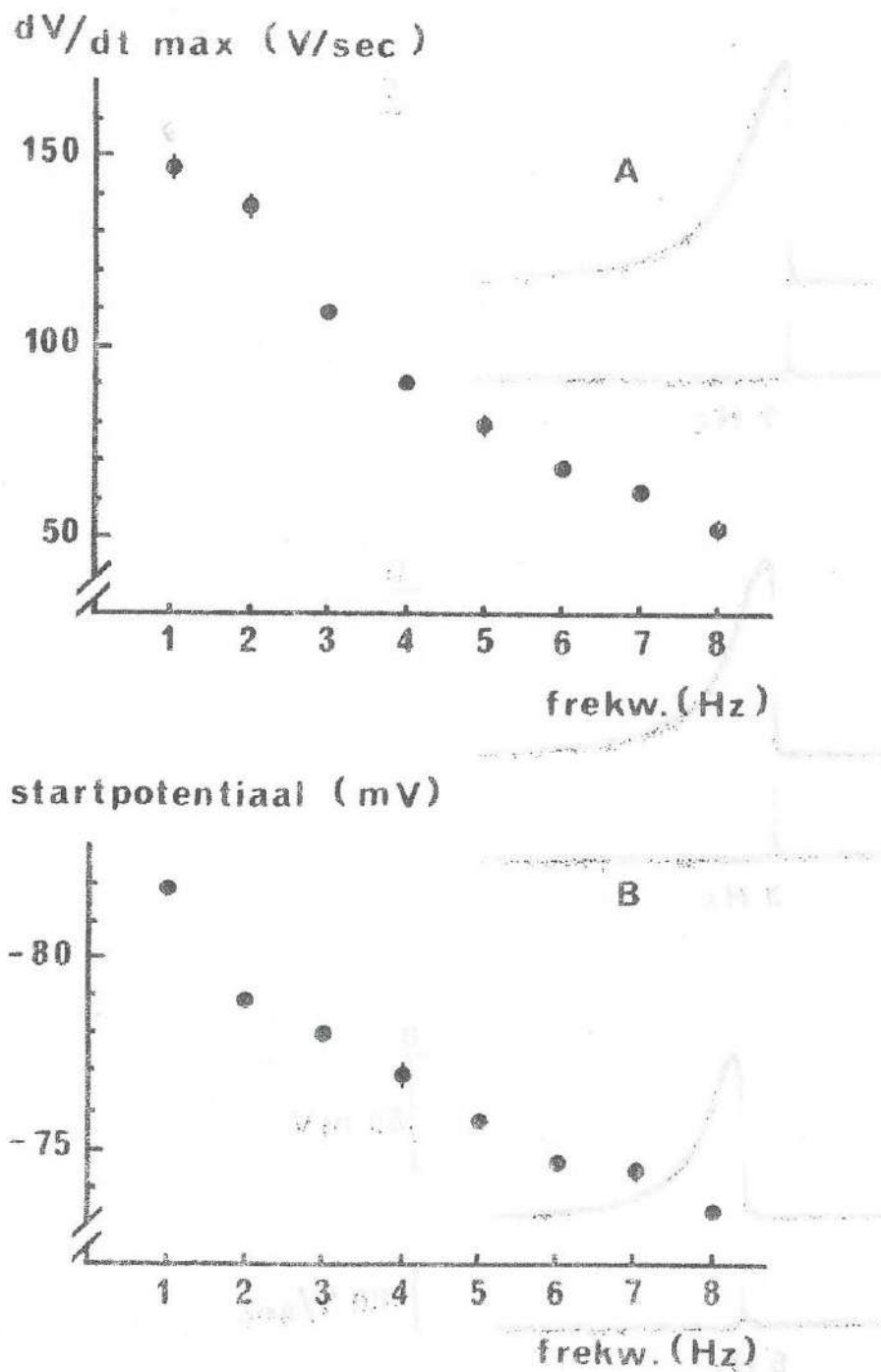
In figuur 7B is een registratie weergegeven uit dezelfde vezel als in figuur 7A, maar nu is de stimulatie gestaakt na een periode van drijven met 3 Hz. Het is duidelijk dat de startpotentiaal bij 3 Hz lager is dan bij 1 Hz. De toename van de membraanpotentiaal na het staken van de stimulatie vindt in eerste instantie sneller plaats dan in figuur 7A. Uiteindelijk bereikt de membraanpotentiaal in beide registraties ongeveer hetzelfde niveau. Wanneer de stimulatie wordt stopgezet bij frekwenties hoger dan 3 à 4 Hz, dan treedt eerst een positieve napotentiaal op, waarna de membraanpotentiaal een waarde aanneemt die hoger is dan de startpotentiaal tijdens de periode van stimulatie. Een voorbeeld hiervan is weergegeven in figuur 8. Er is geen systematisch onderzoek verricht aan deze "overshoot". Wel werd geconstateerd, dat tijdens de positieve napotentiaal een hogere membraanpotentiaal wordt bereikt, naarmate de prikkelfrekwentie in de voorafgaande periode hoger is geweest.

4.3.2. Prikkelfrekwentie en de startpotentiaal

Uit 17 preparaten zijn in het verloop van het onderzoek 36 frekwentieseries geregistreerd. Deze series, afkomstig uit 24 verschillende vezels, vertonen steeds dezelfde effecten. Figuur 9 toont een experiment, waarbij aan het preparaat frekwenties van 1 Hz tot en met 8 Hz zijn opgedroegen, de actiepotentiaal bij 1, 3 en 6 Hz uit dezelfde vezel. Evenals in alle andere frekwentieseries vindt ook in dit experiment bij verhoging van de frekwentie een afname van dV/dt max plaats en een toename van de tijd die verloopt tussen de prikkel en het begin van de actiepotentiaal. De duur van deze zogenaamde latentietijd is in dit experiment relatief lang, zodat de startpotentiaal na het prikkel-artefakt goed meetbaar is. Er is geen verschil aantoonbaar tussen deze startpotentiaal en de membraanpotentiaal vlak voor de prikkel. In andere experimenten is de latentietijd



Figuur 9. De actiepotentiaal en de gedifferentieerde actiepotentiaal bij resp. 1, 3 en 6 Hz uit dezelfde vezel, gefotografeerd van het scherm van een oscilloscoop, waarvan de tijdbasis werd gestart door het prikkel-artefakt.



Figuur 10. De invloed van de prikkelfrekwentie op $dV/dt \text{ max}$ (A) en de startpotentiaal (B).

Ieder punt geeft een gemiddelde waarde weer, berekend over 10 opeenvolgende actiepotentialen in steady state. De standaard-afwijking van het gemiddelde (SEM), naar weerszijde uitgezet, valt meestal binnen de groote van het symbool.

soms zo kort, dat prikkelartefakt en actiepotentiaal in elkaar overgaan. Nauwkeurige bepaling van de startpotentiaal na het prikkelartefakt is dan niet mogelijk. Om deze reden wordt als startpotentiaal steeds de waarde genomen van de membraanpotentiaal, die ongeveer 5 msec vóór de prikkel heerst (zie paragraaf 3.8.3.).

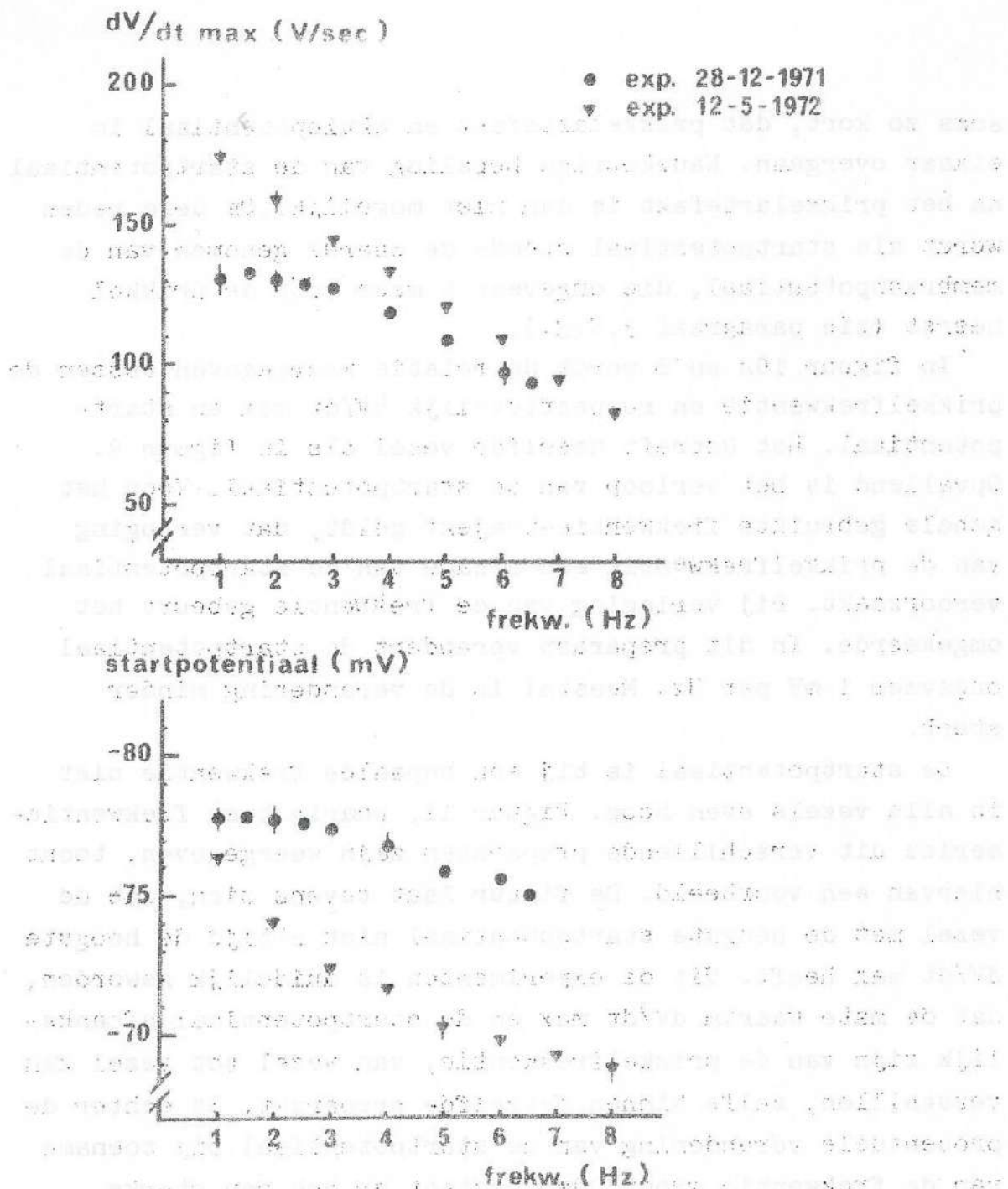
In figuur 10A en B wordt de relatie weergegeven tussen de prikkelfrekwentie en respectievelijk dV/dt max en startpotentiaal. Het betreft dezelfde vezel als in figuur 9. Opvallend is het verloop van de startpotentiaal. Voor het gehele gebruikte frekwentie-trajekt geldt, dat verhoging van de prikkelfrekwentie een afname van de startpotentiaal veroorzaakt. Bij verlaging van de frekwentie gebeurt het omgekeerde. In dit preparaat verandert de startpotentiaal ongeveer 1 mV per Hz. Meestal is de verandering minder sterk.

De startpotentiaal is bij een bepaalde frekwentie niet in alle vezels even hoog. Figuur 11, waarin twee frekwentie-series uit verschillende preparaten zijn weergegeven, toont hiervan een voorbeeld. De figuur laat tevens zien, dat de vezel met de hoogste startpotentiaal niet altijd de hoogste dV/dt max heeft. Uit de experimenten is duidelijk geworden, dat de mate waarin dV/dt max en de startpotentiaal afhankelijk zijn van de prikkelfrekwentie, van vezel tot vezel kan verschillen, zelfs binnen hetzelfde preparaat. Is echter de procentuele verandering van de startpotentiaal bij toename van de frekwentie groot, dan bestaat er ook een sterke procentuele verandering van dV/dt max.

4.4. BESPREKING VAN DE RESULTATEN

4.4.1. De membraanpotentiaal na het staken van de stimulatie

De beschreven experimenten hebben aangetoond, dat de membraanpotentiaal zelfs bij een prikkelfrekwentie van 1 Hz niet konstant wordt, maar tussen de actiepotentialen in nog



Figuur 11. De invloed van de prikkel Frekwentie op $dV/dt \text{ max}$ en de startpotentiaal in vezels van verschillende preparaten.

Ieder symbool geeft de gemiddelde waarde weer,

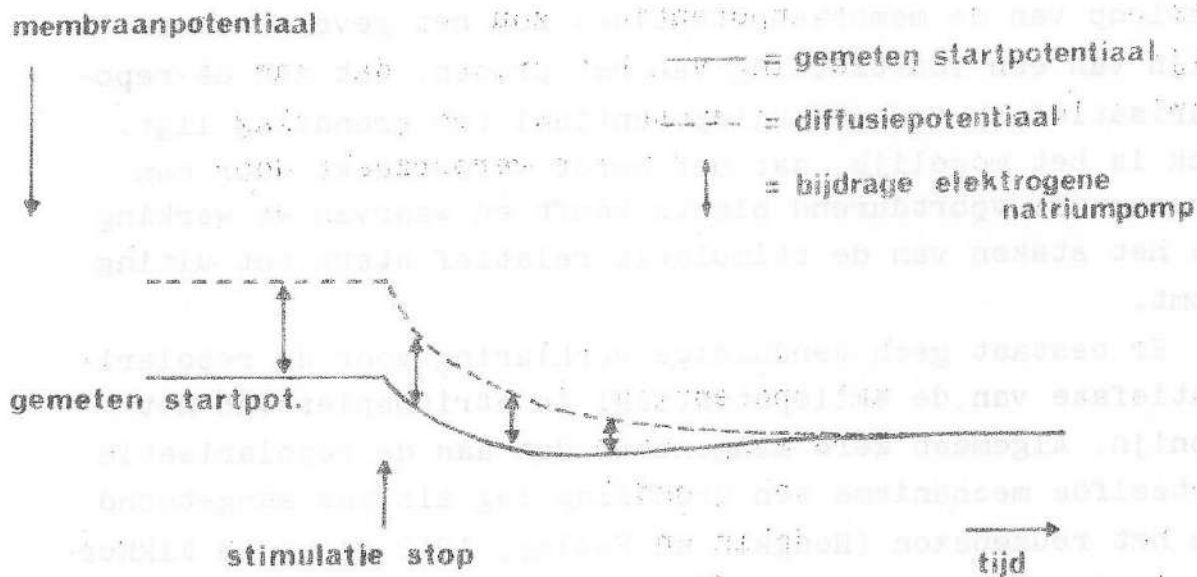
berekend over 10 opeenvolgende actiepotentialen in steady state.

Zie verder tekst.

voortdurend toeneemt. Pas vele seconden na het stop zetten van de stimulatie wordt een konstante waarde bereikt. Dit verloop van de membraanpotentialiaal zou het gevolg kunnen zijn van een voortzetting van het proces, dat aan de repolarisatiefase van de actiepotentialiaal ten grondslag ligt. Ook is het mogelijk, dat het wordt veroorzaakt door een proces dat voortdurend plaats heeft en waarvan de werking na het staken van de stimulatie relatief sterk tot uiting komt.

Er bestaat geen eenduidige verklaring voor de repolarisatiefase van de actiepotentialiaal in atriumspier van het konijn. Algemeen werd aangenomen dat aan de repolarisatie hetzelfde mechanisme ten grondslag lag als was aangetoond in het reuzenaxon (Hodgkin en Huxley, 1952 c) en in kikkeratria (Rougier et al., 1968 en 1969): een toename van g_K . Gegevens van Giebisch en Weidmann (1971), verkregen uit voltage clamp experimenten met trabekels van de schapenventrikel, maken echter waarschijnlijk, dat de repolarisatiefase in hun preparaat door een ander mechanisme wordt veroorzaakt, namelijk door een langzame afname van g_{Na} en/of g_{Ca} . Beschouwingen over het mechanisme van de repolarisatiefase van de actiepotentialiaal in het konijne-atrium zijn door het ontbreken van gegevens slechts speculatief. Welk mechanisme dit in de toekomst ook blijkt te zijn, het kan op dit moment niet worden uitgesloten als mogelijke oorzaak voor de hyperpolarisatie die na het staken van de stimulatie optreedt. Om de positieve napotentiaal te verklaren, die de membraanpotentialiaal na een periode van stimulatie kan vertonen, moet dan een bifasisch verloop van dit mechanisme worden verondersteld.

Het verloop van de membraanpotentialiaal na het stop zetten van de stimulatie kan echter ook geheel worden verklaard door een verandering van de aktiviteit van de Na/K-pomp. Bij een bepaalde prikkelfrekwentie in steady state worden de passieve natrium-influx en kalium-efflux volledig door het actieve transport gecompenseerd. Na het staken van de



Figuur 12. Schematische voorstelling van het ontstaan van de hyperpolarisatie en de positieve na-potentiaal na het stop zetten van de stimulatie (vergelijk figuur 8).

De startpotentiaal is opgebouwd uit een diffusiepotentiaal en uit een potentiaalverschil dat wordt veroorzaakt door de elektrogene werking van de natrium-pomp. Na het stopzetten van de stimulatie neemt V_K toe, waardoor de diffusiepotentiaal groter wordt. De activiteit van de natriumpomp neemt echter geleidelijk af, zodat de bijdrage hiervan aan de membraanpotentiaal steeds kleiner wordt.

stimulatie zijn deze passieve ionenfluxen plotseling veel kleiner. Wanneer wordt verondersteld dat nu het passieve transport van de natrium- en de kalium-ionen door het actieve transport wordt overtroffen, dan leidt deze situatie tot een afname van $|\text{Na}^+|_i$ en een toename van $|\text{K}^+|_i$. Het ATP-ase, dat bij het actieve natrium- en kaliumtransport is betrokken, wordt gestimuleerd door $|\text{Na}^+|_i$ en $|\text{K}^+|_e$. Verwacht kan dus worden, dat de afname van $|\text{Na}^+|_i$ leidt tot een daling van de pompaktiviteit en wel tot een niveau, waarop weer geldt: natrium-efflux = natrium-influx en kalium-efflux = kalium-influx. De gestegen concentratiegradiënt voor kalium-ionen kan de toename van de membraanpotential verklaren, die na het staken van de stimulatie wordt waargenomen.

De positieve napotentiaal kan eveneens door een langzame afname van de aktiviteit van de Na/K-pomp worden verklaard, wanneer wordt aangenomen dat ook in het konijne-atrium het actieve natriumtransport elektrogeen is. Argumenten voor deze aanname zijn uitvoerig besproken in paragraaf 2.8. Tijdens de afname van de pompaktiviteit na het stop zetten van de stimulatie zal de membraanpotential niet alleen worden beïnvloed door de stijging van V_K , maar ook door een gelijktijdige vermindering van de bijdrage van de elektrogene pomp. Deze laatste faktor kan dan de oorzaak zijn van de positieve napotentiaal. Schematisch is dit weergegeven in figuur 12. Wanneer de stimulatiefrekwentie hoog is, dan zal de bijdrage van de elektrogene pomp aan de startpotential relatief groot zijn. In dat geval zal na het stop zetten van de stimulatie een relatief grote positieve napotentiaal moeten optreden. De beschreven waarneming is hiermee in overeenstemming.

In de literatuur zijn geen experimenten bekend, waarbij in het konijne-atrium de stimulatie wordt stop gezet na het remmen van de Na/K-pomp. De informatie die uit dergelijke experimenten in zenuwweefsel is verkregen, steunt echter de veronderstelling, dat het actieve membraantransport een belangrijke rol speelt bij het tot stand komen van de

hyperpolarisatie en de positieve napotentiaal. In ongemyelini-seerde zenuwvezels is namelijk eveneens een overshoot aangetoond, wanneer de celmembraan na het staken van de stimu-latie (15 Hz) hyperpolariseerde (Ritchie en Straub, 1957). Deze zogenaamde post-tetanic hyperpolarization (PTH) verminderde na toevoeging van 2,4-dinitrofenol en van ouabaine en verdween zelfs geheel, wanneer het extracellulaire NaCl werd vervangen door LiCl. De auteurs concludeerden hieruit, dat de aktiviteit van de Na/K-pomp aan de PTH ten grondslag moest liggen. Uit experimenten met gemyeliniseerde kikkerzenuwen met een kleine diameter berekende Straub (1961), dat de PTH kon worden verklaard, wanneer de Na/K-pomp ongeveer 2 natriumionen tegen 1 kaliumion zou verplaatsen. Aan deze hypothese van een elektrogene natriumpomp door Rang en Ritchie (1968). Zij toonden aan, dat naast de aktieve natrium-efflux een passieve chloor-efflux plaats vond, zodat het elektrogene effect van de pomp gedeeltelijk was kortgesloten. Afname van $[Cl^-]_i$ deed zowel de duur als de amplitudo van de PTH sterk toenemen. Ook onder deze omstandigheden verdween de PTH, wanneer ouabaine werd toegevoegd of wanneer het extracellulaire NaCl door LiCl werd vervangen.

4.4.2. De invloed van de frekwentie op de startpotentiaal.

Bij verhoging van de prikkelfrekwentie nemen de natrium-influx en de kalium-efflux toe (zie bv. Langer, 1968; Polimeni en Vasalle, 1970). Een hogere prikkelfrekwentie vereist dus een grotere aktiviteit van de Na/K-pomp. Verwacht kan worden, dat ten gevolge van het grotere elektro-gene effect van deze pomp de steady state - startpotentiaal bij hogere frekwenties toegenomen zal zijn. Dit fenomeen is door Vasalle (1970) in Purkinje vezels aangetoond. In ons preparaat werd echter uitsluitend het tegenovergestelde effect gezien. Dit kan niet zonder meer worden verklaard uit de kortere duur van het interstimulus-interval.

Welliswaar wordt hierdoor de aktiepotentiaal vroeger in de repolarisatiefase van de voorafgaande aktiepotentiaal opgewekt, doch het effect hiervan op de startpotentiaal wordt tegengewekt door de bij frekwentieverhoging optredende verkorting van de aktiepotentiaalduur (Hollander en Webb, 1955; Greenspan et al., 1967; Gelband et al., 1972). Bovendien vindt de afname van de startpotentiaal ook plaats bij frekwentieverhoging onder 5 Hz, terwijl in het konijne-atrium bij alle frekwenties de repolarisatie na 150 à 200 msec nagenoeg voltooid is. De in dit hoofdstuk aangetoonde toename van de membraanpotentiaal na de eigenlijke repolarisatiefase geschiedt veel te langzaam om de lagere startpotentiaal bij een korter interval, met andere woorden bij een hogere frekwentie, te kunnen verklaren.

In de literatuur wordt algemeen aangenomen, dat bij frekwentie-verhoging een daling van $|K^+|_i$ optreedt. De verlaging van de concentratie-gradient van de kaliumionen zou de verklaring kunnen zijn voor de lagere startpotentiaal. Hercus et al. (1955) vonden in strips van de ratte-ventrikel een afname van $|K^+|_i$ met 20 mmol/l bij een frekwentie-verhoging van 12 tot 100 slagen per minuut. Metingen van Reiter (1956) in hetzelfde preparaat lieten minder grote verschillen zien: bij 10 Hz was $|K^+|_i$ ongeveer 8 mmol/l lager dan bij 1 Hz. In overeenstemming met een verlaging van $|K^+|_i$ bij toename van de frekwentie is het tijdelijke verlies van kaliumionen, dat uit hartspier optreedt na overschakeling op een hogere frekwentie. Sarnoff et al. (1963) vonden, dat dit kalium verlies gepaard ging met een verhoogd zuurstofverbruik en veronderstelden een relatie met het aktieve membraantransport. Zij werden gesteund door metingen van Langer en Brady (1966) aan de ^{42}K -efflux uit geperfundeerde papillairspieren van de hond. In het verloop van de radioaktiviteit van de uitstromende vloeistof was een fase te onderscheiden, waarvan de snelheid van de radioaktiviteitsafname gelijk was aan die van het totale weefsel. De auteurs beschouwden deze fase als representatief

voor het verlies van intracellulair ^{42}K . Het kaliumverlies na de frekwentieverhoging duurde ongeveer 20 minuten en was maximaal na 8 minuten. Mede op grond van de publikatie van Conn en Wood (1959), waarin een toename van $|\text{Na}^+|_i$ bij hogere frekwenties aannemelijk werd gemaakt, kwamen Langer en Brady (1966) tot de hypothese, dat het kaliumverlies werd veroorzaakt door een relatief trage toename van de aktiviteit van de Na/K-pomp ("pump lag"). Na een verhoging van de frekwentie zou de pomp niet direkt in staat zijn om na iedere aktiepotentiaal de concentratie-gradient van de ionen te herstellen. Hierdoor vindt een afname van $|\text{K}^+|_i$ plaats en een stijging van $|\text{Na}^+|_i$. Op geleide van deze laatste zou de aktiviteit van de Na/K-pomp worden verhoogd tot een steady state wordt bereikt.

Gilmore en Gerlings (1969) steunden echter de door Hajdu (1953) opgestelde hypothese, dat het kaliumverlies werd veroorzaakt door een vermindering van de kalium-influx als gevolg van het kortere interstimulus-interval. Het kaliumverlies na frekwentieverhoging duurde volgens deze auteurs slechts enkele minuten en zou ook plaats kunnen hebben zonder toename van het zuurstofverbruik, bijvoorbeeld bij overgang op ventrikelfibrilleren. Wanneer van paired stimulation werd overgeschakeld op normaal stimuleren met verdubbelde frekwentie, zodat het aantal aktiepotentialen per tijdseenheid onveranderd bleef maar het aantal kontrakties twee maal zo hoog werd, dan trad geen kaliumverlies op, terwijl het zuurstofverbruik afnam. Op grond van hun waarneming dat het kaliumverlies na frekwentieverhoging langer duurde, wanneer in het preparaat een zuurstoftekort heerste, suggereerden Gerlings et al. (1969), dat dit de verklaring zou kunnen zijn voor het langdurige kaliumverlies in de experimenten van Langer en Brady (1966), aangezien het preparaat van deze twee auteurs niet met bloed maar met een zout-oplossing werd geperfundeerd. Latere experimenten van Gilmore et al. (1971) toonden aan, dat de grootte van het kaliumverlies bij frekwentieverhoging niet werd beïnvloed door de snelheid, waarmee de verandering van

de frekwentie tot stand was gebracht. Ondanks de hierna gevoerde discussie (Langer, 1972; Gilmore, 1972) is tot op heden geen overeenstemming bereikt over de oorzaak van het kaliumverlies.

Er zijn in de literatuur geen gegevens bekend over kaliumverlies uit konijne-atria bij frekwentieverhoging. Wanneer wordt aangenomen dat dit preparaat vergelijkbaar is met het honde-hart, dan kunnen de gegevens uit dit laatste preparaat worden gebruikt om een schatting te maken van de afname van $[K^+]_i$. In de experimenten waarin de frekwentie van ongeveer 100 tot ongeveer 200 slagen per minuut wordt verhoogd, is het gemiddelde kaliumverlies $53 \mu\text{Eq}$ ($\text{SEM} = 10 \mu\text{eq}$), zoals kan worden berekend uit de publikatie van Gilmore en Gerlings (1969), tabel I, exp. 1, 4 en 9. Wanneer de aanname juist is, dat van het 100 gram wegende preparaat 75% wordt ingenomen door het weefselwater en dat zich hiervan 35% in de interstitiele ruimte bevindt (Gilmore et al., 1971), dan zou het genoemde kaliumverlies leiden tot een afname van $[K^+]_i$ met $1,1 \text{ mmol/l}$. Uitgaande van $[K^+]_i = 150 \text{ mmol/l}$ betekent dit een verlaging van V_K met $0,2 \text{ mV}$. Uit 19 experimenten in het konijne-atrium hebben wij berekend, dat de gemiddelde afname van de startpotentiaal bij een vergelijkbare frekwentieverhoging, namelijk van 2 Hz tot 3 Hz, in dit preparaat $0,7 \text{ mV}$ ($\text{SEM} = 0,1 \text{ mV}$) bedraagt. Deze afname is significant groter dan de waarde, die op grond van het kaliumverlies uit het honde-hart kan worden verwacht (t-toets, 5%-niveau). Langer en Brady (1966) berekenen uit hun metingen, dat $[K^+]_i$ bij een meer dan viervoudige toename van de frekwentie (van 8 tot 38 slagen per minuut) afneemt met 2,4%. Uitgaande van $[K^+]_i = 150 \text{ mmol/l}$ zou dit leiden tot een afname van V_K met $0,5 \text{ mV}$. In onze experimenten veroorzaakt echter een frekwentieverhoging van 1 Hz tot 4 Hz een gemiddelde afname van de startpotentiaal met $2,7 \text{ mV}$ ($\text{SEM} = 0,4 \text{ mV}$).

Bij de interpretatie van de bovenstaande berekeningen moet worden bedacht, dat verschillende diersoorten met elkaar zijn vergeleken. Misschien verliest het konijne-hart bij

frekwentieverhoging meer kalium dan dat van de hond.

Bovendien is er een verschil in experimentele omstandigheden.

Terwijl Gilmore en Gerlings (1969) en Langer en Brady (1966)

hun preparaat met respectievelijk bloed en een zout-oplossing

doorstroonden, wordt in onze experimenten het preparaat met

een zout-oplossing omstroomd. Het is niet uitgesloten dat

ons preparaat in een lichte mate van hypoxie verkeert ten

opzichte van een geperfundeerde hart, waardoor bij frekwentie-

verhoging een groter kaliumverlies kan optreden. Het is echter

ook mogelijk, dat er behalve de afname van V_K nog andere

mechanismen aan de daling van de startpotentiaal bij frekwentie-

verhoging ten grondslag liggen, zoals bijvoorbeeld een daling

van g_K of een toename van g_{Na} . Er zijn echter geen experimenten

bekend, die enige aanwijzing in een dergelijke richting geven.

4.5. CONCLUSIES.

Het staken van de stimulatie veroorzaakt een hyperpolarisatie

van de celmembraan. De positieve napolentiaal, die na

een relatief hoge prikkelfrekwentie wordt waargenomen, is

in overeenstemming met de aanwezigheid van een elektrogene

natriumpomp.

De startpotentiaal neemt af, wanneer de prikkelfrekwentie

wordt verhoogd. Bij verlaging van de frekwentie gebeurt het

omgekeerde.

HOOFDSTUK 5

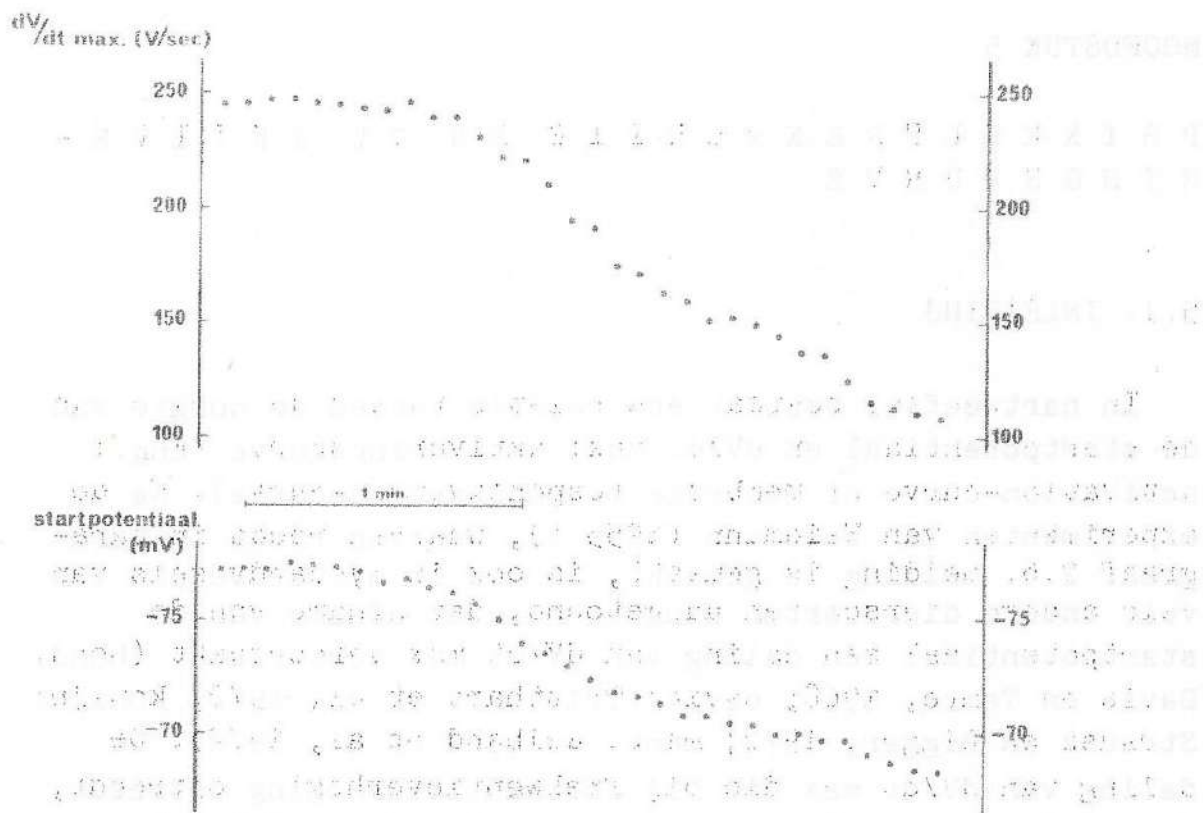
PRIKKELFREKVENTIE EN DE AKTIVERINGSKURVE

5.1. INLEIDING

In hartweefsel bestaat een relatie tussen de hoogte van de startpotentiaal en dV/dt max: aktiveringskurve (Eng.: activation-curve of membrane responsiveness-curve). Na de experimenten van Weidmann (1955 a), waarvan reeds in paragraaf 2.6. melding is gemaakt, is ook in myocardvezels van vele andere diersoorten aangetoond, dat afname van de startpotentiaal een daling van dV/dt max veroorzaakt (hond: Davis en Temte, 1968; cavia: Tritthart et al, 1972; konijn: Strauss en Bigger, 1972; mens: Gelband et al, 1972). De daling van dV/dt max die bij frekwentieverhoging optreedt, is dus in overeenstemming met de in hoofdstuk 4 beschreven waarneming, dat onder deze omstandigheden de startpotentiaal afneemt. Om de vraag te beantwoorden, of deze afname van de startpotentiaal voldoende sterk was om het effect van de frekwentie op dV/dt max volledig te verklaren, werd een serie experimenten uitgevoerd. De vraagstelling viel in twee delen uiteen:

1. hoe verloopt de aktiveringskurve van het konijne-atrium ?
2. kan met behulp van deze kurve de invloed van de frekwentie op dV/dt max worden verklaard uit de relatie tussen frekwentie en startpotentiaal ?

De resultaten van de experimenten hebben geleid tot een volgende experimentenserie waarin de vraag centraal stond, of de aktiveringskurve afhankelijk was van de prikkel-frekwentie en zo ja, welk mechanisme hieraan ten grondslag lag. Deze experimenten worden eveneens in dit hoofdstuk beschreven.



Figuur 13. Het verloop van de startpotentiaal en van dV/dt max bij een langzame verhoging van $[K^+]_{\text{org}}$ in het orgaanbakje tot ongeveer 10 mmol/l.

Op tijdstip A is de toevoeging van de kaliumrijke vloeistof begonnen. De prikelfrekwentie is 1 Hz. Ieder punt is de gemiddelde waarde van 5 opeenvolgende actiepotentialen.

De veranderingen in de startpotentiaal en in dV/dt max zijn te zien op de grafiek. De startpotentiaal daalt van ongeveer -72 mV naar -75 mV, terwijl dV/dt max daalt van ongeveer 240 V/sec naar 120 V/sec.

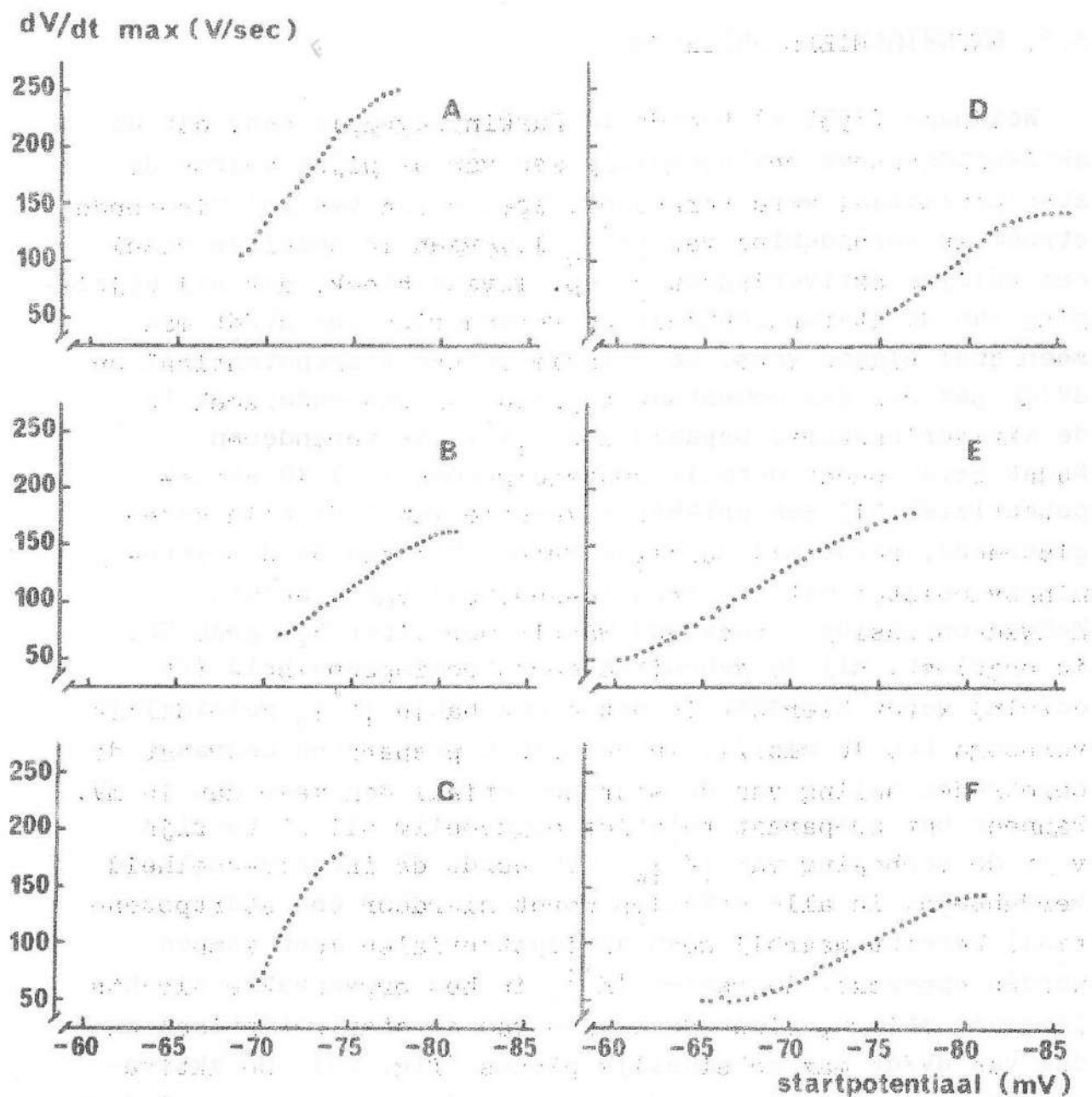
De veranderingen in de startpotentiaal en in dV/dt max zijn te zien op de grafiek. De startpotentiaal daalt van ongeveer -72 mV naar -75 mV, terwijl dV/dt max daalt van ongeveer 240 V/sec naar 120 V/sec.

De veranderingen in de startpotentiaal en in dV/dt max zijn te zien op de grafiek. De startpotentiaal daalt van ongeveer -72 mV naar -75 mV, terwijl dV/dt max daalt van ongeveer 240 V/sec naar 120 V/sec.

5.2. EXPERIMENTELE PROCEDURE

Weidmann (1955 a) toonde in Purkinje-vezels aan, dat de aktiveringskurve onafhankelijk was van de wijze waarop de startpotentiaal werd veranderd. Toediening van polariserende stroom en verandering van $|K^+|_e$ leverden in dezelfde vezel een gelijke aktiveringskurve op. Tevens bleek, dat bij wijziging van de startpotentiaal de verandering van dV/dt max zeer snel plaats vond. De relatie tussen startpotentiaal en dV/dt max was dus momentaan bepaald. In ons onderzoek is de aktiveringskurve bepaald door $|K^+|_e$ te veranderen. Nadat eerst onder normale omstandigheden 10 à 20 aktiepotentialen bij een prikkelfrekwentie van 1 Hz zijn geregistreerd, wordt bij dezelfde frekwentie aan de doorstromingsvloeistof met een infusie-snelheid van 1 cc/min McEwen-oplossing toegevoegd waarin per liter 8,5 gram KCl is opgelost. Bij de gebruikte doorstromingssnelheid (25 cc/min) wordt hierdoor in het orgaanbakje $|K^+|_e$ geleidelijk verhoogd tot 10 mmol/l. In de meeste preparaten bedraagt de opgetreden daling van de startpotentiaal dan meer dan 10 mV. Wanneer het preparaat relatief ongevoelig blijkt te zijn voor de verhoging van $|K^+|_e$, dan wordt de infusie-snelheid verdubbeld. In alle gevallen wordt hierdoor een startpotentiaal bereikt waarbij geen aktiepotentialen meer kunnen worden opgewekt. Aangezien $|K^+|_e$ in het orgaanbakje slechts langzaam stijgt, vindt de afname van de startpotentiaal en dus van dV/dt max geleidelijk plaats (fig. 13). De aktiveringskurve wordt bepaald door gedurende deze fase van iedere aktiepotentiaal de startpotentiaal en dV/dt max te meten. Na de "kalium-depolarisatie" wordt de infusie-pomp stopgezet. De registratie wordt als succesvol beschouwd, wanneer de startpotentiaal en dV/dt max na het uitwassen van de overmaat KCl weer stijgen tot de uitgangswaarde.

Indien technisch mogelijk, wordt uit dezelfde vezel een frekwentieserie afgeleid. In latere experimenten is getracht om, na het uitwassen van de overmaat KCl, uit dezelfde vezel



Figuur 14. De aktiveringskurve van 6 verschillende vezels.

De vezels van kurve B en C behoren tot hetzelfde preparaat. Kurve E en F zijn eveneens uit één preparaat afgeleid. De prikkelfrekwentie is steeds 1 Hz.

De aktiveringskurve kan van vezel tot vezel verschillen, zelfs binnen hetzelfde preparaat.

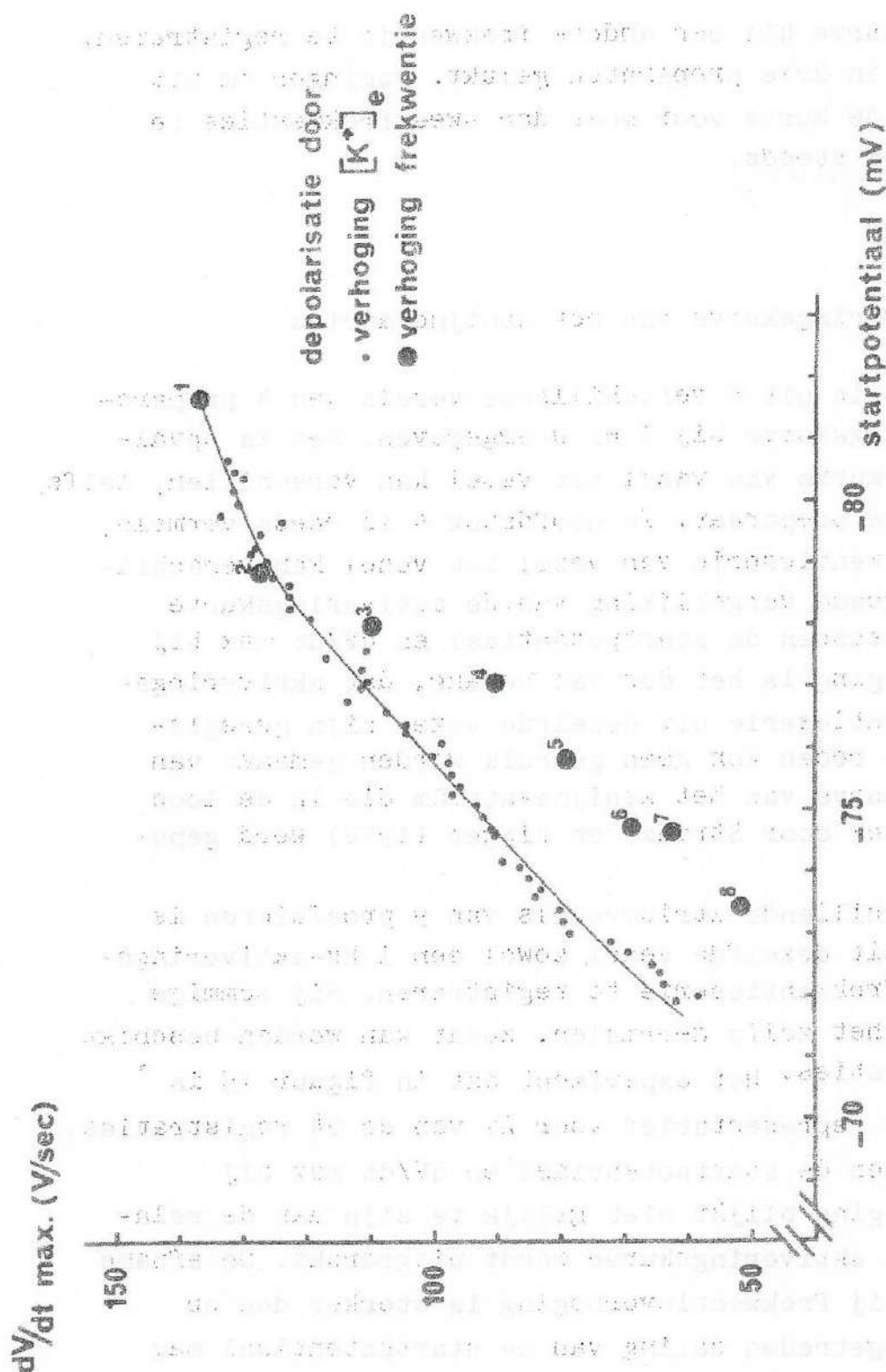
de aktiveringskurve bij een andere frekwentie te registreren. Dit is slechts in drie preparaten gelukt. Pogingen om uit dezelfde vezel de kurve voor meer dan twee frekwenties te bepalen, faalden steeds.

5.3. RESULTATEN

5.3.1. De aktiveringskurve van het konijne-atrium

In figuur 14 is uit 6 verschillende vezels van 4 preparaten de aktiveringskurve bij 1 Hz weergegeven. Het is opvallend, dat deze kurve van vezel tot vezel kan verschillen, zelfs binnen hetzelfde preparaat. In hoofdstuk 4 is reeds vermeld, dat ook de frekwentieserie van vezel tot vezel kan verschillen. Voor een goede vergelijking van de aktiveringskurve met de relatie tussen de startpotentiaal en dV/dt max bij frekwentieverhoging is het dus van belang, dat aktiveringskurve en frekwentieserie uit dezelfde vezel zijn geregistreerd. Om deze reden kon geen gebruik worden gemaakt van de aktiveringskurve van het konijne-atrium die in de loop van ons onderzoek door Strauss en Bigger (1972) werd gepubliceerd.

Uit 15 verschillende atriumvezels van 9 proefdieren is het gelukt om uit dezelfde vezel zowel een 1 Hz-aktiveringskurve als een frekwentieserie te registreren. Bij sommige vezels gelukte het zelfs meermalen, zodat kan worden beschikt over 24 registraties. Het experiment dat in figuur 15 is weergegeven, is representatief voor 21 van de 24 registraties. De relatie tussen de startpotentiaal en dV/dt max bij frekwentieverhoging blijkt niet gelijk te zijn aan de relatie die door de aktiveringskurve wordt uitgedrukt. De afname van dV/dt max bij frekwentieverhoging is sterker dan op grond van de opgetreden daling van de startpotentiaal mag worden verwacht. Bovendien blijkt, dat deze extra-afname van dV/dt max groter is bij hogere frekwenties. Dit is eveneens af te leiden uit tabel 2. Hierin is voor iedere



Figuur 15. De aktiveringskurve bij 1 Hz en de frekwentieserie, geregistreerd uit dezelfde vezel. De getallen geven de frekwentie aan, waarbij het punt van de frekwentieserie is bepaald. De afname van dV/dt max bij frekwentieverhoging is sterker, dan overeenkomt met de opgetreden afname van de startpotentiaal.

Frekw.	Startpot.	dV/dt max		
		frekw. serie	1 Hz-akt.kurve	verschil
1 Hz	-81,7 mV	136 V/sec	136 V/sec	0 V/sec
2	-78,9	126	125	-1
3	-78,0	109	119	10
4	-77,0	90	110	20
5	-75,8	79	100	21
6	-74,8	67	91	24
7	-74,7	62	90	28
8	-73,4	52	78	26

Tabel 2.

De gegevens zijn afkomstig uit het experiment dat in figuur 15 is weergegeven.

In de eerste drie kolommen zijn de gegevens van de afrekwentieserie vermeld. De hoogte van de startpotentiaal bij een bepaalde frekwentie is, evenals die van dV/dt max, het gemiddelde van de waarden, die bij 10 opeenvolgende aktiepotentialen in steady state zijn gemeten. In de vierde kolom is de waarde vermeld, die dV/dt max heeft, wanneer de betrokken startpotentiaal door toename van $|K^+|_e$ is verkregen (bepaald met behulp van de 1 Hz-aktiveringskurve). De vijfde kolom toont het verschil tussen de waarden van dV/dt max uit de vorige twee kolommen.

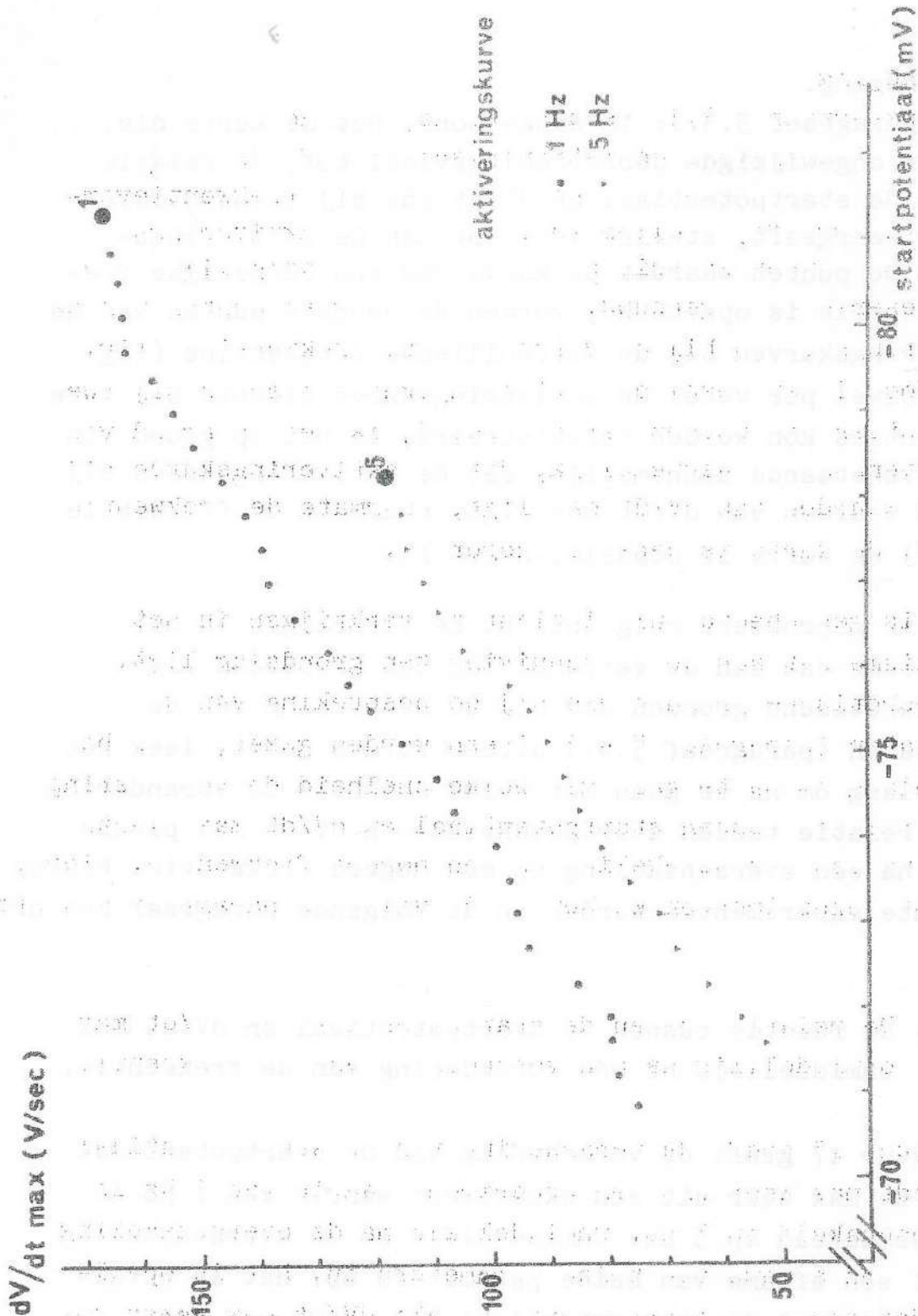
frekwentie de gemeten waarde van dV/dt max vergeleken met de waarde die dV/dt max zou hebben gehad, wanneer de betrokken startpotentiaal niet zou zijn verkregen door frekwentieverhoging, maar door verhoging van $|K^+|_e$.

In 2 van de 24 experimenten werd het tegenovergestelde resultaat gevonden: de afname van dV/dt max bij frekwentieverhoging was minder dan bij een even grote depolarisatie door verhoging van $|K^+|_e$. In 1 experiment waren de veranderingen in de frekwentieserie gelijk aan die in de aktiveringskurve. Een verklaring voor het afwijkend resultaat van deze 3 experimenten kon niet worden gevonden. De aantallen zijn echter van dien aard, dat als algemene regel mag worden gesteld, dat de afname van de startpotentiaal door frekwentieverhoging leidt tot een lagere waarde van dV/dt max dan wanneer de startpotentiaal in dezelfde mate zou zijn afgenomen ten gevolge van een verhoging van $|K^+|_e$ (teken-toets).

De waarde van dV/dt max bij een bepaalde startpotentiaal lijkt dus afhankelijk te zijn van de frekwentie. Op grond hiervan is de verwachting gerechtvaardigd, dat de frekwentie een invloed heeft op de aktiveringskurve. De in de volgende paragraaf beschreven experimenten zullen aantonen, dat dit inderdaad het geval is.

5.3.2. De invloed van de frekwentie op de aktiveringskurve

Zoals vermeld is het slechts drie keer gelukt om uit dezelfde vezel de aktiveringskurve bij twee verschillende frekwenties te bepalen. Figuur 16 toont een van deze experimenten. De aktiveringskurve is weergegeven bij prikkel-frekwenties van 1 Hz en 5 Hz. Door de frekwentieverhoging blijkt, evenals in de overige experimenten, een verschuiving te zijn opgetreden naar lagere waarden van dV/dt max. Voor een willekeurige startpotentiaal geldt, dat dV/dt max bij 1 Hz hoger is dan bij 5 Hz. De richting van de aktiveringskurve blijkt echter niet te zijn veranderd door de frekwen-



Figuur 46. De aktiveringskurve bij 1 Hz en 5 Hz, geregistreerd bij dezelfde vezel.

Bij het hoogste punt van de aktiveringskurve is de doorstromingsvloei-stof nog niet veranderd. Dit punt ligt dus tevens in de kurve van de frekwentieserie.

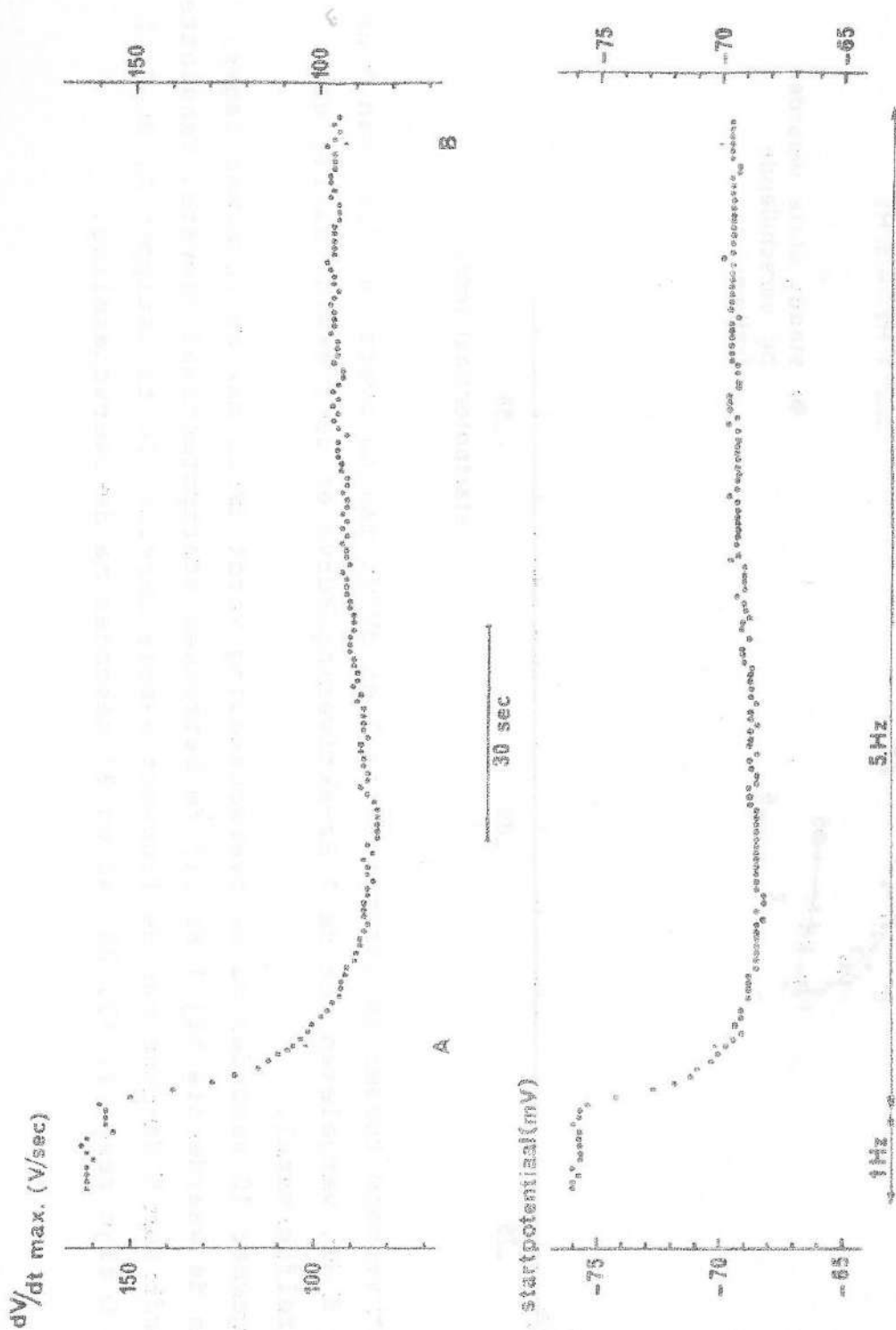
tieverhoging.

In paragraaf 5.3.1. is aangetoond, dat de kurve die, bij een ongewijzigde doorstromingsvloeistof, de relatie tussen de startpotentiaal en dV/dt max bij frekwentieverhoging weergeeft, steiler verloopt dan de aktiveringskurve. De punten waaruit de kurve van een dergelijke frekwentieserie is opgebouwd, vormen de hoogste punten van de aktiveringskurven bij de verschillende frekwenties (fig. 16). Hoewel per vezel de aktiveringskurve slechts bij twee frekwenties kon worden geregistreerd, is het op grond van het bovenstaande aannemelijk, dat de aktiveringskurve bij lagere waarden van dV/dt max ligt, naarmate de frekwentie waarbij de kurve is bepaald, hoger is.

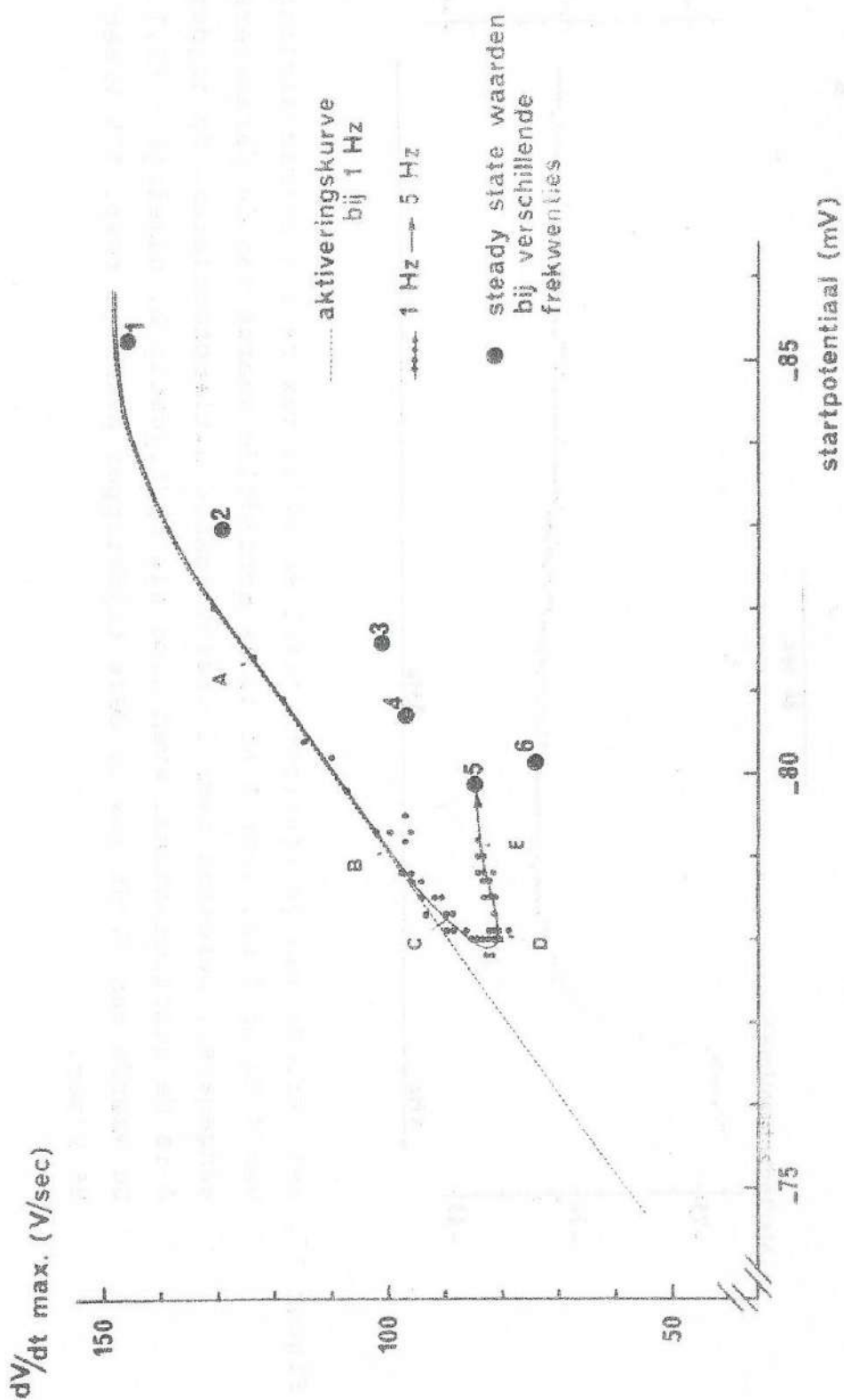
Er is geprobeerd enig inzicht te verkrijgen in het mechanisme dat aan de verschuiving ten grondslag ligt. Op theoretische gronden die bij de bespreking van de resultaten (paragraaf 5.4.) uiteen worden gezet, leek het van belang om na te gaan met welke snelheid de verandering in de relatie tussen startpotentiaal en dV/dt max plaats vindt na een overschakeling op een hogere frekwentie. Hierop gerichte experimenten worden in de volgende paragraaf beschreven.

5.3.3. De relatie tussen de startpotentiaal en dV/dt max onmiddellijk na een verandering van de frekwentie.

Figuur 17 geeft de verandering van de startpotentiaal en dV/dt max weer uit een experiment waarin van 1 Hz is overgeschakeld op 5 Hz. Onmiddellijk na de overschakeling treedt een afname van beide parameters op. Het is opvallend dat zowel de startpotentiaal als dV/dt max eerst tot een zeker minimum dalen, vervolgens weer enigszins toenemen en na ongeveer 2 minuten de steady state waarde bereiken die bij de nieuwe frekwentie behoort. Toch blijkt de verandering van de startpotentiaal in de tijd iets anders te verlopen dan die van dV/dt max. De startpotentiaal heeft op



Figuur 17. Het verloop van de startpotentiaal en dV/dt max na een overschakeling van 1 Hz op 5 Hz. Voor 5 Hz is de gemiddelde waarde van de parameters aangegeven, berekend over 5 opeenvolgende actiepotentialen. Op tijdstip A is de startpotentiaal even hoog als op tijdstip B, namelijk - 69,7 mV. De waarde van dV/dt max op deze tijdstippen bedraagt resp. 105 V/sec en 96 V/sec.



Figuur 13. Het verband tussen de startpotentiaal en $dV/dt \text{ max}$ na overschakeling van 1 Hz op 5 Hz, vergeleken met de 1 Hz-aktiveringskurve en de frekwentieserie uit dezelfde vezel. Ongeveer 10 seconden na de overschakeling wordt $dV/dt \text{ max}$ aantoonbaar lager, dan de waarde die bij 1 Hz bij de betrokken startpotentiaal heerst. Tenslotte wordt het 5 Hz-punt van de frekwentieserie bereikt. De tijdstippen A, B, C, D en E zijn resp. 2, 10, 25, 40 en 90 seconden na de overschakeling.

de tijdstippen A en B (resp. 7 sekonden en 2 minuten na de overschakeling op 5 Hz) dezelfde hoogte. Op tijdstip A is de waarde van dV/dt max echter duidelijk hoger dan op tijdstip B. In de periode tussen A en B heeft de relatie tussen startpotentiaal en dV/dt max dus een verandering ondergaan. Gezien het verloop van beide parameters in de tijd lijkt het aannemelijk, dat deze verandering zich geleidelijk heeft voltrokken.

Zekerheid hierover wordt verkregen, wanneer de waarden van de startpotentiaal en van de bijbehorende dV/dt max die zijn gemeten na de overschakeling van 1 Hz op 5 Hz, worden vergeleken met de aktiveringskurve bij de eerste frekwentie.

Een experiment waarin het is gelukt om uit dezelfde vezel behalve een frekwentieserie en een 1 Hz-aktiveringskurve ook een overschakeling van 1 Hz naar 5 Hz te registreren, wordt weergegeven in figuur 18. De frekwentieserie en de aktiveringskurve vertonen het inmiddels bekende beeld. Het verloop van de punten die de relatie tussen de startpotentiaal en dV/dt max na de overschakeling van 1 Hz op 5 Hz weergeven, is verduidelijkt met een pijl. Na de overschakeling blijkt dV/dt max eerst gedurende enige tijd (ongeveer 10 sekonden) op het afnemen van de startpotentiaal te reageren volgens het verband dat bij de voorafgaande frekwentie heeft bestaan. Geleidelijk echter gaat de startpotentiaal- dV/dt max-relatie afbuigen van de 1 Hz-aktiveringskurve.

Hoe meer tijd na de overschakeling verstrijkt, hoe groter het verschil in dV/dt max wordt met de 1 Hz-aktiveringskurve, wanneer aktiepotentialen met dezelfde startpotentiaal met elkaar worden vergeleken. Tenslotte wordt geleidelijk het punt bereikt, dat reeds door de frekwentieserie als steady state waarde bij 5 Hz was aangegeven.

De verandering die in de relatie tussen de startpotentiaal en dV/dt max optreedt bij frekwentieverhoging, voltrekt zich dus geleidelijk. Er ligt klaarblijkelijk een relatief traag proces aan ten grondslag.

5.4. BESPREKING VAN DE RESULTATEN

5.4.1. De invloed van de frekwentie op dV/dt max

Een daling van dV/dt max kan worden veroorzaakt door een minder sterke toename van g_{Na} gedurende de depolarisatiefase, door een afname van de concentratiegradient voor natrium-ionen, of door een combinatie van beide factoren.

In paragraaf 5.3.1. zijn experimenten beschreven die aantonen, dat een afname van de startpotentiaal ook in het konijne-atrium leidt tot een daling van dV/dt max als gevolg van de invloed op g_{Na} . Verdere experimenten tonen aan, dat de aktiveringskurve bij frekwentieverhoging verschuift naar lagere waarden van dV/dt max. Bij een bepaalde waarde van de startpotentiaal blijkt dV/dt max lager te zijn, naarmate de prikkelfrekwentie hoger is. De verklaring hiervoor kan zijn, dat bij frekwentieverhoging g_{Na} sterker wordt beïnvloed dan overeenkomt met de hoogte van de startpotentiaal. Een tweede mogelijkheid is, dat bij frekwentieverhoging een afname van de electrochemische gradient voor natrium-ionen optreedt. Beide mogelijkheden worden hieronder besproken.

5.4.2. De invloed van de frekwentie op g_{Na}

Een minder sterke toename van g_{Na} na supraliminale prikkeling dan overeenkomt met de hoogte van de startpotentiaal, kan worden verwacht, wanneer wordt gestimuleerd op een moment dat de carrier-reaktivatie nog niet volledig is. Het is denkbaar, dat bij frekwentieverhoging deze tijdsafhankelijkheid van de carrier-aktivatie een rol van betekenis gaat spelen. Er zijn weefsels bekend waarin de reaktivatie traag verloopt, zoals kikker-atrium (Haas et al, 1971) en nodaal weefsel van zoogdierenharten (Meredith et al, 1968; Strauss en Bigger, 1972). De reaktivatie van Purkinje-vezels en myocardvezels van zoogdieren daarentegen is een zeer snel proces. Weidmann (1955 a) hield de membraan

van Purkinje-vezels enige tijd op -66 mV, waarna plotse-
 ling een ander potentiaalniveau werd opgedrongen. Uit
 dV/dt max van de actiepotentialen die bij dit laatste
 niveau na een variabel interval werden opgewekt, kon wor-
 den berekend, dat de tijdconstante van de reaktivatie
 minder dan 20 msec. bedroeg. Strauss en Bigger (1972)
 vonden in het konijne-atrium, dat, bij een basisritme van
 2 Hz, dV/dt max van een extrasystole pas aantoonbaar lager
 was dan die van een basis-actiepotentiaal, wanneer de duur
 van het verkorte interval 200 msec. of minder bedroeg. Dit
 is te verwachten, aangezien de door ons aangetoonde toename
 van de membraanpotentiaal na de eigenlijke repolarisatie-
 fase slechts langzaam plaats vindt. Bovendien is de invloed
 van de startpotentiaal op dV/dt max relatief gering, wan-
 neer de waarde van de startpotentiaal hoog is. Strauss
 en Bigger (1972) concludeerde uit hun waarneming, dat de
 volledige reaktivatie bij benadering samen-viel met het einde
 van de repolarisatiefase (zie ook: Hoffman en Cranefield,
 1960). De auteurs vergeleken tevens twee methoden om de
 aktiveringskurve te bepalen: verhoging van $|K^+|_e$ en opwekken
 van extrasystolen met wisselend voorafgaand interval. De
 gelijkvormigheid van beide kurven werd beschouwd als een
 bevestiging voor het bestaan van een snelle reaktivatie.
 Aangezien de beide methoden niet in dezelfde vezel zijn
 vergeleken, is het trekken van deze conclusie aanvechtbaar.

De duur van de effectief refraktaire periode neemt af
 bij frekwentieverhoging (voor overzicht, zie Janse, 1971),
 hetgeen een aanwijzing vormt, dat ook bij hogere frekwenties
 na een inaktivatie weer snel natrium-carriers beschikbaar
 komen. Het is echter niet bekend, of de tijdconstante van
 de reaktivatie door de prikkelfrekwentie wordt beïnvloed.
 Hierdoor kan niet worden uitgesloten, dat de waarde van
 dV/dt max bij hogere frekwenties wordt beïnvloed door een
 onvolledige reaktivatie van natrium-carriers. De waarneming
 dat ook bij relatief lage frekwenties een frekwentie-toename
 leidt tot een lagere waarde van dV/dt max dan overeenkomt
 met de hoogte van de startpotentiaal, maakt het echter
 niet aannemelijk, dat een onvolledige reaktivatie een rol

van betekenis speelt.

Uit een onderzoek van Reuter et al (1972) in papillairspieren van de cavia bestaat de indruk, dat de tijdkonstante van de carrier-reaktivatie toeneemt, wanneer de startpotentiaal daalt. Zij berekenden uit dV/dt max van extrasystolen, dat deze tijdkonstante bij de heersende startpotentiaal (-85 mV) minder dan 20 msec. bedroeg. Nadat de startpotentiaal door toevoeging van KCl was gedaald tot -60 mV, bleek de tijdkonstante tot ongeveer 100 msec. te zijn toegenomen. Er werden geen metingen bij een tussenliggend potentiaal-niveau vermeld, zodat over een verloop van de reaktivatiesnelheid als functie van de startpotentiaal geen uitspraak kon worden gedaan. Het geringe aantal gegevens maakt het bestaan van een potentiaal-afhankelijkheid van de reaktivatie enigszins onzeker. Wanneer dit fenomeen in het konijnatrium een rol zou spelen en de natrium-carriers tijdens het verhogen van $[K^+]_e$ bij 5 Hz in afnemende mate beschikbaar zouden zijn op het moment van stimuleren, dan zou de 5 Hz-aktiveringskurve steiler moeten verlopen dan de kurve bij 1 Hz, waarbij van een onvoldoende reaktivatie geen sprake kan zijn. Figuur 16 toont, dat dit niet het geval is.

Op grond van het voorafgaande is het aannemelijk, dat verhoging van de prikkelfrekwentie geen afname van g_{Na} veroorzaakt, anders dan door de optredende verandering van de startpotentiaal. De oorzaak van de verschuiving van de aktiveringskurve door frekwentieverhoging moet dus worden gezocht in een verandering van de electrochemische gradient voor natrium-ionen.

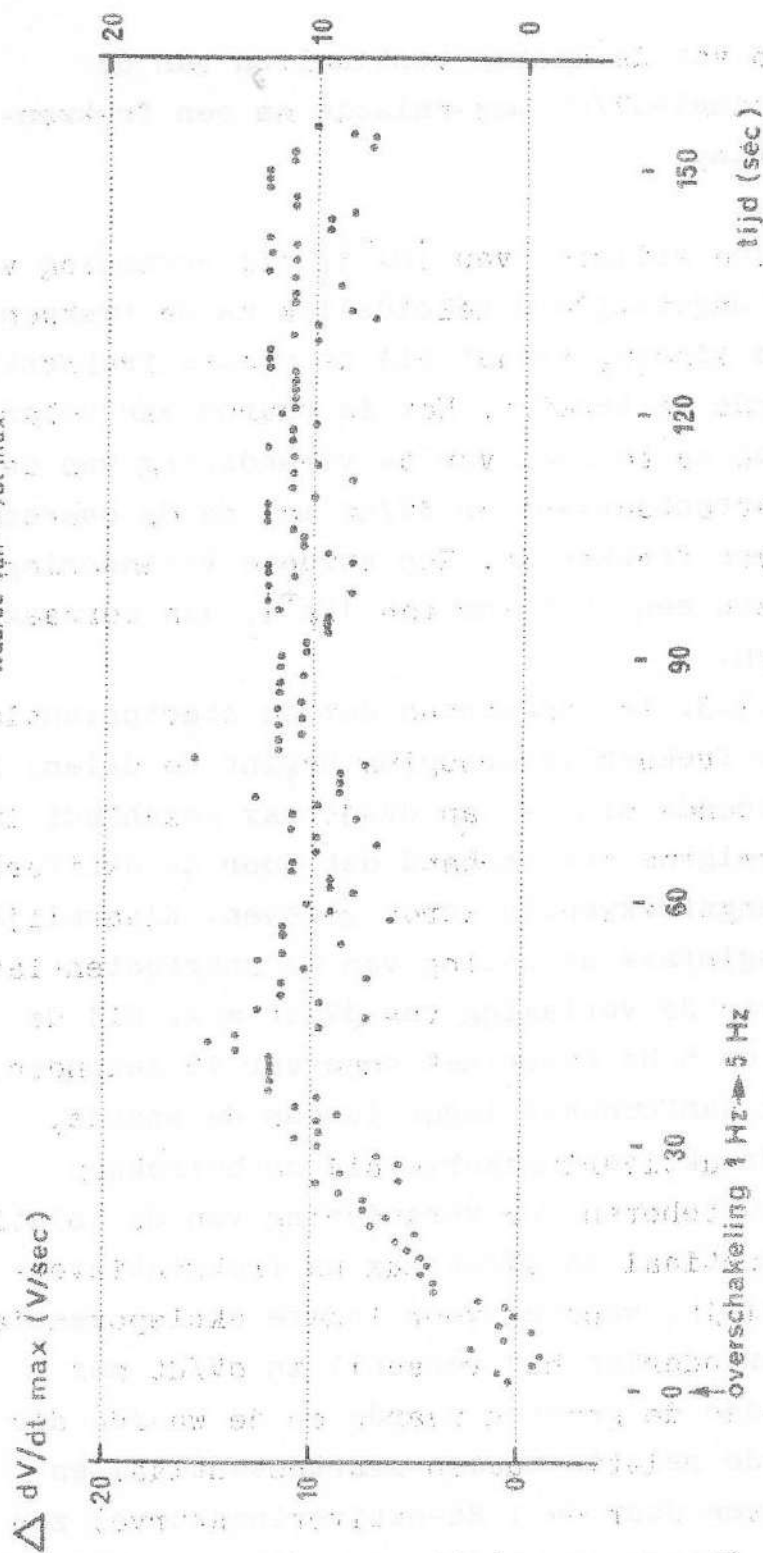
5.4.3. De invloed van de frekwentie op de concentratiegradient van de natrium-ionen.

Er bestaan aanwijzingen, dat het intracellulaire natriumgehalte verandert bij frekwentieverhoging. Reiter (1956) toonde in strips van de ratte-ventrikel aan, dat $[K^+]_i$ lager werd en $[Na^+]_i$ toenam vanaf het moment, dat het preparaat in de doorstromingsvloeistof was gebracht. Na enige tijd bereikte de concentraties een konstante waarde.

Wanneer met 10 Hz was gestimuleerd, dan was $[K^+]_i$ lager en $[Na^+]_i$ hoger dan in het geval van 1 Hz. Conn en Wood (1959) bepaalde $[Na^+]_i$ in honden-harten met behulp van natrium-isotopen. In het traject van 50 tot 160 slagen per minuut bleek een positieve correlatie te bestaan tussen $[Na^+]_i$ en de frekwentie. De waarde van $[Na^+]_i$ varieerde van 7,5 tot 19,0 mmol/l. Het bij frekwentieverhoging optredende kaliumverlies (Langer en Brady, 1966; Gilmore en Gerlings, 1969) maakt eveneens een toename van $[Na^+]_i$ waarschijnlijk, aangezien de kalium-influx althans gedeeltelijk is gekoppeld aan de natrium-efflux. Volgens het pump lag model van Langer en Brady (zie hoofdstuk 4) is de intracellulaire natrium-ophoping zelfs de oorzaak van de grotere aktiviteit van de Na/K-pomp die bij hogere frekwenties noodzakelijk is. Viersma (1969) kwam na berekeningen met gegevens van Noble (1960) en Langer (1967) tot de slotsom, dat na een frekwentieverhoging de toename van de natrium-influx per tijdseenheid voldoende groot kon zijn om de vereiste verhoging van $[Na^+]_i$ te bewerkstelligen. Hierbij werd verondersteld, dat de aktiviteit van de Na/K-pomp evenals in kikkerskeletspier (Keynes en Swan, 1959 a) evenredig was met de derde macht van $[Na^+]_i$.

Uit literatuurgegevens kan worden afgeleid, dat de aktiveringskurve door een stijging van $[Na^+]_i$ in dezelfde richting wordt verschoven als het geval is bij frekwentieverhoging: naar lagere waarden van dV/dt max. Zo is in reuzen-axonen die intracellulair werden geperfundeerd, aangetoond dat bij een vervanging van 25% van het intracellulaire kalium door natrium-ionen de startpotentiaal niet waarneembaar verandert, terwijl dV/dt max duidelijk afneemt (Baker et al, 1962 a, fig. 3). Vanzelfsprekend is een dergelijke perfusie in myocardvezels niet uitvoerbaar. In dit weefsel kan $[Na^+]_i$ slechts op indirekte wijze worden verhoogd, bijvoorbeeld door het remmen van de Na/K-pomp met behulp van ouabaine (Carlslake en Weatherall, 1962). Onder deze omstandigheden treedt eveneens de verwachte verschuiving van de aktiveringskurve op (Dudel en Trautwein, 1958; Kassebaum, 1963).

$\Delta \frac{dV}{dt} \text{ max}$ = verschil tussen de berekende waarde
(m.b.v. 1 Hz-aktiveringskurve) en de gemeten
waarde van $\frac{dV}{dt} \text{ max}$



Figuur 19. De verandering van de relatie tussen de startpotentiaal en $\frac{dV}{dt} \text{ max}$ na overschakeling van 1 Hz op 5 Hz.

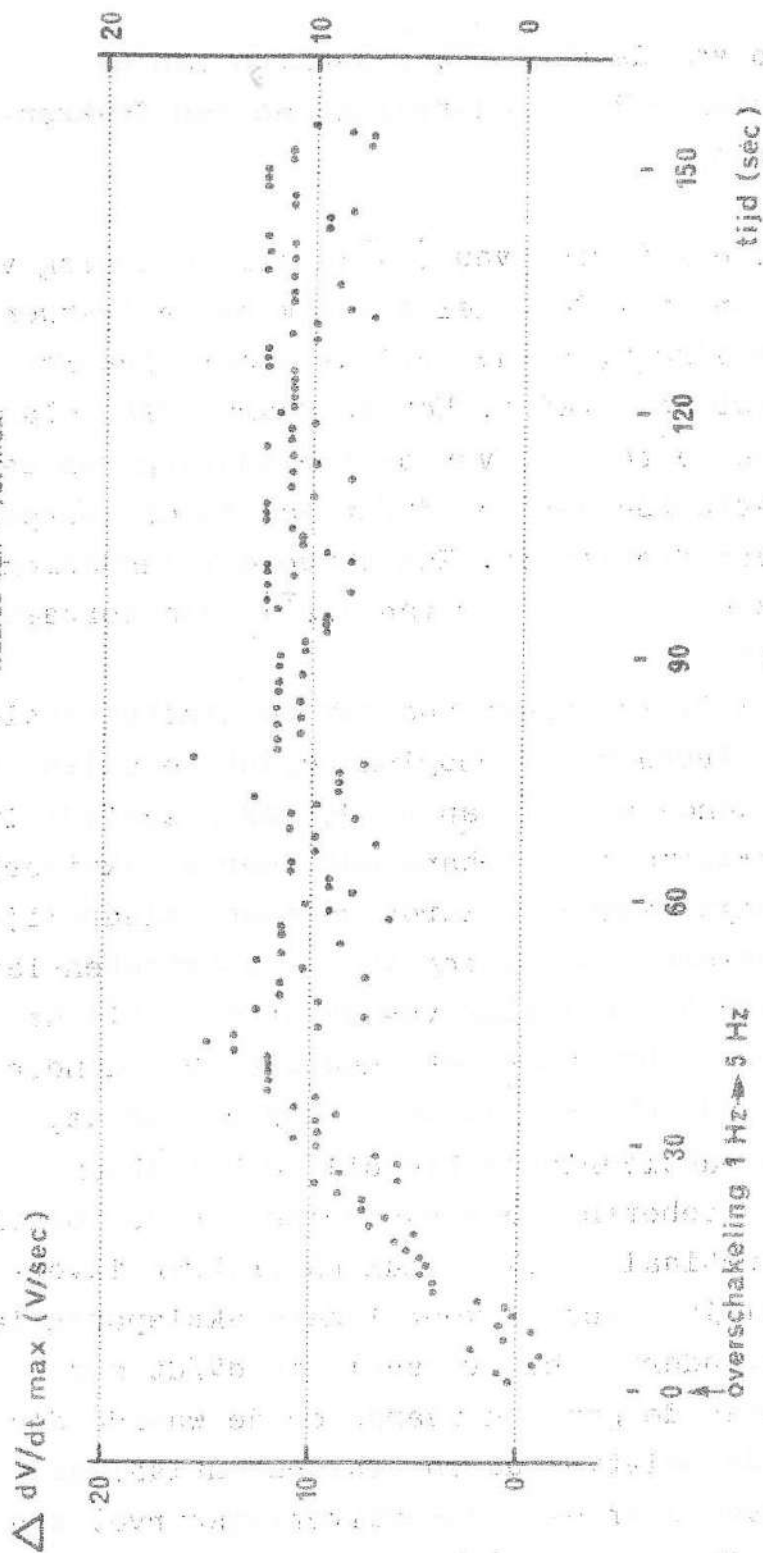
Voor iedere aktiepotentiaal na de overschakeling op 5 Hz is het verschil berekend tussen de werkelijke waarde van $\frac{dV}{dt} \text{ max}$ en de waarde, die zou zijn gemeten, wanneer de betrokken startpotentiaal had geheerst bij 1 Hz (af te leiden uit de 1 Hz-aktiveringskurve): $\Delta \frac{dV}{dt} \text{ max}$. Ieder punt is de gemiddelde waarde van 5 opeenvolgende aktiepotentialen. De waarden zijn berekend uit het experiment, dat in figuur 17 is weergegeven.

5.4.4. Het verloop van de startpotentiaal en van de startpotentiaal-dV/dt max-relatie na een frekwentieverandering

De veronderstelde stijging van $[Na^+]_i$ bij verhoging van de frekwentie zal ongetwijfeld geleidelijk na de frekwentieverandering plaats vinden, totdat bij de nieuwe frekwentie een konstante waarde is bereikt. Het is daarom van belang om het tijdsverloop na te gaan van de verandering van de relatie tussen startpotentiaal en dV/dt max na de overschakeling op een hogere frekwentie. Een abrupte verandering van deze relatie zou een stijging van $[Na^+]_i$ als oorzaak nagenoeg uitsluiten.

In paragraaf 5.3.3. is aangetoond dat de startpotentiaal onmiddellijk na de frekwentieverhoging begint te dalen. De gelijktijdig optredende afname van dV/dt max geschiedt in eerste instantie volgens het verband dat door de aktiveringskurve van de uitgangsfrekwentie wordt gegeven. Klaarblijkelijk is in deze beginfase de daling van de startpotentiaal de enige oorzaak van de verlaging van dV/dt max. Bij de overgang van 1 Hz op 5 Hz duurt het ongeveer 10 sekonden, alvorens dV/dt max aantoonbaar lager is dan de waarde, die volgens de 1 Hz-aktiveringskurve bij de betrokken startpotentiaal zou behoren. De verandering van de relatie tussen de startpotentiaal en dV/dt max na frekwentieverhoging wordt duidelijk, wanneer voor iedere aktiepotentiaal na de frekwentieverandering het verschil in dV/dt max wordt berekend tussen de gemeten waarde en de waarde die bij een onveranderde relatie tussen startpotentiaal en dV/dt max (aangegeven door de 1 Hz-aktiveringskurve) zou zijn gevonden. Uit figuur 19 blijkt, dat dit verschil geleidelijk groter wordt, totdat een konstante waarde wordt bereikt. Na de frekwentieverhoging vindt de verandering in de relatie tussen startpotentiaal en dV/dt max dus geleidelijk plaats. Dit is in overeenstemming met de veronderstelde toename van $[Na^+]_i$ bij frekwentieverhoging.

$\Delta \frac{dV}{dt} \text{ max} = \text{verschil tussen de berekende waarde}$
 (m.b.v. 1 Hz-aktiveringskurve) en de gemeten
 waarde van $\frac{dV}{dt} \text{ max}$



Figuur 19. De verandering van de relatie tussen de startpotentiaal en $\frac{dV}{dt} \text{ max}$ na overschakeling van 1 Hz op 5 Hz.

Voor iedere aktiepotentiaal na de overschakeling op 5 Hz is het verschil berekend tussen de werkelijke waarde van $\frac{dV}{dt} \text{ max}$ en de waarde, die zou zijn gemeten, wanneer de betrokken startpotentiaal had geheerst bij 1 Hz (af te leiden uit de 1 Hz-aktiveringskurve): $\Delta \frac{dV}{dt} \text{ max}$. Ieder punt is de gemiddelde waarde van 5 opeenvolgende aktiepotentialen. De waarden zijn berekend uit het experiment, dat in figuur 17 is weergegeven.

Tenslotte moet worden ingegaan op de waarneming dat de startpotentiaal na de frekwentieverhoging eerst daalt en vervolgens weer langzaam toeneemt om uiteindelijk de waarde te bereiken, die in steady state bij de betrokken frekwentie heerst. Volgens de hypothese wordt in de verandering van de relatie tussen startpotentiaal en $dV/dt \max$ na frekwentieverhoging in feite de verandering van $[Na^+]_i$ weerspiegeld. Het bifasische verloop van de startpotentiaal is niet in deze verandering terug te vinden (fig. 19). Klaarblijkelijk wordt de lichte stijging, die de startpotentiaal na enige tijd weer ondergaat, niet begeleid door een afname van $[Na^+]_i$. Dit maakt onwaarschijnlijk, dat er een toename van $[K^+]_i$ aan ten grondslag ligt. Het verloop van de startpotentiaal kan evenwel goed worden verklaard door een elektrogene werking van de Na/K-pomp. Aangezien na een frekwentieverhoging de pompaktiviteit slechts langzaam wordt verhoogd, zal de toename van het elektrogene effect pas geleidelijk merkbaar worden. Op een gegeven moment is de invloed op de startpotentiaal van het toenemende elektrogene effect even groot als van de factoren die een afname van de startpotentiaal veroorzaken. Vanaf dit moment zal de startpotentiaal hoger worden, zolang de pomp-aktiviteit blijft stijgen, m.a.w. totdat een steady state is bereikt.

5.5. CONCLUSIES

De aktiveringskurve verschuift bij verhoging van de prikkelfrekwentie naar lagere waarden van $dV/dt \max$. Aan deze verschuiving ligt een relatief traag proces ten grondslag. Dit is in overeenstemming met de hypothese, dat de verschuiving wordt veroorzaakt door een bij frekwentieverhoging optredende toename van $[Na^+]_i$.

De afname van $dV/dt \max$ bij verhoging van de frekwentie wordt gedeeltelijk veroorzaakt door de daling van de startpotentiaal en gedeeltelijk door de genoemde verschuiving van de aktiveringskurve.

Het verloop van de startpotentiaal na een frekwentie-

HOOFDSTUK 6

PRIKKELFREKVENTIE EN DE INVLOED VAN OUABAINEN OP DE AKTIEPOTENTIAL

6.1. INLEIDING

De lagere steady state waarde van dV/dt max bij hogere frekventies is het gevolg van de verandering van de startpotentiaal en de verschuiving van de aktiveringskurve. Er is verondersteld, dat hierbij een belangrijke rol wordt gespeeld door resp. een afname van $|K^+|_i$ en een stijging van $|Na^+|_i$. Deze veronderstelling zou worden gesteund, wanneer remmen van de Na/K-pomp dezelfde verandering van de startpotentiaal en dV/dt max zou veroorzaken als frekwentieverhoging. Vermindering van de aktiviteit van de Na/K-pomp, bijvoorbeeld door anoxie of door toevoeging van ouabaine, leidt immers tot een afname van $|K^+|_i$ en een stijging van $|Na^+|_i$. Er is daarom getracht het effect van ouabaine op de startpotentiaal en dV/dt max na te gaan bij verschillende frekventies. Door de positief inotrope werking van ouabaine verliest de mikroelektrode vaak de goede intracellulaire positie. Om deze reden is het slechts 4 maal gelukt om uit dezelfde vezel zowel een frekwentieserie te registreren onder normale omstandigheden als een in aanwezigheid van ouabaine. De vraagstelling van de experimenten luidde:

In welke mate heeft ouabaine invloed op de startpotentiaal en dV/dt max? Steunen deze resultaten de veronderstelling, dat bij frekwentieverhoging een afname van $|K^+|_i$ en een stijging van $|Na^+|_i$ ten grondslag liggen aan de daling van dV/dt max?

6.2. EXPERIMENTELE PROCEDURE

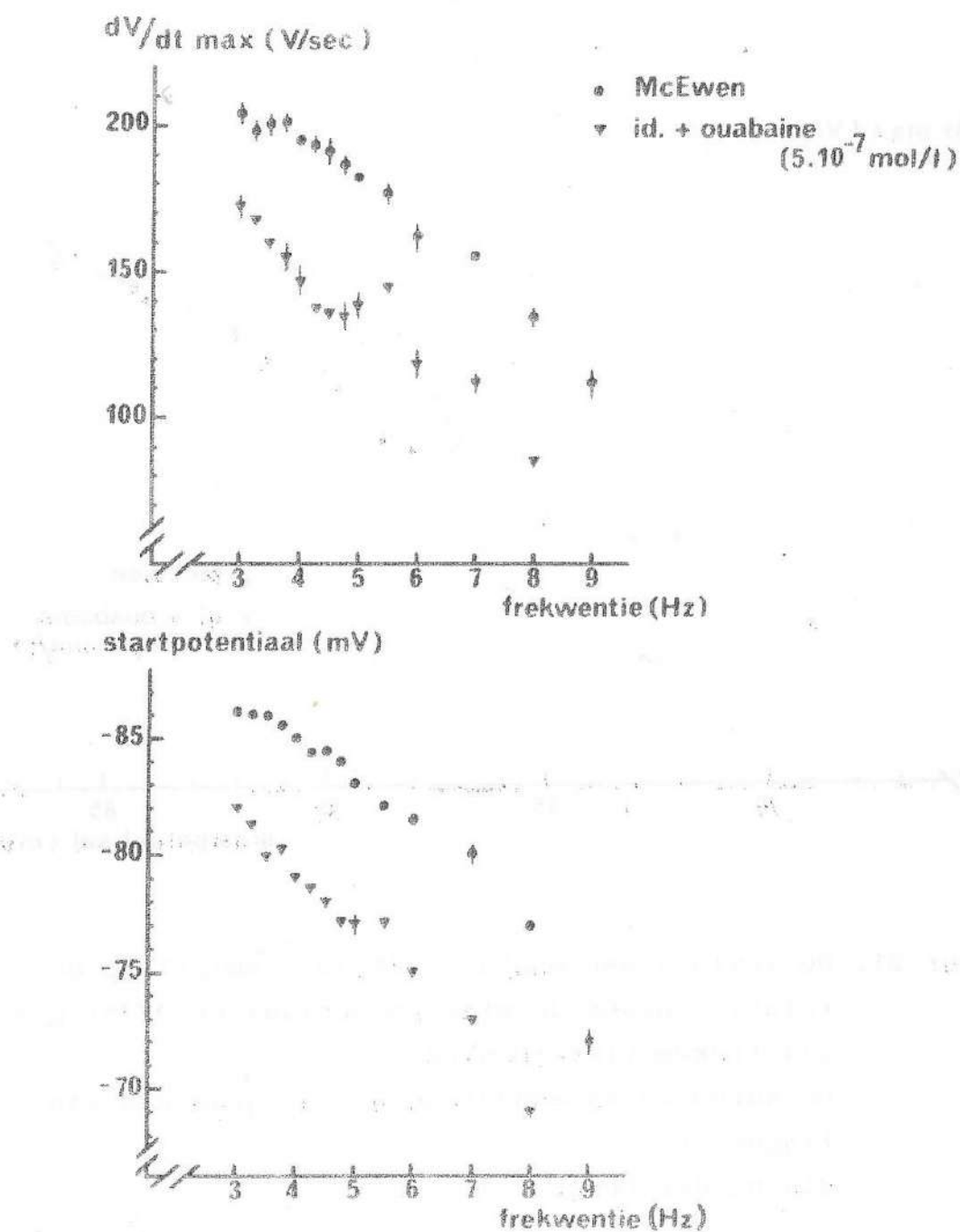
De experimenten met ouabaine werden verricht in een stadium van het onderzoek, waarin de crista terminalis van het rechter hartoor als preparaat werd gebruikt. Door de aanwezigheid van de sino-auriculaire knoop waren frequenties lager dan 3 Hz zelden mogelijk. De meting van de membraanpotentiaal vond plaats tussen mikroelektrode en gechlореerd zilverplaatje. De berekening van dV/dt max geschiedde op de door Viersma (1969) beschreven wijze.

Na het registreren van een frekwentieserie werd met behulp van de infusie-pomp een zodanige oplossing van ouabaine (Strophantine-G, firma: British Drug Houses) toegevoegd, dat de uiteindelijk concentratie in het orgaanbakje $5 \cdot 10^{-7}$ mol/l bedroeg. Tenminste 15 minuten na het begin van de ouabaine-toevoeging werd dan uit dezelfde vezel opnieuw een frekwentieserie geregistreerd. Na uitwassen bleek het effect van ouabaine in alle gevallen reversibel.

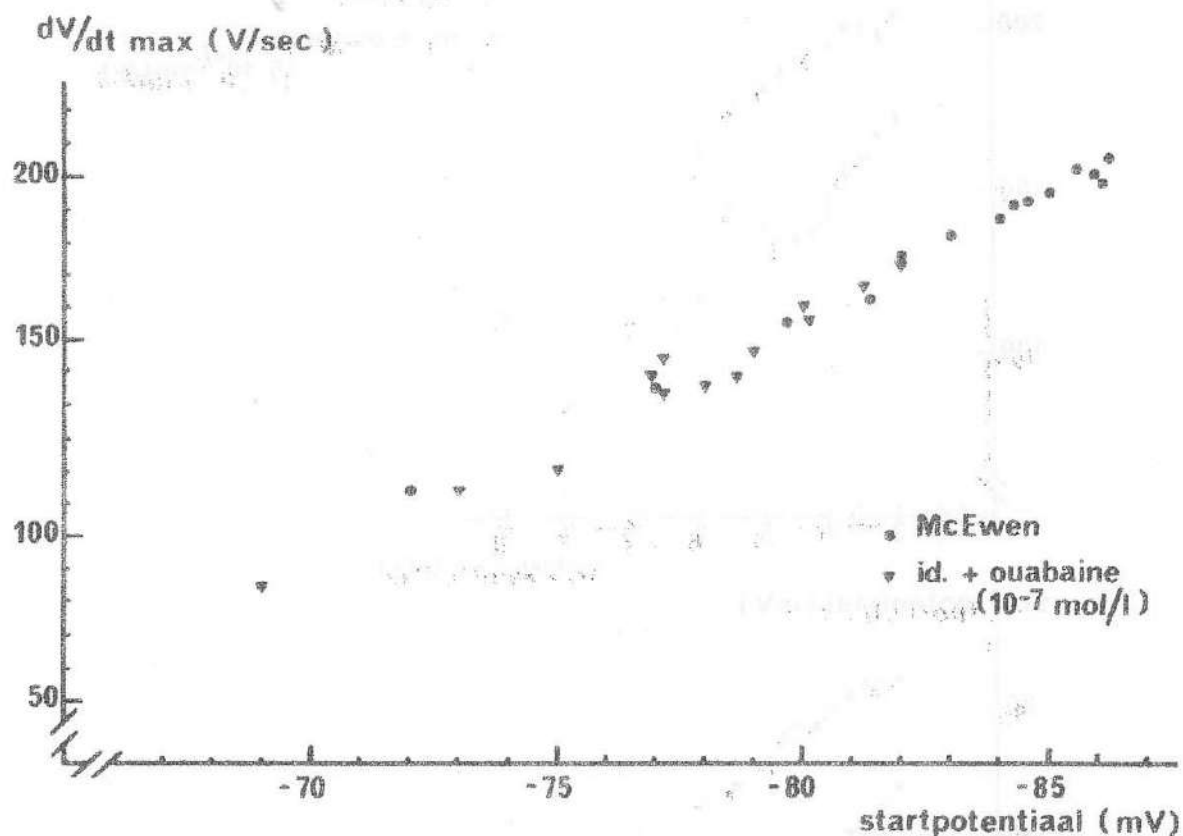
6.3. RESULTATEN

In alle experimenten werd tijdens de toediening van ouabaine een versnelling van de repolarisatie waargenomen. In een aantal gevallen traden spontane extrasystolen op. Beide fenomenen waren in de literatuur bekend en golden tijdens de experimenten als een aanwijzing, dat het ouabaine werkzaam was.

In figuur 20 is uit dezelfde vezel de invloed van de frekwentie op dV/dt max en op de startpotentiaal weergegeven onder normale omstandigheden en in aanwezigheid van ouabaine. Het blijkt dat ouabaine bij iedere frekwentie zowel de waarde van de startpotentiaal als van dV/dt max verlaagt. Dit effect is in alle 4 experimenten waargenomen. De invloed van ouabaine op dV/dt max komt overeen met de bevindingen van Viersma (1969). De vraag rijst, of de verandering



Figuur 20. De invloed van ouabaine ($5 \cdot 10^{-7}$ mol/l) op het effect van de frekwentie op $dV/dt \text{ max}$ (A) en de startpotentiaal (B). De waarden zijn gemiddelden van 10 opeenvolgende actiepotentialen in steady state ($\pm$ SEM).



Figuur 21. De invloed van ouabaine ($5 \cdot 10^{-7}$ mol/l) op de relatie tussen de startpotentiaal en dV/dt max bij frekwentieverhoging.

De kurve is samengesteld uit de gegevens van figuur 20.

Zie verder tekst.

van de startpotentiaal door ouabaine groot genoeg is om de lagere waarde van dV/dt max te verklaren. Uit figuur 21, waarin de gegevens van het experiment in figuur 20 zijn verwerkt, blijkt dat de relatie die bij frekwentieverhoging tussen startpotentiaal en dV/dt max bestaat, onder invloed van ouabaine niet verandert. Een bepaalde startpotentiaal leidt tot een vaste waarde van dV/dt max. In aanwezigheid van ouabaine wordt de betrokken startpotentiaal echter bij een minder hoge frekwentie bereikt (fig. 20 B).

6.4. BESPREKING VAN DE RESULTATEN

6.4.1. Literatuur: de werking van hartglycosiden

De concentraties van hartglycosiden worden in twee groepen verdeeld. Beide groepen veroorzaken een toename van de kontraktkracht, maar in tegenstelling tot de "therapeutische" concentraties treedt bij de "toxische" concentraties een daling van de startpotentiaal op en ontstaan er spontane extrasystolen of andere ritme-stoornissen. Er bestaan tegenstrijdige gegevens over een eventuele verandering van $[K^+]_i$ bij de therapeutische glycosideconcentraties. Het wordt echter in de literatuur als zeker aangenomen, dat de toxische concentraties leiden tot een verlies van intracellulair kalium. Ook in het konijnatrium zijn hierover verschillende onderzoeken bekend. Metingen van Holland (1964) wijzen uit, dat 10^{-6} mol/l ouabaine in dit preparaat een daling van $[K^+]_i$ veroorzaakt van ongeveer 10 mmol/l. Carlslake en Weatherall (1962) vermelden, dat $[K^+]_i$ na toevoeging van 10^{-5} mol/l ouabaine afneemt van 100,9 mmol/l tot 77,0 mmol/l. Witt en Tuttle (1960) en Tuttle et al (1962) komen, eveneens in het konijnatrium, tot gelijksoortige bevindingen. De afname van $[K^+]_i$ onder invloed van ouabaine wordt veroorzaakt door een vermindering van de kalium-influx ten gevolge van een remming van de Na/K-pomp (Rayner en Weatherall, 1957;

Müller, 1963; Goerke en Page, 1965; Polimeni en Vasalle, 1971). Deze remming van de Na/K-pomp geschiedt aan de buitenzijde van de velmembraan (Caldwell, 1968), waarschijnlijk door competitie met kalium-ionen (Skou, 1965). Door verhoging van $|K^+|_i$ wordt namelijk het effect van ouabaine op de hartspier verminderd (zie bijvoorbeeld: Fisch et al, 1959; Vasalle et al, 1962; Haustein, 1973).

De afname van $|K^+|_i$, die door vele onderzoekers is aangetoond na toevoeging van hartglycosiden, wekt de verwachting, dat $|Na^+|_i$ is toegenomen. Reiter (1956) toonde in ratte-ventrikel een geringe stijging van $|Na^+|_i$, namelijk 4 à 5 mmol/l, aan na toevoeging van $3,3 \cdot 10^{-5}$ mol/l ouabaine. Verhoging van de ouabaine-concentratie leidde tot verdere toename van $|Na^+|_i$. Carlslake en Weatherall (1962) berekenden in konijne-atria, dat $|Na^+|_i$ na toevoeging van 10^{-5} mol/l ouabaine was toegenomen van 39,5 mmol/l tot 71,5 mmol/l. Klaus et al (1962) zijn van mening, dat de afname van $|K^+|_i$ en de stijging van $|Na^+|_i$ slechts bij toxische concentraties plaats vinden. Zoals in paragraaf 6.3. is vermeld, heeft $5 \cdot 10^{-7}$ mol/l ouabaine in konijne-atrium een afname van de startpotentiaal tot gevolg. Ook zijn enige malen spontane extrasystolen opgetreden. De gebruikte concentratie is dus "toxisch" volgens de genoemde criteria. De effecten zijn echter volledig reversibel.

Op grond van het voorafgaande en van de mededeling van Glynn (1964), dat in de meeste weefsels een 50% remming van de Na/K-pomp wordt bereikt bij ouabaine-concentraties tussen 10^{-7} en 10^{-6} mol/l, lijkt de gebruikte concentratie hoog genoeg om een daling van $|K^+|_i$ en een stijging van $|Na^+|_i$ te bewerkstelligen.

Het is mogelijk dat hartglycosiden tevens een invloed hebben op g_K en g_{Na} . Dudel en Trautwein (1958) vonden bij een langzame toename van de glycoside-concentratie een afname van de membraan-weerstand na een aanvankelijke toename. Zij interpreteerden deze bevindingen als veranderingen van g_K . Kassebaum (1963) concludeerde uit de verandering van de

repolarisatie eveneens, dat g_K bij lage glycoside-concentraties afnam, maar steeg bij hogere concentraties. Een argument voor de invloed van glycosiden op g_{Na} wordt geleverd door experimenten van Farah en Loomis (1950) en van Méndéz en Méndéz (1957). De eersten vonden in het geïsoleerde honde-hart, dat bij atriumfladderen ("flutter") toevoeging van glycosiden leidde tot verlaging van de frequentie. Mede op grond van de waarneming dat de maximale prikkelfrequentie onder invloed van de glycosiden afnam, concludeerden zij, dat de refraktaire periode door glycosiden werd verlengd. Méndéz en Méndéz (1957) toonden in atrium- en ventrikelvezels van de hond aan, dat de prikkelbaarheid na toevoeging van glycosiden minder werd. Bovendien bleek uit hun onderzoek, dat glycosiden de duur van de relatief refraktaire periode verlengden, terwijl de duur van de effectief refraktaire periode ongewijzigd bleef. Het herstel van de prikkelbaarheid geschiedde minder snel. Dit kan een aanwijzing zijn, dat de reaktivatie van de natrium-carriers door ouabaine wordt vertraagd.

Voor een uitgebreider overzicht van de eigenschappen van hartglycosiden wordt verwezen naar de artikelen van Glynn (1964) en van Lee en Klaus (1971).

6.4.2. De invloed van ouabaine op de relatie tussen de startpotentiaal en dV/dt max

De experimenten hebben aangetoond, dat bij frequentieverhoging de steady state startpotentiaal en dV/dt max op dezelfde wijze veranderen als na toevoeging van ouabaine. Een aanwijzing hiervoor was reeds gevonden in de waarneming van Dudel en Trautwein (1958) en van Kassebaum (1963), dat de aktiveringskurve door ouabaine naar lagere waarden van dV/dt max werd verschoven. In aanwezigheid van ouabaine wordt een bepaalde startpotentiaal met de daarbij behorende waarde van dV/dt max bij een lagere frequentie gemeten dan onder normale extracellulaire omstandigheden. De invloed van de frequentie op de startpotentiaal en op dV/dt max

blijft echter ook in aanwezigheid van ouabaine aantoonbaar. De gebruikte ouabaine-concentratie is volgens de literatuur hoog genoeg om een afname van $|K^+|_i$ en een stijging van $|Na^+|_i$ te veroorzaken. De experimenten leveren dus steun aan de veronderstelling dat een overeenkomstige verandering van de intracellulaire samenstelling een belangrijke rol speelt in de afname van de startpotentiaal en van dV/dt max bij frekwentieverhoging.

Gezien de onveranderde relatie tussen startpotentiaal en dV/dt max is het aannemelijk, dat bij normale extracellulaire omstandigheden een bepaalde verhoging van de frekwentie dezelfde afname van $|K^+|_i$ en stijging van $|Na^+|_i$ veroorzaakt als een minder grote frekwentieverhoging in de aanwezigheid van ouabaine. Hiervoor is het echter noodzakelijk, dat het niet door ouabaine geblokkeerde gedeelte van de Na/K-pomp normaal funktioneert, i.e. kan reageren op een impuls tot hogere activiteit. Polimeni en Vasalle (1970 en 1971) hebben aangetoond, dat dit het geval is. Ook in aanwezigheid van ouabaine nemen de kalium-influx en de kalium-efflux toe bij frekwentieverhoging, hoewel de absolute grootte van de fluxen door ouabaine wel is verminderd. Ook deze auteurs veronderstellen, dat de impuls tot verhoging van de pomp-activiteit een toename van $|Na^+|_i$ is.

De remmende werking van ouabaine op de Na/K-pomp zal tot gevolg hebben, dat de elektrogene werking van de pomp afneemt. Dit leidt dan tot afname van de startpotentiaal. Het is echter niet waarschijnlijk, dat dit effect groot is. Wanneer bij een bepaalde frekwentie de startpotentiaal hierdoor zou afnemen, dan had de daling van dV/dt max plaats moeten vinden volgens de aktiveringskurve bij de betrokken frekwentie.

Ook bij een eventuele afname van g_{Na} door ouabaine zou ten gevolge van de daling van de startpotentiaal een verlaging van dV/dt max moeten optreden volgens het verband dat door de aktiveringskurve bij de betrokken frekwentie wordt weergegeven. Het is evenmin waarschijnlijk, dat de invloed

van ouabaine op g_{Na} van grote betekenis is. Méndéz en Méndéz (1957) vermelden, dat in het atrium van de hond het minimale interval tussen twee supraliminale prikkels van normale sterkte wordt verlengd van 160 msec. tot ongeveer 200 msec. De glycoside-concentratie was 50% van de lethale dosis. Het is niet bekend, wat de lethale dosis voor het konijn is, zodat een vergelijking van de gebruikte concentratie met die van Méndéz en Méndéz niet mogelijk is. De prikkelsterkte (anderhalf maal de drempelwaarde) behoeft echter na toevoeging van ouabaine nooit te worden verhoogd. Volgens de bovenstaande gegevens lijkt de reaktivatie van het natrium-carrier-systeem volledig bij frekwenties tot ongeveer 5 Hz. Het beschreven effect van ouabaine op de startpotentiaal en dV/dt max is echter aangetoond voor frekwenties vanaf 1 Hz. Aangezien er bij de relatief lage frekwenties geen sprake kan zijn van een onvolledige reaktivatie, is een directe invloed van ouabaine op g_{Na} als verklaring voor het effect niet aannemelijk.

6.5. CONCLUSIES

Toevoeging van $5 \cdot 10^{-7}$ mol/l ouabaine verandert de steady state startpotentiaal en dV/dt max op dezelfde wijze als het geval is bij frekwentieverhoging. Dit steunt de veronderstelling dat bij frekwentieverhoging de afname van dV/dt max mede wordt veroorzaakt door een verlaging van de concentratie-gradient voor natrium-ionen ten gevolge van een stijging van $|Na^+|_i$.

HOOFDSTUK 7.

POGING TOT EEN VERKLARING VAN DE FREKWENTIE - AFHANKELIJKE POTENTI- ERING VAN DE KONTRAKTIEKRACHT.

Bij de in dit proefschrift beschreven experimenten is geen meting verricht van de kontraktiekracht. De experimentele omstandigheden die voor een langdurige meting van de kontraktiekracht noodzakelijk zijn, zijn moeilijk te combineren met een langdurige intracellulaire potentiaal-meting. In de literatuur is echter bij herhaling vastgesteld, dat in het door ons gebruikte frekwentie-trajekt ook bij het konijn de reeds door Bowditch (1871) beschreven positieve correlatie tussen de frekwentie en de kontraktiekracht bestaat. Aan het einde van dit proefschrift waarin een stijging van $|\text{Na}^+|_i$ bij frekwentieverhoging aannemelijk is gemaakt, willen wij een poging doen om aan de hand van enkele literatuur-gegevens een verband te leggen tussen het beschreven effect van de frekwentie op de elektrische aktiviteit van het preparaat en de daarmee gepaard gaande potentiering van de kontraktiekracht.

Uit het werk van o.a. Ebashi en Endo (1968) is komen vast te staan, dat de hoogte van de kontraktiekracht op ieder moment afhankelijk is van $|\text{Ca}^{++}|_i$. Aangezien bij frekwentieverhoging niet de duur van de kontraktie toeneemt maar wel de kontraktiekracht, kan worden verondersteld dat er als gevolg van frekwentieverhoging bij de kontraktie meer calcium-ionen beschikbaar zijn. Het bekende verschijnsel dat hartglycosiden een positief inotrope werking op hartspeer uitoefenen, heeft het idee doen ontstaan, dat de verandering van de kontraktiekracht in relatie staat met een verandering van de natrium-kalium-huishouding. Hajdu (1953) meende, dat de toename van de kontraktiekracht bij frekwentieverhoging voornamelijk het

gevolg was van het opgetreden kalium-verlies. Hij werd hierin gesteund door Sarnoff et al (1963). Echter, voortbouwend op het oorspronkelijk van Woodbury (1963) afkomstige idee van de Na/K-pump lag, stelden Langer en Brady (1966), dat het kalium-verlies zeer waarschijnlijk gekoppeld was aan een toename van $|\text{Na}^+|_i$. In de omstandigheid dat door een bepaalde frekwentie-verhoging de kontraktiekracht 50% was toegenomen, berekenden zij op grond van het kalium-verlies, dat $|\text{Na}^+|_i$ 5 à 10% was gestegen. Deze veronderstelde stijging van $|\text{Na}^+|_i$ werd voldoende geacht om het positief inotrope effect te verklaren (Langer, 1967), mede op grond van de waarneming dat een relatief lage ouabaine-concentratie, waarbij geen grote verandering van $|\text{Na}^+|_i$ kon worden verwacht, eveneens leidde tot een dergelijke toename van de kontraktiekracht (Repke, 1964).

Onze experimenten geven goede steun aan de veronderstelling dat bij frekwentieverhoging naast het kalium-verlies, leidend tot een afname van de startpotentiaal, een intracellulaire ophoping van natrium plaats vindt. Figuur 16 geeft de mogelijkheid om na te gaan, of de door Langer en Brady (1966) berekende 10% toename van $|\text{Na}^+|_i$ een waarde is, die in onze resultaten past. Uit de figuur is af te leiden, dat dV/dt max bij een startpotentiaal van -78 mV bij 1 Hz ongeveer 150 V/sec bedraagt en bij 5 Hz ongeveer 120 V/sec. Door de frekwentieverhoging is dV/dt max bij deze startpotentiaal dus 20% afgenomen. Er moeten vele onzekere factoren worden aangenomen om hieruit het verschil in concentratie-gradient voor natrium-ionen te berekenen. Wij geven er daarom de voorkeur aan om aan de hand van een getallen-voorbeeld het effect van dV/dt max van de door Langer en Brady (1966) gepostuleerde verandering van de concentratie-gradient te demonstreren.

Stel, bij 1 Hz: $|\text{Na}^+|_e = 150 \text{ mmol/l}$ en $|\text{Na}^+|_i = 30 \text{ mmol/l}$. Wanneer $|\text{Na}^+|_i$ bij 5 Hz 10% hoger is, dan bedraagt $|\text{Na}^+|_i$ bij deze frekwentie dus 33 mmol/l. Volgens Nernst is dan bij 37 °C:

$$1 \text{ Hz: } V_{\text{Na}} = 61,5 \log \frac{150}{30} = 43,1 \text{ mV}$$

$$5 \text{ Hz: } V_{Na} = 61,5 \log \frac{150}{33} = 41,2 \text{ mV}$$

De hoogte van dV/dt max is een maat voor I_{Na} (zie APPENDIX).
Op ieder moment van de actiepotentiaal geldt:

$$I_{Na} = g_{Na} (V_m - V_{Na}) \quad (\text{Hodgkin en Huxley, 1952 a})$$

Dan is:

$$\frac{dV/dt \text{ max } 1 \text{ Hz}}{dV/dt \text{ max } 5 \text{ Hz}} = \frac{I_{Na} 1}{I_{Na} 5} = \frac{g_{Na} (V_m - V_{Na} 1)}{g_{Na} (V_m - V_{Na} 5)}$$

Op het moment dat dV/dt maximaal is, bedraagt V_m ongeveer -30 mV. In HOOFDSTUK 5 is betoogd, dat g_{Na} niet van de frequentie afhankelijk is, anders dan door de optredende verandering van de startpotentiaal. Wanneer wordt aangenomen, dat V_m bij een bepaalde startpotentiaal evenmin door de frequentie wordt beïnvloed, dan is:

$$\frac{dV/dt \text{ max } 1 \text{ Hz}}{dV/dt \text{ max } 5 \text{ Hz}} = \frac{-73,1}{-71,4} = 1,02$$

Bij dezelfde startpotentiaal zou dV/dt max bij 5 Hz dus ongeveer 2% lager zijn dan bij 1 Hz. De door ons gevonden afname van 20% is hiermee niet in overeenstemming. Het is echter mogelijk, dat de toename van $[Na^+]_i$ in ons experiment meer is dan 10%, aangezien de door ons gebruikte frequentieverandering sterker is dan die van Langer en Brady (1966). Het is echter evenzeer mogelijk, dat een of meer van onze veronderstellingen bij deze berekening onjuist zijn.

Langer (1970) veronderstelt, dat er bij frequentieverhoging meer calcium-ionen beschikbaar zijn als rechtstreeks gevolg van de verhoging van $[Na^+]_i$ of van de vermindering van de concentratie-gradient voor natrium-ionen. Dat het om de concentratie-gradient zou gaan, wordt gesteund door de waarneming dat ook een verlaging van $[Na^+]_e$ een positief

inotroop effect heeft. Voor het mechanisme van de $|Na^+|_i / |Ca^{++}|_i$ -interactie zijn door Langer en medewerkers in de loop van de tijd verschillende hypothesen opgesteld (Langer, 1967; Langer et al, 1969). Er wordt van uitgegaan, dat $|Ca^{++}|_i$ in rust niet is verhoogd, aangezien anders geen volledige relaxatie zou kunnen optreden. Om, als rechtstreeks effect van de afgenomen natrium-influx, per aktivatie meer calcium-ionen beschikbaar te hebben, moet

1. óf meer calcium tijdens de aktivatie de membraan passeren,
2. óf meer calcium tijdens de aktivatie uit het sarcoplasmatisch reticulum vrijkomen.

Voor beide mechanismen bestaan argumenten. Van de reeds in HOOFDSTUK 2 genoemde langzame influx is o.a. door Rougier et al (1969) in de kikker aangetoond, dat deze kan worden gedragen door natrium- en door calcium-ionen, zodat een competitie denkbaar is. Voor het zoogdieren-hart is deze situatie minder duidelijk en zullen verdere onderzoeken moeten worden afgewacht. Met betrekking tot het tweede mechanisme kan worden vermeld, dat Langer(1967) oorspronkelijk veronderstelde, dat de natriumionen de calcium-ionen uit het sarcoplasmatisch reticulum zouden verdrijven. Er schijnt echter geen rechtstreeks effect van natrium op de calcium-loslating aantoonbaar te zijn (M.Reiter, tijdens discussie in het "Symposium on Calcium and Cellular Function", Section IV, Londen, 1969). Het moet bovendien toch niet uitgesloten worden geacht, dat de rol van $|Na^+|_i$ voor de regulatie van de kontrakatiekracht gering is. Het is namelijk mogelijk, dat bij frekwentieverhoging meer calcium-ionen intracellulair blijven, zowel als gevolg van de versterkte calcium-influx als van de verminderde calcium-efflux (zoals gevonden is door Reuter en Seitz, 1968). Hierdoor zou dan het sarcoplasmatisch reticulum meer calcium-ionen kunnen opnemen en bij aktivatie weer loslaten.

Samenvattend kunnen wij vaststellen, dat de door onze

experimenten gesteunde opvatting van een intracellulaire natrium-ophoping bij frekwentieverhoging een verklaring kan zijn voor het effect van de frekwentie op de kontraktiekracht. Door het ontbreken van een aantal essentiële gegevens blijven echter andere verklaringen mogelijk.

SAMENVATTING

De in dit proefschrift beschreven experimenten hadden tot doel om na te gaan, welk mechanisme ten grondslag lag aan de negatieve relatie tussen de maximale depolarisatiesnelheid van de actiepotentiaal, dV/dt_{max} , en de prikkel-frekwentie. Het uitgangspunt werd gevormd door het onderzoek van Viersma (1969). Hierin was als hypothese gesteld, dat de afname van dV/dt_{max} bij frekventieverhoging veroorzaakt werd door een vermindering van de electrochemische gradient voor natrium-ionen, als gevolg van een hogere intracellulaire natriumconcentratie, $[Na^+]_i$. De activiteit van de Na/K-pomp zou op geleide van $[Na^+]_i$ toenemen, totdat bij de nieuwe frekwentie de passieve natrium-influx weer geheel door de actieve natrium-efflux werd gecompenseerd. Belangrijk hierbij was de waarneming dat de diastolische membraanpotentiaal bij frekventieverhoging beneden 5,9 Hz niet aantoonbaar veranderde. De tweede hypothese, een onvolledige beschikbaarheid van natrium-carriers bij hogere frekquenties, kon hierdoor worden verworpen, tenminste voor frekquenties beneden 5,9 Hz. Experimenten waarin de Na/K-pomp door ouabaine werd geremd, steunden de hypothese dat het frekventie-effekt op dV/dt_{max} werd veroorzaakt door het eerst genoemde mechanisme.

Aanleiding voor ons onderzoek waren enkele oriënterende experimenten met een nauwkeurige methode om de diastolische potentiaal te meten. Hierbij bleek, dat ook bij relatief lage frekquenties in het voor het konijn normale werkgebied een daling van de diastolische potentiaal optrad bij verhoging van de frekwentie. De vraag rees, of hierdoor de afname van dV/dt_{max} volledig kon worden verklaard.

HOOFDSTUK 2 geeft een overzicht van de literatuur over de electrochemische eigenschappen van hartspier. De intracellulaire activiteit van ionen blijkt niet nauwkeurig meetbaar. De actiepotentiaal wordt beschreven in termen van

de ionen-hypothese van Hodgkin en Huxley (1952 a, b, c en d). Voor het beschrijven van de veranderingen in het geleidingsvermogen van de celmembraan na supraliminale prikkeling wordt de voorkeur gegeven aan de carrier-hypothese. Bij de bespreking van de eigenschappen van het actieve natrium-kalium-transport wordt relatief grote aandacht besteed aan de elektrogene werking van dit transport.

HOOFDSTUK 3 beschrijft de methodiek. De stimulator geeft een impuls waarvan de stroomsterkte onafhankelijk is van de weerstand tussen de elektrode-punten. Voor het verkrijgen van frekwentiewisselingen wordt een omschakelbare stuur-oscillator gebruikt. De membraanpotentialaal wordt gemeten met behulp van een intracellulaire en een extracellulaire mikro-elektrode. De membraanpotentialaal wordt, evenals het analoog gedifferentieerde signaal, vastgelegd op een magnetische band. Na het experiment wordt van iedere actiepotentialaal de diastolische membraanpotentialaal en dV/dt max gedigitaliseerd.

In HOOFDSTUK 4 wordt aangetoond, dat na het staken van de stimulatie een geleidelijke toename van de membraanpotentialaal plaats vindt. Tijdens deze hyperpolarisatie treedt een positieve napotentialaal op, wanneer de stimulatie-frekwentie hoger dan 3 à 4 Hz is geweest. De term "startpotentialaal" wordt geïntroduceerd voor de hoogte van de membraanpotentialaal waarbij een actiepotentialaal is opgewekt. Verdere experimenten tonen een negatieve correlatie aan tussen de prikkelfrekwentie en de startpotentialaal in het traject tussen 1 Hz en 9 Hz.

Het verloop van de membraanpotentialaal na het staken van de stimulatie kan worden verklaard door een toename van $[K^+]_i$. Gegevens uit experimenten met axonen steunen de veronderstelling, dat de positieve napotentialaal het gevolg is van een vermindering van het elektrogene effect van de Na/K-pomp. Met behulp van gegevens uit het geperfundeerde honde-hart over het kaliumverlies na frekwentieverhoging is getracht een schatting te maken van de te verwachten afname van de startpotentialaal. De gemeten invloed van de

frekwentie op de startpotentiaal blijkt sterker te zijn dan het berekende effect.

In HOOFDSTUK 5 wordt de aktiveringskurve weergegeven bij een prikkelfrekwentie van 1 Hz. Deze kurve kan van vezel tot vezel verschillen. De aktiveringskurve blijkt bij verhoging van de prikkelfrekwentie te verschuiven naar lagere waarden van dV/dt max. Dit verklaart de in dit hoofdstuk beschreven waarneming dat de afname van dV/dt max bij frekwentieverhoging sterker is dan kan worden verwacht op grond van de opgetreden daling van de startpotentiaal. Aan de invloed van de frekwentie op de aktiveringskurve ligt een relatief traag proces ten grondslag. Na overschakeling van 1 Hz op 5 Hz nemen de startpotentiaal en dV/dt max gedurende de eerste ca. 10 sekonden af volgens de relatie die door de 1 Hz-aktiveringskurve wordt weergegeven.

Geleidelijk wordt dV/dt max echter lager dan die, welke bij 1 Hz bij dezelfde startpotentiaal zou hebben geheerst. Uiteindelijk wordt na enige minuten een steady state waarde van de startpotentiaal en dV/dt max bereikt. De afname van de startpotentiaal onmiddellijk na de frekwentieverhoging wordt gevolgd door een geringe toename. De waarde van dV/dt max verandert overeenkomstig dit bifasische verloop.

Aan de hand van literatuurgegevens lijkt een invloed van de frekwentie op g_{Na} , anders dan door de optredende verandering van de startpotentiaal, onwaarschijnlijk. Daarentegen bestaan sterke aanwijzingen, dat er bij toename van de frekwentie een verhoging van $|Na^+|_i$ en een afname van $|K^+|_i$ optreedt. De afname van de concentratiegradient voor natrium-ionen verklaart dan de verschuiving van de aktiveringskurve door frekwentieverandering. De traagheid van het proces dat deze verschuiving veroorzaakt, maakt een intracellulaire ophoping van natrium-ionen waarschijnlijk. De geringe toename van de startpotentiaal, die wordt waargenomen nadat onmiddellijk na de frekwentieverhoging eerst een daling heeft plaats gevonden, kan worden verklaard door een elektrogene werking van de Na/K-pomp.

De experimenten die in HOOFDSTUK 6 zijn beschreven, tonen

aan, dat de steady state startpotentiaal en dV/dt max door ouabaine ($5 \cdot 10^{-7}$ mol/l) op dezelfde wijze worden veranderd als door frekwentieverhoging. De gebruikte ouabaine-concentratie is volgens de literatuur hoog genoeg om een afname van $|K^+|_i$ en een stijging van $|Na^+|_i$ te veroorzaken. Dit steunt onze hypothese, dat een overeenkomstige verandering van de intracellulaire samenstelling een belangrijke rol speelt in de afname van de startpotentiaal en dV/dt max bij frekwentieverhoging. Een eventuele invloed van ouabaine op g_K en g_{Na} als verklaring voor het beschreven effect is onwaarschijnlijk.

In HOOFDSTUK 7 tenslotte wordt getracht om de inzichten die uit de in dit proefschrift beschreven experimenten zijn verkregen, in te passen in de gegevens die in de literatuur bekend zijn over de rol van de natrium-ionen in de regulatie van de kontraktiekracht van hartspeer.

SUMMARY

The objective of the experiments described was to investigate the mechanism underlying the negative relationship between the maximum rate of rise of the action potential, dV/dt_{max} , and the stimulus frequency. The starting-point was the investigation of Viersma (1969). According to his hypothesis an increase of frequency causes a rise of the intracellular sodium content, $[Na^+]_i$. The influence of stimulation frequency on dV/dt_{max} would be due to the diminution of the electrochemical gradient of the sodium ions. Because of the rising $[Na^+]_i$ the activity of the Na/K-pump would be intensified, until the passive sodium influx is again balanced by the active sodium efflux. At frequencies lower than 5,9 Hz changing the frequency did not change the take off-potential. So at least below 5,9 Hz, the second hypothesis, that states that an incomplete availability of sodium carriers causes a decrease of dV/dt_{max} at higher frequencies, seemed to be incorrect. Results obtained by inhibition of the Na/K-pump by ouabain, supported the hypothesis that the influence of stimulation frequency was due to the first mentioned mechanism.

Some experiments with an accurate method to measure the take off-potential led to our investigation. It became evident that an increase of stimulation frequency was accompanied by a decrease of the take off-potential, even at relatively low frequencies in the normal working range of the rabbit heart. The question arose if this could be the explanation of the action of stimulation frequency on dV/dt_{max} .

CHAPTER 2 gives a review of the literature about the electrochemical properties of heart muscle. It turns out that the intracellular activity of ions is not accurately

measurable. The action potential is described in terms of ionic movements according to the hypothesis of Hodgkin and Huxley (1952 a, b, c and d). We prefer to use the carrier hypothesis to describe the changes of the conductance of the cell membrane after supraliminal stimulation. In the discussion of the characteristics of the active sodium/potassium transport a great deal of attention is given to the electrogenic action of this transport.

CHAPTER 3 deals with the methods. The stimulator gives an impulse with a current strength independent of the resistance between the tips of the electrode. To change the stimulation frequency a programmable master-oscillator is used. The membrane potential is measured by means of an intracellular and an extracellular microelectrode. The membrane potential and its derivative are recorded on magnetic tape. After the experiment the take off-potential and dV/dt max of every action potential are digitised.

In CHAPTER 4 it is proved that a gradual increase of the membrane potential takes place after stopping stimulation. During this hyperpolarization there is a positive after-potential when the stimulation frequency has been higher than 3-4 Hz. Additional experiments prove a negative correlation between frequency and take off-potential in the range between 1 Hz and 9 Hz. The change of membrane potential after stopping stimulation can be explained by an increase of $|K^+|_i$. Results from experiments with axons support the assumption that the positive after-potential is due to a decrease of the electrogenic effect of the Na/K-pump. We have tried to estimate the decrease of the take off-potential by using data of potassium loss after an increase of stimulation frequency, obtained from perfused dog hearts. The real influence of frequency on take off-potential is stronger than the calculated influence.

CHAPTER 5 gives the activation curve in rabbit atrium at a stimulation frequency of 1 Hz. This curve can differ from fiber to fiber. The activation curve is dependent upon the stimulus frequency. At higher frequencies there

is a shift towards lower values of dV/dt max. This explains the observation described in this chapter, that the decrease of dV/dt max at higher frequencies is stronger than would be expected from the decrease of the take off-potential under these circumstances. The influence of stimulation frequency on the activation curve is due to a relatively slow mechanism. During about 10 seconds after switching over from 1 Hz to 5 Hz the take off-potential and dV/dt max decrease according to the relation given by the activation curve of the former frequency. However, the value of dV/dt max gradually becomes lower than the value which should have been measured at the same take off-potential at 1 Hz. After a few minutes take off-potential and dV/dt max achieve a steady state value. The decrease of take off-potential immediately after increasing the frequency is followed by a slight increase. The value of dV/dt max changes according to this biphasic course.

From reports in the literature it seems unlikely that stimulation frequency influences g_{Na} in any other way than by changing take off-potential. On the other hand there is strong evidence that an increase of stimulation frequency causes a rise of $|Na^+|_i$ and a decrease of $|K^+|_i$. The decrease of the sodium concentration gradient at higher frequencies explains the influence of stimulation frequency on the activation curve. The slowness of the process underlying the shift of the activation curve makes an accumulation of sodium ions likely. The slight increase of the take off-potential after the initial decrease immediately upon a rise in frequency, can be explained by an electrogenic action of the Na/K-pump.

Experiments described in CHAPTER 6 prove that ouabain alters the steady state take off-potential and dV/dt max in the same way as an increase in frequency. According to data from the literature the ouabain concentration used ($5 \cdot 10^{-7}$ mol/l) is high enough to cause a decrease of $|K^+|_i$ and an increase of $|Na^+|_i$. This supports our hypothesis that a corresponding change of intracellular

composition plays an important part in the action of stimulation frequency on take off-potential and dV/dt max. A possible influence of ouabain on g_K and g_{Na} is unlikely as an explanation for the described effects.

In CHAPTER 7, finally, we have tried to compare the insights gained in the described experiments with some published data concerning the role of sodium ions in regulating the contractile force of heart muscle.

APPENDIX

Op blz. 25 is de theorie van de eendimensionele kabel vermeld. Volgens deze theorie geldt op het ogenblik dat dV/dt maximaal is:

$$\frac{dV}{dt} = - \frac{I_{ion}}{C_m}$$

Hieronder wordt weergegeven, op welke wijze deze formule wordt verkregen. De voornaamste leidraad bij deze afleiding is de monografie van Cole (1968) geweest. Een schematisch weergave van een eendimensionele kabel is afgebeeld in figuur 2.

De volgende symbolen zullen worden gebruikt:

V_i en V_e : potentiaal aan resp. binnen- en buitenzijde van de membraan. Zij worden verondersteld onafhankelijk te zijn van de membraan-dikte.

I_i en I_e : longitudinale stroom aan resp. binnen- en buitenzijde van de membraan.

r_i en r_e : longitudinale weerstand aan resp. binnen- en buitenzijde van de membraan.

$V = V_i - V_e$ = potentiaalverschil over de membraan.

I_m : stroom, lopend door de membraan.

Dan geldt:

$$\frac{dV_e}{dx} = -r_e I_e$$

$$\frac{dV_i}{dx} = -r_i I_i$$

en:

$$\frac{dI_e}{dx} = - \frac{dI_i}{dx} = I_m$$

(de verandering van de longitudinale stroom is de membraan-stroom)

Differentiatie en substitutie geeft:

$$\frac{d^2V}{dt^2} = (r_e + r_i) I_m$$

ofwel:

$$I_m = \frac{1}{r_e + r_i} \frac{d^2V}{dx^2} \quad \text{voor een steady state.}$$

Bij een konstante voortgeleidingssnelheid θ van de impuls geldt: $x = \theta t$, dus:

$$I_m = \frac{1}{\theta^2 (r_e + r_i)} \frac{d^2V}{dt^2}$$

De membraanstroom is dus evenredig met de tweede afgeleide van de membraanpotentiaal tegen de tijd.

I_m is tevens de som van de ionenstroom I_{ion} en de capacitieve stroom (zie blz. 21):

$$I_m = C_m \frac{dV}{dt} + I_{ion}$$

Als dV/dt maximaal is, dan is $\frac{d^2V}{dt^2} = 0$, dus $I_m = 0$. Op dit moment geldt dus:

$$\frac{dV}{dt} = -\frac{I_{ion}}{C_m}$$

Een langgerekte vezel zoals een axon kan goed als een eendimensionele kabel worden voorgesteld. In een hartpreparaat is dit door de geometrie veel minder het geval. Aangezien echter de trabekels van het atrium voornamelijk zijn opgebouwd uit vezels die in de lengte-richting zijn georiënteerd, dringt ook voor deze structuur de overeenkomst met een kabel zich op. Een verandering van de natrium-influx, op welke

dan ook verkregen, heeft in de myocard-vezel een verandering van dV/dt max tot gevolg, die vergelijkbaar is met die in het axon (zie paragraaf 2.5.3.). Dit steunt de aanname, dat ook in ons preparaat een verandering van dV/dt max een verandering van de ionenstroom, i.c. de natrium-influx, weerspiegelt. Er zij in dit verband nog op gewezen, dat tijdens het experiment er voor zorg wordt gedragen, dat prikkelelektrode en afleid-elektrode op dezelfde trabekel zijn geplaatst.

LITERATUURELIJST

- Baker, P.F., A.L. Hodgkin en T.I. Shaw (1962 a).
Replacement of the axoplasm of squid nerve fibres with artificial solutions. *J. Physiol.* 164, p. 330-354.
- Baker, P.F., A.L. Hodgkin en T.I. Shaw (1962 b).
The effects of changes in internal ionic concentrations on the electrical properties of perfused giant axons. *J. Physiol.* 164, p. 355-374.
- Barclay, J.A., E.J. Hamley en H. Houghton (1960).
Electrolyte content of rat heart atria and ventricles. *Circ. Res.* 8, p. 1264-1267.
- Beeler jr., G.W. en H. Reuter (1970 a).
Voltage clamp experiments on ventricular myocardial fibres. *J. Physiol.* 207, p. 165-190.
- Beeler jr., G.W. en H. Reuter (1970 b).
Membrane calcium current in ventricular myocardial fibres. *J. Physiol.* 207, p. 191-209.
- Benítez, D. en J. Alanís (1970).
Calcium ions and the propagation of impulses through the mammalian heart junctional regions. *Jap. J. Physiol.* 20, p. 233-249.
- Bonting, S.L., K.A. Simon en N.M. Hawkins (1961).
Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. I. Quantitative distribution in several tissues of the cat. *Arch. Biochem. Biophysics* 95, p. 416-423.
- Bosteels, S. en E. Carmeliet (1972).
The components of the sodium efflux in cardiac Purkyne fibres. *Pflügers Archiv* 336, p. 48-59.
- Bouman, L.N. (1965).
De werking van de nervus vagus op de prikkelvorming in de sino-auriculaire knoop. Academisch proefschrift, Amsterdam.
- Bowditch, H.D. (1871).
Ueber die Eigentümlichkeiten der Reizbarkeit welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Arb. Physiol. Leipzig*, 6, p. 139-176.

- Brady, A.J. en J.W. Woodbury (1956).
Effect of stimulus rate and external ion concentration on
ventricular transmembrane potentials. *Am. J. Physiol.*
187, p. 588 (abstr.).
- Caldwell, P.C. (1968).
Factors governing movement and distribution of inorganic
ions in nerve and muscle. *Physiol. Rev.* 48, p. 1-64.
- Caldwell, P.C., A.L. Hodgkin, R.D. Keynes en T.I. Shaw (1960 a).
The effects of injecting "energy-rich" phosphatase
compounds on the active transport of ions in the giant
axons of *Loligo*. *J. Physiol.* 152, p. 561-590.
- Caldwell, P.C., A.L. Hodgkin, R.D. Keynes en T.I. Shaw (1960 b).
Partial inhibition of the active transport of cations in
the giant axons of *Loligo*. *J. Physiol.* 152, p. 591-600.
- Carlslake, M.C. en M. Weatherall (1962).
Changes in the sodium, potassium and chloride of rabbit
auricles treated with ouabain. *J. Physiol.* 163, p. 347-361.
- Cohen, L.B. (1973).
Changes in neuron structure during action potential
propagation and synaptic transmission. *Physiol. Rev.* 53,
p. 373-418.
- Cole, K.S. (1968).
Membranes, ions and impulses. University of California
Press, Los Angeles.
- Cole, K.S. en H.J. Curtis (1939).
Electric impedance of the squid giant axon during
activity. *J. Gen. Physiol.* 22, p. 649-670.
- Cole, K.S. en A.L. Hodgkin (1939).
Membrane and protoplasm resistance in the squid giant
axon. *J. Gen. Physiol.* 22, p. 671-687.
- Conn jr., H.L. en J.C. Wood (1959).
Sodium exchange and distribution in the isolated heart
of the normal dog. *Am. J. Physiol.* 197, p. 631-636.
- Cope, F.W. (1967).
NMR evidence for complexing of Na^+ in muscle, kidney and
brain, and by actomyosin. The relation of cellular complexing
of Na^+ to water structure and to transport kinetics.
J. Gen. Physiol. 50, p. 1353-1375.

Davis, L.D. en J.V. Temte (1968).

Effects of propranolol on the transmembrane potentials of ventricular muscle and Purkinje fibres of the dog. *Circ. Res.* 22, p. 661-677.

Délèze, J. (1959).

Perfusion of a strip of mammalian ventricle: effects of K-rich and Na-deficient solutions on transmembrane potentials. *Circ. Res.* 7, p. 461-465.

Dudel, J., K. Peper, R. Rüdel en W. Trautwein (1966).

Excitatory membrane current in heart muscle (Purkinje fibers). *Pflügers Archiv* 292, p. 255-273.

Dudel, J. en W. Trautwein (1958).

Elektrophysiologische Messungen zur Strophanthinwirkung am Herzmuskel. *N.S. Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 232, p. 393-407.

Ebashi, S. en M. Endo (1968).

Calcium ion and muscle contraction. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 18, p. 143-183.

Ehara, T. (1972).

Effects of the increase in the intracellular sodium concentration on the electrical activity of Bullfrog ventricle. *Jap. J. Physiol.* 22, p. 403-419.

Farah, A. en T.A. Loomis (1950).

The action of cardiac glycosides on experimental auricular flutter. *Circulation* 2, p. 742-748.

Fisch, C., F. Steinmetz, A.F. Fasciola en B.L. Martz (1959).

Effect of potassium and "toxic" doses of digitalis on the myocardium. *Circ. Res.* 7, p. 424-431.

Gelband, H., H.L. Bush, M.R. Rosen, R.J. Myerburg en

B.F. Hoffman (1972)

Electrophysiological properties of isolated preparations of human atrial myocardium. *Circ. Res.* 30, p. 293-300.

Gerlings, E.D., D.T. Miller en J.P. Gilmore (1969).

Oxygen availability: a determinant of myocardial potassium balance. *Am. J. Physiol.* 216, p. 559-562.

Gibbs, C.L. en E.A. Johnson (1961).

Effect of changes in frequency of stimulation upon rabbit ventricular action potential. *Circ. Res.* 9, p. 165-170.

Giebisch, G., O. Kraupp, B. Pillat en H. Stormann (1957).

Der Ersatz von extracellularem Natriumchlorid durch Natriumsulfat bzw. Saccharose und seine Wirkung auf die isoliert durchströmte Säugetiermuskulatur.

Pflügers Archiv 265, p. 220-236.

Giebisch, G. en S. Weidmann (1971).

Membrane currents in mammalian ventricular heart muscle fibers using a voltage-clamp technique.

J. Gen. Physiol. 57, p. 290-296.

Gilmore, J.P. (1972).

Letter to the editor: The contribution of a sodium pump lag to frequency potentiation of cardiac muscle.

J. Molec. Cellul. Cardiol. 4, p. 175-177.

Gilmore, J.P. en E.D. Gerlings (1969).

Influence of interstimulus interval on myocardial potassium balance. Am. J. Physiol. 217, p. 136-141.

Gilmore, J.P., J.A. Nizalek jr. en R.J. Jacob (1971).

Further characterization of myocardial K^+ loss induced by changing contraction frequency. Am. J. Physiol. 221, p. 465-469.

Glitsch, H.G. (1972).

Activation of the electrogenic sodium pump in guinea-pig auricles by internal sodium ions. J. Physiol. 220, p. 565-582.

Glitsch, H.G., H. Reuter en H. Scholz (1970).

The effect of the internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea-pig auricles.

J. Physiol. 209, p. 25-43.

Glynn, I.M. (1957).

The actions of cardiac glycosides on sodium and potassium movements in human red cells. J. Physiol. 136, p. 148-173.

Glynn, I.M. (1962).

Activation of adenosinetriphosphatase activity in a cell membrane by external potassium and internal sodium.

J. Physiol. 160, p. 18P.

Glynn, I.M. (1964).

The action of cardiac glycosides on ion movements.

Pharmacol. Rev. 16, p. 381-407.

- Goerke, J. en E. Page (1965).
Cat heart muscle in vitro. VI Potassium exchange in papillary muscles. *J. Gen. Physiol.* 48, p. 933-948.
- Goodford, P.J. en E.R. Vaughan Williams (1962).
Intracellular Na en K concentrations of rabbit atria, in relation to the action of quinidine.
J. Physiol. 160, p. 483-493.
- Greenspan, K., R.L. Edmands en C. Fisch (1967).
Effects of cycle-length alteration on canine cardiac action potentials. *Am. J. Physiol.* 212, p. 1416-1420.
- Haas, H.G., H.G. Glitsch en W. Trautwein (1963).
Natrium-Fluxe am Vorhof des Froschherzens.
Pflügers Archiv 277, p. 36-47.
- Haas, H.G., R. Kern, H.M. Einwächter en M. Tarr (1971).
Kinetics of Na inactivation in frog atria.
Pflügers Archiv 323, p. 141-157.
- Hagiwara, S. en S. Nakajima (1966).
Differences in Na and Ca-spikes as examined by application of tetrodotoxin, procain and manganese ions.
J. Gen. Physiol. 49, p. 793-806.
- Hajdu, S. (1953).
Mechanism of staircase and contracture in ventricular muscle. *Am. J. Physiol.* 174, p. 371-380.
- Haustein, K-O. (1973).
Comparison of therapeutic and toxic actions of ouabain, gitoxin and 16-epi-gitoxin on isolated atria at different extracellular potassium concentrations.
Eur. J. Pharmacol. 21, p. 195-202.
- Hemptinne, A. de, (1971).
Electrofysiologische studie over de repolarisatie in de hartspier. Akademisch proefschrift, Gent.
- Hercus, V.M., R.J.S. McDowall en D. Mendel (1955).
Sodium exchanges in cardiac muscle. *J. Physiol.* 129, p. 177-183.
- Hinke, J.A.M. (1959).
Glass micro-electrodes for measuring intracellular activities of sodium and potassium. *Nature*, 184, p. 1257-1260.

Hiraoka, M. en H.H. Hecht (1973).

Recovery from hypothermia in cardiac Purkinje fibers: considerations for an electrogenic mechanism.

Pflügers Archiv 339, p. 25-36.

Hodgkin, A.L. (1951).

The ionic basis of electrical activity in nerve and muscle. Biol. Revs. Cambridge Phil. Soc. 26, p. 339-409.

Hodgkin, A.L. en P. Horowitz (1959).

The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres.

J. Physiol. 148, p. 127-160.

Hodgkin, A.L. en A.F. Huxley (1952 a).

Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*.

J. Physiol. 116, p. 449-472.

Hodgkin, A.L. en A.F. Huxley (1952 b).

The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. J. Physiol. 116, p. 473-496.

Hodgkin, A.L. en A.F. Huxley (1952 c).

The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. J. Physiol. 116, p. 497-506.

Hodgkin, A.L. en A.F. Huxley (1952 d).

A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.

J. Physiol. 117, p. 500-544.

Hodgkin, A.L. en A.F. Huxley en B. Katz (1949).

Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. Arch. Sci. Physiol. 3, p. 129-150.

Hodgkin, A.L., A.F. Huxley en B. Katz (1952).

Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. J. Physiol. 116, p. 424-448.

Hodgkin, A.L. en B. Katz (1949).

The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. J. Physiol. 108, p. 37-77.

Hodgkin, A.L. en R.D. Keynes (1955).

Active transport of cations in giant axons from *Sepia* and *Loligo*. J. Physiol. 128, p. 28-60.

- Hodgkin, A.L. en R.D. Keynes (1956).
Experiments on injection of substances into squid giant axons by means of a microsyringe.
J. Physiol. 131, p. 592-616.
- Hoffman, B.F. (1966).
The possible mode of action of antiarrhythmic agents.
In: The myocardial cell. Structure, function and modification by cardiac drugs. p. 251-265.
Ed. S.A. Buller en H.L. Conn jr. University of Pennsylvania Press, Philadelphia.
- Hoffman, B.F. en P.F. Cranefield (1960).
Electrophysiology of the heart. McGraw-Hill Book Company, Inc. New York.
- Hoffman, B.F. en E.E. Suckling (1956).
Effect of several cations on transmembrane potentials of cardiac muscle. Am. J. Physiol. 186, p. 317-324.
- Hoffman, J.F. (1962).
Cation transport and structure of the red cell plasma membrane. Circulation, 26, p. 1201-1213.
- Hoffman, J.F. en F.M. Kregnow (1966).
The characterization of new energy-dependent cation transport processes in red blood cells. Ann. N.Y. Acad. Sci. 137, p. 566-576.
- Holland, W.C., C.E. Dunn en M.E. Greig (1952).
Effect of several substrates and inhibitors of acetylcholinesterase on permeability of isolated auricles to Na en K. Am. J. Physiol. 168, p. 546-556.
- Hollander, P.B. en J.L. Webb (1955).
Cellular membrane potentials and contractility of normal rat atrium and the effects of temperature, tension and stimulus frequency. Circ. Res. 3, p. 604-612.
- Hutter, O.F. en D. Noble (1960).
The chloride conductance of frog skeletal muscle. J. Physiol. 151, p. 89-102.
- Hutter, O.F. en D. Noble (1961).
Anion conductance of cardiac muscle. J. Physiol. 157, p. 335-350.

- Janse, M.J. (1971).
The effect of changes in heart rate on the refractory period of the heart. Academisch proefschrift, Amsterdam.
- Jenerick, H. (1963).
Phase plane trajectories of the muscle spike potential. Biophys. J., 3, p. 363-377.
- Jenerick, H. (1964).
An analysis of the striated muscle fiber action current. Biophys. J. 4, p. 77-91.
- Johnson, E.A. en M. Lieberman (1971).
Heart: excitation and contraction. Ann.Rev.Physiol. 33, p. 479-531.
- Johnson, E.A. en McKinnon (1957).
The differential effect of quinidine and pyrilamine on the myocardial action potential at various rates of stimulation. J. Pharmacol. Exp. Therap. 120, p. 460-468.
- Kao, C.Y. (1966).
Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. Pharmacol. Rev. 18, p.997-1049.
- Kassebaum, D.G. (1963).
Electrophysiological effects of strophanthin in the heart. J. Pharmacol. Exp. Ther. 140, p. 329-338.
- Katz, B. (1966).
Nerve, muscle and synaps. McGraw-Hill Book Company
- Keynes, R.D. en R.A. Steinhardt (1968).
The components of the sodium efflux in frog muscle. J. Physiol. 198, p. 581-599.
- Keynes, R.D. en R.C. Swan (1959 a).
The effect of external sodium concentration on the sodium fluxes in frog skeletal muscle. J. Physiol. 147, p. 591-625.
- Keynes, R.D. en R.C. Swan (1959 b)
The permeability of frog muscles fibres to lithium ions. J. Physiol. 147, p. 626-638.
- Klaus, W., G. Kuschinsky en H. Lüllmann (1962).
Ueber den Zusammenhang zwischen positiv inotroper Wirkung von Digitoxigenin, Kaliumflux und intracellulären Ionenkonzentrationen im Herzmuskel. N.S. Arch. Exp. Path. Pharmakol. 242, p. 480-496.

Langer, G.A. (1967).

Sodium exchange in dog ventricular muscle. Relation to frequency of contraction and its possible role in the controle of myocardial contractility.

J. Gen. Physiol. 50, p. 1221-1239.

Langer G.A. (1968).

Ion fluxes in cardiac excitation and contraction and their relation to myocardial contractility.

Physiol. Rev. 48, p. 708-757.

Langer, G.A. (1970).

The role of sodium ion in the regulation of myocardial contractility. J. Molec. Cell. Cardiol. 1, p. 203-207.

Langer, G.A. (1972).

Letter to the editor: Myocardial K^+ loss and contraction frequency. J. Molec. Cell. Cardiol. 4, p. 85-86.

Langer, G.A. (1974).

Ionic movements and the controle of contraction.

In: The mammalian myocardium. Eds. G.A. Langer en A.J. Brady. Wiley & Sons.

Langer, G.A. en A.J. Brady (1966).

Potassium in dog ventricular muscle: kinetic studies of distribution and effects of varying frequency of contraction and potassium concentration of perfusate.

Circ. Res. 18, p. 164-177.

Langer, G.A., E. Sato en M. Seraydarian (1969).

Calcium exchange in a single layer of rat cardiac cells studied by direct counting of cellular activity of labelled calcium. Circ. Res. 24, p. 589-598.

Lamb, J.F. (1961).

The chloride content of rat auricle. J. Physiol. 157, p. 415-425.

Lee, K.S. en W. Klaus (1971).

The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides.

Pharmacol. Rev. 23, p. 193-261.

Lenfant, J., J. Mironneau, Y.M. Gargouil en G. Galand (1968).

Analyse de l'activité électrique spontanée du centre de l'automatisme cardiaque de lapin par les inhibiteurs de perméabilités membranaires. Comptes Rendus, 266 D,

p. 901-904.

Lev, A.A. (1964).

Determination of activity coefficients of potassium and sodium ions in frog muscle fibers. *Nature*, 201, p. 1132-1134.

Ling, G.N. (1962).

A physical theory of the living state: the association-induction hypothesis. Blaisdell Publishing Company, New York/London.

Ling, G.N. en R.W. Gerard (1949).

The normal membrane potential of frog sartorius fibres. *J. Cell. Comp. Physiol.* 34, p. 384-396.

Mascher, D. en K. Peper (1969).

Two components of inward current in myocardial heart fibers. *Pflügers Archiv* 307, p. 190-203.

Matsubara, I. en K. Matsuda (1969).

Contribution of calcium current to the ventricular action potential of the dog. *Jap. J. Physiol.* 19, p. 814-823.

McEwen, L.M. (1956).

The effect on the isolated rabbit heart of vagal stimulation and its modification by cocaine, hexamethonium and ouabain. *J. Physiol.* 131, p. 678-689.

Méndez, C. en R. Méndez (1957).

The action of cardiac glycosides on the excitability and conduction velocity of the mammalian heart.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 121, p. 402-413.

Meredith, J., C. Méndez, W.J. Müller en G.K. Moe (1968).

Excitability of atrioventricular nodal cells.

Circ. Res. 23, p. 69-85.

Moore, J. en T. Narahashi (1967).

Tetrodotoxin's highly selective blockade of an ionic channel. *Fed. Proc.* 26, p. 1655-1663.

Müller, P. (1963).

Kalium und Digitalistoxizität, *Cardiologia* 42, p. 176-188.

Nastuk, W.L. en A.L. Hodgkin (1950)

The electrical activity of single muscle fibres.

J. Cell. Comp. Physiol. 35, p. 39-73.

Nelson, D.A. en E.S. Benson (1963)

On the structural continuities of the transverse tubular system of rabbit and human myocardial cells.

J. Cell. Biol. 16, p. 297-313.

New, W. en W. Trautwein (1972 a).

Inward membrane currents in mammalian myocardium.

Pflügers Archiv 334, p. 1-23.

New, W. en W. Trautwein (1972 b).

The ionic nature of slow inward current and its relation to contraction. Pflügers Archiv 334, p. 24-38.

Niedergerke, R. en R.K. Orkand (1966 a).

The dual effect of calcium on the action potential of the frog's heart. J. Physiol. 184, p. 291-311.

Niedergerke, R. en R.K. Orkand (1966 b)

The dependence of the action potential of the frog's heart on the external and intracellular sodium concentration.

J. Physiol. 184, p. 312-334.

Noble, D. (1962).

A modification of the Hodgkin-Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pacemaker potentials.

J. Physiol. 160, p. 317-352.

Ochi, R. (1970).

The slow inward current and the action of manganese ions in guinea-pig's myocardium. Pflügers Archiv 316, p. 81-94.

Page, E. (1962 a).

Cat heart muscle in vitro. II The steady state resting potential in quiescent papillary muscles.

J. Gen. Physiol. 46, p. 189-199.

Page, E. (1962 b)

Cat heart muscle in vitro. III Extracellular space.

J. Gen. Physiol. 46, p. 201-213.

Page, E. (1965)

Cat heart muscle in vitro. VII The temperature dependence of steady state K exchange in presence and absence of

NaCl. J. Gen. Physiol. 48, p. 949-956.

Page, E. en R.S. Bernstein (1964).

Cat heart muscle in vitro. V Diffusion through a sheet of right ventricle. J. Gen. Physiol. 47, p. 1129-1140.

Page, E., R.J. Goerke en S.R. Storm (1964).

Cat heart muscle in vitro. IV Inhibition of transport in quiescent muscles. J. Gen. Physiol. 47, p. 531-543.

Page, E. en E.G. Page (1968).

Distribution of ions and water between tissue compartments in the perfused left ventricle of the rat heart.

Circ. Res. 22, p. 435-446.

Page, E. en A.K. Solomon (1960).

Cat heart muscle in vitro. I Cell volumes and intracellular concentrations in papillary muscle. J. Gen. Physiol. 44, p. 327-344.

Page, E. en S.R. Storm (1965).

Cat heart muscle in vitro. VIII Active transport of sodium in papillary muscle. J. Gen. Physiol. 48, p. 957-971.

Page, E. en S.R. Storm (1966)

Cat heart muscle in vitro. IX Cell ion and water contents in anisomolal solutions. J. Gen. Physiol. 49, p. 641-653.

Polimeni, P.I. en M. Vasalle (1970).

Potassium fluxes in Purkinje and ventricular muscle fibers during rest and activity. Am. J. Physiol. 218, p. 1381-1388.

Polimeni, P.I. en M. Vasalle (1971).

On the mechanism of ouabain toxicity in Purkinje and ventricular muscle fibers at rest and during activity. Am. J. Cardiol. 27, p. 622-629.

Portius, H.J. en K. Repke (1963).

Versuche zur Charakterisierung einer Transport-ATPase für Na und K in der Zellmembran des Herzmuskels.

Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol. 245, p. 62-63.

Post, R.L., C.R. Merritt, C.R. Kinsolving en C.D. Albright (1960).

Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium in the human erythrocyte.

J. Biol. Chem. 235, p. 1796-1801.

Rang, H.P. en J.M. Ritchie (1968).

On the electrogenic sodium pump in mammalian non-myelinated nerve fibres and its activation by various external cations.

J. Physiol. 196, p. 183-221.

Rayner, B. en M. Weatherall (1957).

Digoxin, ouabain and potassium movements in rabbit auricles. Brit. J. Pharmacol. 12, p. 371-381.

Reiter, M. (1956).

Wirkung von Frequenz, Natriumentzug und Strophanthin auf Kontraktionskraft und Alkaligehalt des Herzmuskels
N.S. Arch. Exp. Path. Pharmacol. 227, p. 300-315.

Repke, K. (1964).

Ueber der biochemischen Wirkungsmodus von Digitalis
Klin. Wochenschr. Berlin 42, p. 147-165.

Reuter, H. en N. Seitz (1968).

The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion compositions.

J. Physiol. 195, p. 451-470.

Reuter, H., L.S. Gettes en B.G. Katzung (1972).

Cation movements during excitation of the heart.

In: Effect of acute ischaemia on myocardial function.

Ed. by M.F. Oliver, D.G. Julian en K.W. Donald. Churchill Livingstone.

Ritchie, J.M. en R.W. Straub (1957).

The hyperpolarization which follows activity in non-medullated fibres. J. Physiol. 136, p. 80-97.

Robertson, W.V.B. en F.W. Dunihue (1954).

Water and electrolyte distribution in cardiac muscle.

Am. J. Physiol. 177, p. 292-297.

Robertson, W.V.B. en P. Peyser (1951).

Changes in water and electrolytes of cardiac muscle following epinephrine. Am. J. Physiol. 166, p. 277-283.

Rougier, O., G. Vassort, D. Garnier, Y.M. Gargouil en

E. Coraboeuf (1968).

Données nouvelles concernant le rôle des ions Na^+ et Ca^{++} sur les propriétés électrophysiologiques des membranes cardiaques; existence d'un canal lent.

Comptes Rendus Sc. Paris 266, p. 802-805.

Rougier, O., G. Vassort, D. Garnier, Y.M. Gargouil en

E. Coraboeuf (1969).

Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential. Pflügers Archiv 308, p. 91-110.

Saito, T. (1971).

Changes in a train of action potentials of the rabbit atrium after a rest period. Effects of various media.

Jap. J. Physiol. 21, p. 251-263.

Sarnoff, S.J., J.P. Gilmore, J.H. Mitchell en J.P. Remensnyder (1963).

Potassium changes in the heart during homeometric autoregulation and acetylcholine.

Am. J. Med. 34, p. 440-451.

Schatzmann, H.J. (1953).

Herzglykoside als Hemmstoffe für aktiven Kalium und Natrium-transport durch die Erythrocytenmembran.

Helv. Physiol. Acta 11, p. 346-354.

Scholz, H. (1969).

Ca-abhängige Membranpotentialänderungen am Herzen und ihre Bedeutung für die elektro-mechanische Kopplung.

Versuch mit Tetrodotoxin in Na-haltigen Lösungen.

N.S. Arch. Pharmak. 265, p. 187-204.

Schreurs, A.W., A.A. Meijer, L.N. Bouman en F.J.M. Bonke (1974)

Micromanipulator with an electrode driver used for microelectrode work. Pflügers Archiv 346, p. 163-166.

Simpson, F.O. en S.J. Oertelius (1962).

The fine structure of sheep myocardial cells; sarcolemmal invaginations and the transverse tubular system.

J. Cell. Biol. 12, p. 91-100

Skou, J.C. (1965).

Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. Physiol. Rev. 45, p. 596-617.

Solomon, A.K. (1960).

Red cell membrane structure and ion transport.

J. Gen. Physiol. 43, p. 1-17.

Sommer, J.R. en E.A. Johnson (1970).

Comparative ultrastructure of cardiac cell membrane specializations. A review. Am. J. Cardiol. 25, p. 184-194.

Stanley, E.J. en M. Reiter (1955).

The antagonistic effects of sodium and calcium on the action potential of guinea-pig papillary muscle.

N.S. Arch. Pharmakol. 252, p. 159-172

Straub, R.W. (1961).

On the mechanism of post-tetanic hyperpolarization in myelinated nerve fibres from the frog.

J. Physiol. 159, p. 19-20F.

Strauss, H.C. en J.Th. Bigger (1972).

Electrophysiological properties of the rabbit sinoatrial perinodal fibers. Circ. Res. 31, p. 490-506.

Strauss, H.C., J.Th. Bigger, A.L. Basset en B.F. Hoffman (1968).

Actions of diphenylhydantoin on the electrical properties of isolated rabbit and canine atria. Circ. Res. 23, p. 463-477.

Swartz, A. (1962).

A sodium and potassium stimulated adenosine triphosphatase from cardiac tissues. I Preparation and properties.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 9, p. 301-312.

Szekeres, L. en E.M. Vaughan Williams (1962).

Antifibrillatory action. J. Physiol. 160, p. 470-482.

Tamai, T. en S. Kagiya (1968).

Studies of cat heart muscle during recovery after prolonged hypothermia: Hyperpolarization of cell membrane and its dependence on the sodium pump with electrogenic characteristics. Circ. Res. 22, p. 423-433.

Tasaka, I., I. Singer en A. Watanabe (1966).

Excitations of squid axons in sodium-free external media. Am. J. Physiol. 211, p. 746-754.

Taylor, I.M., W.D. Huffles en D.T. Young (1961).

Tissue water and electrolytes in an isolated perfused rat's heart preparation. J. Appl. Physiol. 16, p. 95-102.

Tosteson, D.C. (1966).

Energy sources in ionic movements. Active Na-K transport and membrane adenosine triphosphatase. In: The myocardial cell. Ed. by S.A. Briller en H.L. Conn jr.

University of Pennsylvania Press, p. 111-130.

Tritthart, H., B. Fleckenstein, A. Fleckenstein en H. Krause (1968).

Frequenzabhängige Einflüsse von antiarrhythmisch-wirksamen Substanzen auf die Aufstrichgeschwindigkeit des Aktionspotentials (Versuche an isolierten Meerschweinchenpapillarmuskeln). Pflügers Archiv 300, p. R52-53.

- Tritthart, H., H.F. Grundy, H.P. Haastert en A. Herbst (1972)
Studies on the rising phase of the action potential in
mammalian cardiac ventricular fibers.
Pflügers Archiv 332, p. 1-9.
- Tuttle, R.W., P.N. Witt en A. Farah (1962).
Therapeutic and toxic effects of ouabain on K^+ fluxes in
rabbit atria. J. Pharmacol. Exp. Ther. 137, pp. 24-30.
- Ussing, H.H. (1949).
Transport of ions across cellular membranes.
Physiol. Rev. 29, p. 127-155.
- Vasalle, M. (1970).
Electrogenic suppression of automaticity in sheep and
dog Purkinje fibers. Circ. Res. 27, pp. 361-377.
- Vasalle, M., J. Karis en B.F. Hoffman (1962).
Toxic effects of ouabain on Purkinje fibers and ventricular
muscle fibers. Am. J. Physiol. 203, p. 433-439.
- Viersma, J.W. (1969).
Hartfrequentie en impulsgeleiding in het atrium.
Academisch proefschrift, Amsterdam.
- Viersma, J.W., L.N. Bouman en M. Mater (1968 a).
Frequency, conduction velocity and rate of depolarization
in rabbit auricles. Nature 217, p. 1176-1177.
- Viersma, J.W., Henny E. van Rijn en L.N. Bouman (1968 b).
Ouabain and conduction velocity at different heart
frequencies in rabbit auricles. Nature 219, p. 952-953.
- Walden, M., P. Kreher en R. Tricoche (1969).
Effet de la tétrodotoxine, du tétraéthylammonium et du
manganèse sur l'activité électrique intracellulaire du
myocarde ventriculaire de Singe (Famille des Cercopithé-
cides). J. de Physiologie 61, suppl. 2, p. 428-429.
- Ware, F. (1961)
Effects of calcium deficiency and excess on transmembrane
potentials in frog heart. Am. J. Physiol. 201, p. 1113-1119.
- Weidmann, S. (1955 a).
The effect of the cardiac membrane potential on the rapid
availability of the sodium-carrying system.
J. Physiol. 127, p. 213-224.

Weidmann, S. (1955 b).

Effects of calcium ions and local anaesthetics on electrical properties of Purkinje fibres.

J. Physiol. 129, p. 568-582.

Whittam, R. en K.P. Wheeler (1961).

The sensitivity of a kidney ATP-ase to ouabain and to sodium and potassium. Bioch. Biophys. Acta 51, p. 622-624.

Witt, P.N. en R.S. Tuttle (1960).

Effects of ouabain on K and Na concentrations in resting rabbit auricles. Fed. Proc. 19, p. 123-129.

Woodbury, J.W. (1963).

Interrelationships between ion transport mechanisms and excitatory events. Fed. Proc. 22, p. 31-35.

Yanaga, T. en W.C. Holland (1970).

Effect of tetrodotoxin on transmembrane potential of atrial muscle. J. Pharmacol. Exp. Ther. 171, p. 20-25.

Yamagishi, S. en T. Sano (1966).

Effect of tetrodotoxin on the pacemaker action potential of the sinus node. Proc. Jap. Acad. 42, p. 1194-1196.

Yamagishi, S. en T. Sano (1967).

Effect of temperature on pacemaker activity of rabbit sinus node. Am. J. Physiol. 212, p. 829-834.

NAWOORD.

Het onderzoek dat in dit proefschrift is beschreven, zou nooit zijn verricht zonder de medewerking en de stimulerende belangstelling van velen.

Hooggeleerde Bouman, geachte promotor. Jouw kennis van de electrofysiologie van hartspeer is een bron van informatie geweest, waaruit zelden vruchteloos werd geput. Bij de bespreking van de experimentele resultaten bleek telkens weer jouw enorme inzicht. Vooral bij de voorbereidingen van HOOFDSTUK 7 heb jij een rol van doorslaggevende betekenis gespeeld. De grote zorg waarmee jij het manuscript van kritische opmerkingen voorzag, heb ik bijzonder gewaardeerd.

Hooggeleerde Boeles, geachte co-promotor. Uw voortdurende belangstelling en aanmoediging zijn een sterke stimulans geweest.

Zeergeleerde Janse, geachte co-referent. Het aantal deskundigen in Nederland op dit gebied van de fysiologie is gering. Ik prijs mij daarom gelukkig, dat juist jij de taak van co-referent hebt willen aanvaarden.

Geleerde Van Enst, beste Gee. Een groot gedeelte van de experimenten hebben wij samen verricht. Jouw enthousiasme en jouw aanstekelijke opgewektheid vormen voor mij een dankbare herinnering. Jij zult mij bij de verdediging van dit proefschrift terzijde staan. Een betere afsluiting van onze samenwerking lijkt mij niet mogelijk.

Geleerde Allessie, beste Maurits. De gebruikte methode voor het meten van de startpotentiaal is grotendeels door jou ontwikkeld. Het is daarom voor mij van grote waarde, dat ook jij mij als paranymf terzijde zult staan.

Zeergeleerde Viersma, beste Jan Willem. Dat jouw onderzoek uiteindelijk tot mijn experimenten heeft geleid, moet jou met enige trots vervullen.

Mevrouw Wilms-Schopman, beste Francien, bedankt voor de

assistentie die jij bij het verrichten en het uitwerken van vele experimenten hebt verleend.

De medewerkers van de elektronische werkplaats (hoofd: A.A. Meijer) en de mechanische werkplaats (hoofd: A.W. Schreurs) ben ik veel dank verschuldigd voor de apparatuur die zij ontwierpen en bouwden. Door hun bijdrage konden experimentele handelingen worden verricht, die voorheen technisch niet uitvoerbaar waren.

De heer B.J. van Kooten, beste Trix. Jij hebt het grootste gedeelte van het typ-werk verricht. De zorgvuldigheid waarmee jij dat deed, was bewonderenswaardig. Door stagnatie in de voltooiing van het manuscript heb jij jouw taak helaas voortijdig uit handen moeten geven.

De heer Louwes verrichtte nauwgezet het fotografische werk. Bij de heer Riepen was het afdraaien van de stencils in vertrouwde handen.

De heren Hilgersom en Free waren onontbeerlijk bij het onderhouden van de proefopstelling en het uitvoeren van bestellingen.

De heer Alkema en medewerkers betuig ik dank voor de goede verzorging van de proefdieren.

Het personeel van de Centrale Bibliotheek van het Jan Swammerdam Instituut is mij behulpzaam geweest bij het verzamelen van de noodzakelijke literatuur.

Tenslotte wil ik sterke gevoelens van dankbaarheid tot uiting brengen aan jullie, lieve Christine, Duco en Tessa. Ik heb mij zeer veel uren teruggetrokken om in alle rust aan dit proefschrift te kunnen werken. De vanzelfsprekendheid waarmee dat werd aanvaard, is de belangrijkste reden geweest, dat dit proefschrift aan jullie is opgedragen.

STELLINGEN:

1. Dit proefschrift.
2. Bij unilaterale anotia van kippe-embryonen treden de aanwezige hersenzenuwen symmetrisch uit de schedelbasis.
3. Aan farmaceutische produkten die een (of meer) geneesmiddel(en) bevatten met een geringe therapeutische breedte, dienen wettelijk eisen te worden gesteld ten opzichte van de biologische beschikbaarheid van het (de) geneesmiddel(en).
J.v.d.Meer (1973), Ned.T.Geneesk.117, p.1819-1820.
4. Gegevens over buitenlandse dienstplichtigen doen vrezen, dat ook bij de meeste Nederlandse dienstplichtigen de lichamelijke belastbaarheid aan het einde van de diensttijd niet verschilt van die aan het begin.
Th.Hettinger en G.Wahner (1972) Sportarzt und Sportmedizin, Heft 2, p. 25-31.
5. Een ergonoom wordt, ten onrechte, vaak beschouwd als een apparaat dat na inworp van enige gegevens een passende oplossing uitwerpt.
6. Het is onjuist om te veronderstellen, dat het aantal misverstanden over de financiële armslag van personen zal verminderen, wanneer alle inkomens openbaar worden gemaakt.
7. Het stakingsrecht is in Nederland goed beschermd. Het moet echter als een falen van de Nederlandse samenleving worden beschouwd, dat het recht om te werken straffeloos kan worden geschonden.
8. De beroeps-militair dient vrij te zijn in de keuze van zijn huisarts.
9. Het dragen van veiligheidsriemen op de voorste zitplaatsen van een auto dient ook binnen de bebouwde kom verplicht te worden gesteld.
10. De inhoud van een stelling is meestal een veronderstelling, een vaststelling, een teken van belangstelling of een uiting van teleurstelling.

