

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии Коми научного центра
Уральского отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Лебедева Елена Александровна

**РОЛЬ ТОКОВ ИОНОВ НАТРИЯ В МОРФОЛОГИИ
ПОТЕНЦИАЛОВ ДЕЙСТВИЯ КЛЕТОК
СИНУСНО–ПРЕДСЕРДНОГО УЗЛА У МЫШИ И КРОЛИКА**

03.03.01 – физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
В.А. Головкин

Сыктывкар 2016

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1. 1. Морфология синусно–предсердного узла млекопитающих	9
1. 1. 1. Особенности строения СП узла мыши	12
1. 1. 2. Особенности строения СП узла кролика	13
1. 2. Ионные основы автоматизма в клетках СП узла	15
1. 2. 1. Входящий быстрый Na^+ -ток, I_{Na}	17
1. 2. 2. Ток Na^+/K^+ -насоса, I_{NaK}	23
1. 2. 3. Другие трансмембранные токи с участием ионов Na^+	26
1. 2. 3. 1. Активируемый гиперполяризацией ток, I_f	26
1. 2. 3. 2. Поддерживаемый (sustained) направленный внутрь ток, I_{st}	29
1. 2. 3. 3. Ток $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменного механизма, I_{NaCa}	30
1. 2. 4. Ca^{2+} -ток и его роль в формировании ПД.....	32
1. 2. 4. 1. Медленный Ca^{2+} -ток L-типа, I_{CaL}	32
1. 2. 4. 2. Проходящий Ca^{2+} -ток T-типа, I_{CaT}	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
2. 1. Методика препаровки сердца и подготовка препарата СП узла	35
2. 2. Микроэлектродный метод регистрации биоэлектрических потенциалов	37
2. 3. Растворы и ингибиторы ионных каналов	40
2. 4. Расчет амплитудных, временных и скоростных параметров ПД.....	44
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	47
3. 1. Общая характеристика основных параметров ПД синусно-предсердной области ..	47
3.1.1. Характеристика ПД клеток СП области мыши	48
3. 1. 2. Характеристика ПД клеток СП узла кролика	51
3. 2. Изменение морфологии ПД при блокировании Na^+ -каналов	53
3. 2. 1. Эффекты ТТХ на генерацию ПД клеток СП узла мыши	53
3. 2. 2. Эффекты лидокаина на морфологию ПД клеток СП узла мыши	56
3. 2. 3. Эффекты лидокаина на морфологию ПД клеток СП узла кролика	62
3. 3. Влияние гипонатриевых растворов на параметры ПД клеток у мыши.....	66
3. 4. Изменение морфологии ПД при ингибировании тока Na^+/K^+ -насоса.....	73
3. 4. 1. Эффекты убаина на генерацию ПД клеток водителя ритма мыши	73
3. 4. 2. Эффекты убаина на параметры ПД клеток СП узла кролика	75
3. 5. Изменение морфологии ПД при блоке Ca^{2+} -тока L-типа, I_{CaL}	78
3. 5. 1. Эффекты нифедипина на генерацию ПД клеток СП узла мыши.....	78
3. 5. 2. Эффекты нифедипина на параметры ПД клеток СП узла кролика	83
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	87
4. 1. Механизмы формирования автоматизма в СП узле мыши.....	87
4. 1. 1. Роль Na^+ -тока в генерации ПД клеток водителя ритма	88
4. 1. 2. Вклад Ca^{2+} -тока L-типа в морфологию ПД.....	93
4. 1. 3. Оценка вклада Na^+ -тока и Ca^{2+} -тока L-типа в формировании фаз ПД.....	95
4. 2. Механизмы формирования автоматизма в СП узле кролика	96
4. 2. 1. Роль Na^+ -тока в генерации ПД клеток водителя ритма	97
4. 2. 2. Вклад Ca^{2+} -тока L-типа в морфологию ПД.....	99
4. 3. Видовые особенности генерации автоматизма у мыши и кролика	100
4. 3. 1. Сопоставление эффектов блокаторов Na^+ - и Ca^{2+} -каналов у клеток СП узла мыши и кролика	100
4. 3. 2. Роль тока Na^+/K^+ -насоса в генерации ПД у мыши и кролика	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	105
ВЫВОДЫ.....	107
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	109

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Изучение вклада отдельных ионных токов в формирование потенциалов действия клеток, работающих в режиме водителя ритма, составляет важное направление исследований в электрофизиологии. Нарушение функции синусно-предсердного (СП) узла сопряжено с риском развития многих видов аритмий и жизнеугрожающих состояний, в том числе синдрома внезапной смерти [Полякова и др., 2008]. В последнее десятилетие исследования в области молекулярной биологии и генетики способствуют разработке подходов к созданию биологических пейсмекеров как альтернативы или дополнения к методу электрокардиостимуляции [Rosen et al., 2011]. Для решения этих проблем требуются более точные знания о механизмах формирования спонтанных импульсов [Dobrzynski et al., 2007; Zhang et al., 2010; Verkerk, Wilders, 2013].

Клетки синусно-предсердной области сердца неоднородны по своим электрофизиологическим свойствам. Их функциональная гетерогенность обусловлена различной экспрессией каналов на сарколемме для ионов натрия, кальция и калия. Полагают, что у клеток, имеющих скорость фазы 0 потенциалов действия (ПД) свыше 20 В/с, существенный вклад в формирование фазы быстрой деполяризации ПД (фаза 0) вносит чувствительный к тетродотоксину (ТТХ) Na^+ -ток (I_{Na}) [Baruscotti et al., 1996; Kodama et al., 1997]. Вопрос о роли ионов натрия в генерации фазы 0 у клеток с медленной $dV/dt_{\text{max}} \leq 5$ В/с до сих пор остается предметом дискуссий. Считается, что у клеток с самой медленной скоростью нарастания ПД в фазу 0 Na^+ -ток инактивирован или пренебрежительно мал и ведущая роль принадлежит Ca^{2+} -току L-типа [Kodama, et al. 1997; Satoh, 2003; Kurata et al., 2008; Mangoni, Nargeot, 2008; Maltsev, Lakatta, 2009]. Однако в литературе имеются сведения о возможном участии I_{Na} в формировании фазы быстрой деполяризации [Головко, 2009; ¹Verkerk et al., 2009]. В области СП узла сердца мыши, кролика и человека выявлена экспрессия двух изоформ Na^+ -каналов: $\text{Na}_v1.1$ и $\text{Na}_v1.5$ [Maier et al., 2003; Lei et al., 2004; Marionneau et

al., 2005; Chandler et al., 2009]. У пациентов с синдромом слабости СП узла обнаружены мутации в генах SCN5A, кодирующих порообразующую субъединицу изоформы $\text{Na}_v1.5$ [Lei et al., 2007; Butters et al., 2010].

Поддержание гомеостаза K^+ , Na^+ и Ca^{2+} в клетках является необходимым условием ритмичной генерации потенциалов действия сердца. Нарушение концентрации ионов натрия в плазме крови может существенно повлиять на электрическую активность клеток. Na^+/K^+ -насос играет ключевую роль в поддержании гомеостаза ионов натрия и калия в клетке. В результате работы Na^+/K^+ -насоса возникает направленный наружу гиперполяризующий ток [Болдырев, 1998, 2008; Sakai et al., 1996]. Сердечные гликозиды представляют собой класс лекарственных соединений, способных ингибировать работу Na^+/K^+ -насоса. Однако экспериментальные данные о влиянии сердечных гликозидов на спонтанную активность клеток водителя ритма единичны, функциональная роль тока Na^+/K^+ -насоса в поддержании автоматизма остается до конца невыясненной и оценка вклада Na^+/K^+ -АТФазы в морфологию ПД остается важной задачей.

К настоящему времени наиболее полно исследована электрофизиология клеток СП узла кролика [¹Denyer, Brown, 1990; Baruscotti et al., 1996; Kodama et al., 1997; Maltsev et al., 2004; DiFrancesco, 2010]. В последние годы все чаще проводят исследования на генетически модифицированных мышах [Lei et al., 2005; Liu et al., 2007; Pott et al., 2007]. Синусно-предсердный узел мыши благодаря генетической близости, сходству организации и функционирования с синусно-предсердным узлом человека на данный момент является распространенной экспериментальной моделью для решения актуальных проблем в электрофизиологии сердца. В отличие от кролика, СП узел мыши имеет небольшие размеры и окружен слоем соединительной ткани, что существенно усложняет исследования с помощью микроэлектродной техники. Остается актуальным вопрос насколько близки механизмы формирования автоматизма у клеток СП узла

мышь и кролика – наиболее часто используемых экспериментальных животных.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные результаты вносят вклад в понимание физиологической роли токов ионов Na^+ в механизмах генерации и регуляции автоматизма пейсмекерных клеток СП узла. Это важно для выявления причин формирования патологий, связанных с нарушениями электрической активности клеток водителя ритма. Выяснение механизмов автоматизма СП узла будет содействовать разработке способов направленного фармакологического регулирования активности клеток, работающих в режиме водителя ритма в синусно-предсердном узле.

Данная работа создает фундамент для развития и усовершенствования математических моделей генерации ПД с учетом электрической неоднородности клеток СП узла. Исследование основных токов, особенно с участием ионов натрия, в генерации и регуляции автоматизма СП узла сердца имеет большое практическое значение в биомедицине для создания биологических пейсмекеров, необходимых для пациентов с дисфункцией СП узла.

Научная новизна исследования. Впервые с помощью микроэлектродной техники получены данные, свидетельствующие об участии Na^+ -тока в формировании ПД у клеток водителя ритма СП узла мыши с самой медленной скоростью нарастания переднего фронта ПД (~ 3 В/с) в условиях, близких к физиологическим. Доказано, что входящий Na^+ -ток, чувствительный к ТТХ и лидокаину, вносит вклад в формирование фазы быстрой деполяризации и фазы медленной диастолической деполяризации потенциалов действия.

При сопоставимой скорости нарастания ПД в фазу 0 проведена оценка относительного вклада токов, чувствительных к лидокаину (I_{Na}) и нифедипину (I_{CaL}), в формировании фаз ПД у клеток типа истинного и скрытого водителя ритма СП узла мыши и кролика. Впервые у клеток водителя ритма СП узла мыши и кролика выявлены различия в

чувствительности к лидокаину – блокатору потенциалзависимых Na^+ -каналов. На основании анализа дозозависимых кривых изменения скорости фазы быстрой деполяризации определена эффективная концентрация лидокаина, при которой достигается 50% ингибирующий эффект (EC_{50}). Показано, что у клеток водителя ритма мышцы концентрация EC_{50} в среднем в 8 раз ниже, чем у кролика. Препараты СП области мышцы и кролика имеют различную чувствительность к нифедипину. Скорость фазы быстрой деполяризации ПД у клеток истинного водителя ритма кролика в два раза чувствительнее к ингибитору медленного Ca^{2+} -тока L-типа, чем у клеток мышцы.

В синусно-предсердном узле мышцы у клеток, работающих в режиме истинного и скрытого водителей ритма, снижение скорости нарастания переднего фронта ПД в фазу 0 (dV/dt_{\max}) происходит пропорционально снижению транссарколеммального градиента Na^+ .

Получены новые данные о физиологической роли тока Na^+/K^+ -насоса (I_{NaK}), участвующего в автоматизме клеток СП узла мышцы и кролика. При ингибировании Na^+/K^+ -насоса убаином установлено, что препараты СП узла мышцы в ~ 10 раз устойчивее к этому блокатору по сравнению с препаратами СП узла кролика.

Цель и задачи исследования. Цель работы заключалась в исследовании роли токов с участием ионов натрия в формировании трансмембранных потенциалов действия клеток синусно-предсердного узла у мышцы и кролика.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. На основе результатов ингибиторного анализа оценить вклад входящего Na^+ -тока в генерацию потенциалов действия СП узла у мышцы и кролика.

2. Изучить и проанализировать эффекты нифедипина – блокатора медленного Ca^{2+} -тока L-типа на основные электрофизиологические параметры ПД клеток СП области у мышцы и кролика.

3. Охарактеризовать эффекты растворов с пониженным содержанием ионов натрия на формирование ПД клеток водителя ритма мышцы.

4. Оценить влияние убаина, как блокатора Na^+/K^+ -насоса, на электрическую активность клеток СП узла мышцы и кролика.

Положения, выносимые на защиту:

1. В формировании фазы быстрой деполяризации ПД клеток типа истинного водителя ритма СП узла мышцы с самой медленной dV/dt_{\max} участвует Na^+ -ток, чувствительный к ТТХ и лидокаину.

2. Клетки СП узла мышцы и кролика имеют различную чувствительность к действию лидокаина – блокатору Na^+ -каналов.

3. Скорость фазы быстрой деполяризации (dV/dt_{\max}) клеток водителя ритма СП узла у мышцы замедляется пропорционально снижению внеклеточной концентрации ионов Na^+ .

4. При ингибировании Na^+/K^+ -насоса установлено, что многоклеточные препараты СП узла мышцы в ~ 10 раз устойчивее к убаину по сравнению с препаратами СП узла кролика.

Апробация диссертации. Материалы работы были представлены на X – XIII молодежных научных конференциях Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН «Физиология человека и животных от эксперимента к клинической практике» (Сыктывкар, 2011–2014), XXX Annual Meeting of the European Section of the International Society of Heart research (Хайфа, Израиль, 2011), V –VI Всероссийских с международным участием школах–конференциях «Физиология кровообращения» (Москва, 2012, 2016), IV Съезде биофизиков России, (Н. Новгород, 2012), Cardiac & Respiratory Physiology Themed Meeting of Royal Physiological Society (Манчестер, 2012), 37th World Congress of the International Union of Physiological Sciences (Бирмингем, 2013).

Личное участие автора в получении результатов. Все экспериментальные процедуры и обработка полученных результатов выполнены автором лично. Материалы, вошедшие в представленную работу,

обсуждались и публиковались лично и совместно с научным руководителем. По материалам диссертации опубликованы четыре статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и десять тезисов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 126 машинописных страницах, состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и обсуждение результатов), заключения, выводов и списка литературы (171 источник). Диссертация содержит 13 таблиц и 26 рисунков.

Работа выполнена в лаборатории физиологии сердца Института физиологии Коми НЦ УрО РАН в период прохождения курса аспирантуры (2009–2012 гг.) и является разделом плановой темы НИР «Механизм формирования функциональной электрической гетерогенности миокарда» (№ ГР 02.200 950623), поддержана грантами Президиума УрО РАН (проекты № 12–П–4–1054 и 12–У–4–8–1022) и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 09-04-98812 р_север_а). Решением Оргкомитета автор признана победителем конкурса молодых ученых имени В.П. Демикова на VI Всероссийской с международным участием школе-конференции «Физиология кровообращения» (2–5 февраля 2016 г.).

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю – доктору биологических наук, лауреату Государственной премии РФ в области науки и техники, в.н.с. лаборатории физиологии сердца Владимиру Александровичу Головки за советы и ценные замечания при проведении экспериментальной работы и подготовке диссертации.

Автор искреннее благодарит м.н.с. к.б.н. Михаила Анатольевича Гоноткова за помощь в проведении экспериментов и моральную поддержку, а также с.н.с. к.б.н. Наталью Викторовну Артееву за содействие в обработке экспериментального материала. Автор выражает признательность заведующему лабораторией физиологии сердца д.б.н. Яну Эрнестовичу Азарову и всем сотрудникам лаборатории за поддержку, советы и критические замечания при написании диссертационной работы.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. 1. Морфология синусно–предсердного узла млекопитающих

Ритм сердцебиений задает и поддерживает немногочисленная, обладающая способностью к самовозбуждению, группа мышечных клеток синусно-предсердного (СП) узла. Нервная система способна влиять на силу и частоту сокращения СП узла, но сам процесс формирования импульсов является особенностью клеток этой области [Гоффман, Крейнфилд, 1962; Головкин, 1989; DiFrancesco, 1993; Розен, 2005; Dobrzynski et al., 2007; Абрамочкин и др., 2009, Monfredi et al., 2010; Журавлев, Сафонова, 2011].

У всех млекопитающих синусно-предсердный узел располагается в области соединения верхней полой вены с предсердием. С одной стороны этот участок ограничивается пограничным гребешком (*crista terminalis*), с другой стороны – межпредсердной перегородкой [Boyett et al., 2000; Dobrzynski et al., 2007; Liu et al., 2007; Monfredi et al., 2010]. Обычно СП узел представляет собой продолговатую структуру, вытянутую вдоль пограничного гребешка, по форме напоминающую запятую [Dobrzynski et al., 2007; Liu et al., 2007; Monfredi et al., 2010]. Характерной особенностью СП узла является большое количество соединительной ткани, хотя степень её содержания зависит от вида животного и варьирует от 50% у кролика и морской свинки до 90% у кошки [Orthof et al., 1987]. Соединительная ткань образует барьер и не позволяет возбуждению распространяться в латеральном направлении [Boyett et al., 2000; Liu et al., 2007]. Кроме этого СП область содержит капилляры и нервные элементы – парасимпатические преганглионарные и постганглионарные волокна и ганглии, симпатические постганглионарные волокна. Питание ткани СП узла у мелких животных (кролики, крысы) идет главным образом за счет диффузии, в меньшей степени — за счет мелких артериол. У крупных млекопитающих главную роль в питании СП узла играет артерия СП узла [Orthof et al., 1987].

Размеры пейсмекерных клеток обычно не превышают 5–10 мкм в диаметре и 25–30 мкм в длину. Тогда как размер клеток рабочего миокарда

предсердия составляет 15 –20 мкм в диаметре и ~ 100 мкм в длину [Bleeker Denyer, et al., 1980; Brown, 1990; Boyett et al., 2000; Mangoni, Nargeot, 2001; Dobrzynski et al., 2005]. Кроме того, пейсмекерные клетки отличаются от клеток рабочего миокарда экспрессией ионных каналов и пространственным расположением. Установлено, что в пределах СП узла клетки расположены хаотично в разных направлениях и содержат HCN4 каналы и Cx45 изоформы белков коннексинов. В рабочем миокарде белки коннексины представлены изоформами Cx43 и Cx40, HCN4 каналы отсутствуют, а мышечные волокна идут продольно *crista terminalis* и плотно упакованы [van Veen et al., 2001; Dobrzynski et al., 2005; Liu et al., 2007; Viswanathan et al., 2007; Chandler et al., 2009; Monfredi et al., 2010].

Синусно-предсердный узел является анатомически и электрофизиологически гетерогенной структурой [Гофман, Крейнфилд, 1962]. Даже когда запись производят от нескольких волокон одного СП узла, форма и величина потенциала действия может существенно варьировать (рис. 1.1.1. В). По ряду критериев клетки СП узла принято делить на две группы: истинные водители ритма (истинные пейсмекеры) и скрытые водители ритма (латентные пейсмекеры) [Kreitner, 1985; Головкин, 1989; Розен, 2005; Dobrzynski et al., 2007; Абрамочкин и др., 2009; Сулягин, 2009; Monfredi et al., 2010; Журавлев, Сафонова, 2011].

Клетки типа истинного водителя ритма имеют неправильно–округлую форму в поперечном сечении, хорошо выраженное крупное ядро, слабо развитый сократительный аппарат и небольшое количество органелл [Denyer, Brown, 1990; Boyett et al., 2000; Mangoni, Nargeot, 2001; Wu et al., 2001; Cho et al., 2003; Zaza et al., 2009; Monfredi et al., 2010]. Главная функция клеток типа истинного водителя ритма состоит в инициации электрических импульсов.

Клетки скрытого водителя ритма имеют вытянутую, веретенообразную форму, более развитый сократительный аппарат и содержат больше органелл. По своей морфологии они являются переходными между клетками

истинного водителя ритма и волокнами рабочего миокарда предсердия [Boyett et al., 2000; Cho et al., 2003; Zaza et al., 2009]. Клетки скрытого водителя ритма составляют основную массу клеток СП узла, и ближе к периферии их количество увеличивается [Denyer, Brown, 1990; Boyett et al., 2000; Opthof, 2001; Сутягин, 2009]. От истинных пейсмекеров они отличаются рядом электрофизиологических характеристик, экспрессией ионных каналов, рецепторов и белков коннексинов [van Veen et al., 2001; Wu et al., 2001; Tellez et al., 2006; Viswanathon et al., 2007; Monfredi et al., 2010]. В случае нарушения работы истинных пейсмекеров функцию генерации спонтанной активности берут на себя латентные пейсмекеры. Но основная их функция в здоровом сердце, как предполагается – это усиление и проведение импульсов от центра СП узла к периферии, а затем к клеткам рабочего миокарда предсердия [Головко, 1989; Boyett et al., 2000].

В соответствии с градиентной моделью строения СП узла, в центре СП узла в непосредственной близости от артерии СП узла располагаются клетки типа истинного водителя ритма. Клетки, работающие в режиме скрытого водителя ритма, расположены на периферии СП узла и контактируют с клетками рабочего миокарда предсердий [Verheijck et al., 2001; Zhang et al., 2001; Liu et al., 2007; Zaza et al., 2009; Сутягин, 2009]. Подобная локализация клеток лежит в основе региональных различий электрической активности от периферии к центру СП узла [Zhang et al., 2001].

1. 1. 1. Особенности строения СП узла мышцы

У мышцы СП узел по своей форме напоминает запятыю (рис. 1.1.1.), расположенную в межвенной области, прилегающей к поперечному гребешку. Головная часть СП узла мышцы, расположенная ближе к верхней полой вене, имеет компактную и наиболее плотную структуру, что является отличительной особенностью в строении СП узла мышцы, которая не была отмечена у других животных [Liu et al., 2007].

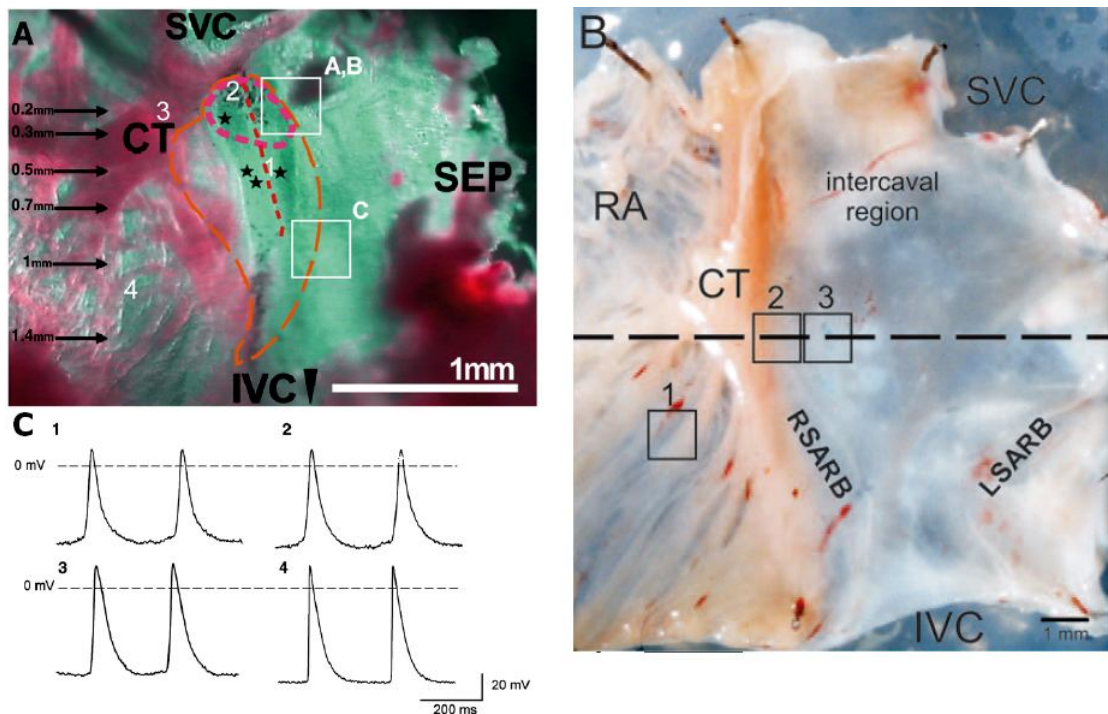


Рис. 1.1.1. Препараты синусно-предсердной области. А – фотография препарата СП области мышцы. Оранжевая пунктирная линия – область распространения HCN4 каналов, розовая пунктирная линия – компактный узел. Звездочками отмечены ведущие области СП узла [Liu et al., 2007] и С – примеры записи внутриклеточных ПД клеток СП узла мышцы [Liu et al., 2007]. В – фотография препарата СП области кролика. 2 – периферия, 3 – центральная зона СП узла [Dobrzynski et al., 2005].

Примечания: CT – поперечный гребешок (*crista terminalis*); IVC – нижняя полая вена; SEP – межпредсердная перегородка; SVC – верхняя полая вена, RA – правое предсердие.

Клетки этой области ориентированы перпендикулярно *crista terminalis*. Клетки хвостовой части СП узла мышцы расположены более диффузно и ориентированы параллельно *crista terminalis*. Кроме того, пейсмекерные клетки имеют небольшие пальцевидные выросты (*interdigitations*). Возможно, они участвуют в проведении потенциала действия от СП узла к более гиперполяризованной предсердной мышце [Liu et al., 2007]. Соединительная ткань отделяет область СП узла от рабочего миокарда со стороны поперечного гребешка и межпредсердной перегородки. В самом СП узле также находятся прослойки соединительной ткани, которые разделяют пейсмекерные клетки на небольшие кластеры [Verheijck et al., 2001; Liu et al., 2007]. Размер СП узла мышцы составляет 1–1.5 мм в длину и 0.2–0.5 мм в ширину [Verheijck et al., 2001; Liu et al., 2007], а площадь узла – $\sim 2.2 \times 10^6$ мкм. Центральная зона СП узла мышцы содержит ~ 450 клеток [Verheijck et al., 2001], длина которых не превышает ~ 40 – 50 мкм, а ширина – 5 мкм [Mangoni, Nargeot, 2001; Cho et al., 2003; Lei et al., 2005].

1. 1. 2. Особенности строения СП узла кролика

У кролика СП узел расположен вдоль *crista terminalis* (рис. 1.1.1. В) ниже стыка верхней полой вены и правого предсердия и занимает все пространство между эндокардом и эпикардом [Bleeker et al., 1980; Opthof et al., 1987; Dobrzynski et al., 2005]. Его размер может составлять до 10 мм в длину и 8 мм в ширину [Boyett et al., 1999], а содержание соединительной ткани доходить до 50% [Opthof et al., 1987]. Центральная зона СП узла расположена в ~ 2.6 мм от *crista terminalis* [Dobrzynski et al., 2005] и отличается более свободной организацией клеток, чем периферийная зона и зона *crista terminalis* [Bleeker et al., 1980; Opthof et al., 1987; Dobrzynski et al., 2005]. Площадь центральной зоны СП узла составляет ~ 0.3 мм² и насчитывает около 5000 клеток [Bleeker et al., 1980]. Длина клеток водителя ритма кролика варьирует от 25–30 [Bleeker et al., 1980] до 95 мкм [Denyer,

Brown, 1990], а ширина не превышает 8 мкм [Bleeker et al., 1980; ¹Denyer, Brown, 1990].

Благодаря особенностям строения и размеру СП узел кролика является одним из самых распространенных объектов для изучения электрической активности клеток. В последние десятилетия для изучения физиологических функции генов и заболеваний сердца, в том числе и дисфункции СП узла активно используют модели генетически-модифицированных мышей [Lei et al., 2005; Liu et al., 2007; Pott et al., 2007]. В связи с чем, возникает необходимость в изучении биофизических свойств мембран пейсмекерных клеток этих животных. Однако синусно-предсердный узел мыши имеет значительно меньшие размеры (рис. 1.1.1), чем СП узел кролика, что затрудняет проведение электрофизиологических исследований. По этой причине информация об основных электрофизиологических параметрах потенциалов действия клеток СП узла мыши немногочисленна.

При использовании метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp) сложно идентифицировать тип клеток водителя ритма. Кроме того, этот метод не позволяет работать с фрагментами ткани, что исключает межклеточное взаимодействие, а используемые при изолировании клеток ферменты-протеазы могут модифицировать поведение изучаемых ионных каналов. Внутриклеточная регистрация ПД клеток у спонтанно сокращающихся многоклеточных препаратов СП области методом микроэлектродной техники дает возможность точно идентифицировать место локализации клетки, от которой отводятся трансмембранные потенциалы. Использование специфических блокаторов ионных каналов позволяет оценить вклад отдельных ионных токов в процесс генерации спонтанных импульсов путем анализа изменения конфигурации потенциала действия. Сопоставление полученных данных на мыши и кролике позволит выявить видовые особенности формирования автоматизма у этих видов животных.

1. 2. Ионные основы автоматизма в клетках СП узла

Синусно-предсердный узел является главным центром автоматизма сердца млекопитающих, и его основная функция заключается в инициации электрических импульсов. Главной особенностью клеток СП узла является наличие фазы медленной диастолической деполяризации ПД (фаза 4, пейсмекерный потенциал). В отличие от кардиомиоцитов предсердий у пейсмекерных клеток отсутствует устойчивый потенциал покоя между фазами реполяризации и деполяризации. Вместо этого происходит постепенное нарастание ПД до порогового значения (фаза 4). Ранняя реполяризация (фаза 1) отсутствует, а фаза плато (фаза 2) слабо выражена [DiFrancesco, 1993; Cooper, Kohl, 2003; Mangoni et al., 2006; Dobrzynski et al., 2007; Абрамочкин и др., 2009; Monfredi et al., 2010; Verkerk et al., 2013]. Синусно-предсердный узел имеет относительно деполяризованный (менее отрицательный) мембранный потенциал во время диастолической деполяризации и более медленную скорость нарастания ПД по сравнению с клетками рабочего миокарда предсердий. От периферии к центру СП узла также происходит снижение скорости нарастания ПД, овершута и максимального диастолического потенциала [Boyett et al., 1999; Monfredi et al., 2010]. В основе региональных различий электрической активности лежит изменение внутренних свойств клеток СП узла, обусловленное дифференциальной экспрессией генов ионных каналов и белков коннексинов [Zhang et al., 2000; Marionneau et al., 2005; Tellez et al., 2006; Viswanathan et al., 2007; Kaese, Verheule, 2012].

Несмотря на то, что проблема участия ионных каналов и токов, протекающих по ним, в автоматизме клеток СП узла изучается на протяжении очень долгого времени, до сих пор не существует единого мнения о механизмах, лежащих в основе этого процесса (рис. 1.2.1.; табл. 1.2.1) [Shih, 1994; Dobrzynski et al., 2007; Абрамочкин и др., 2009; Monfredi et al., 2010; Zhang et al., 2010; Verkerk, Wilders, 2013].

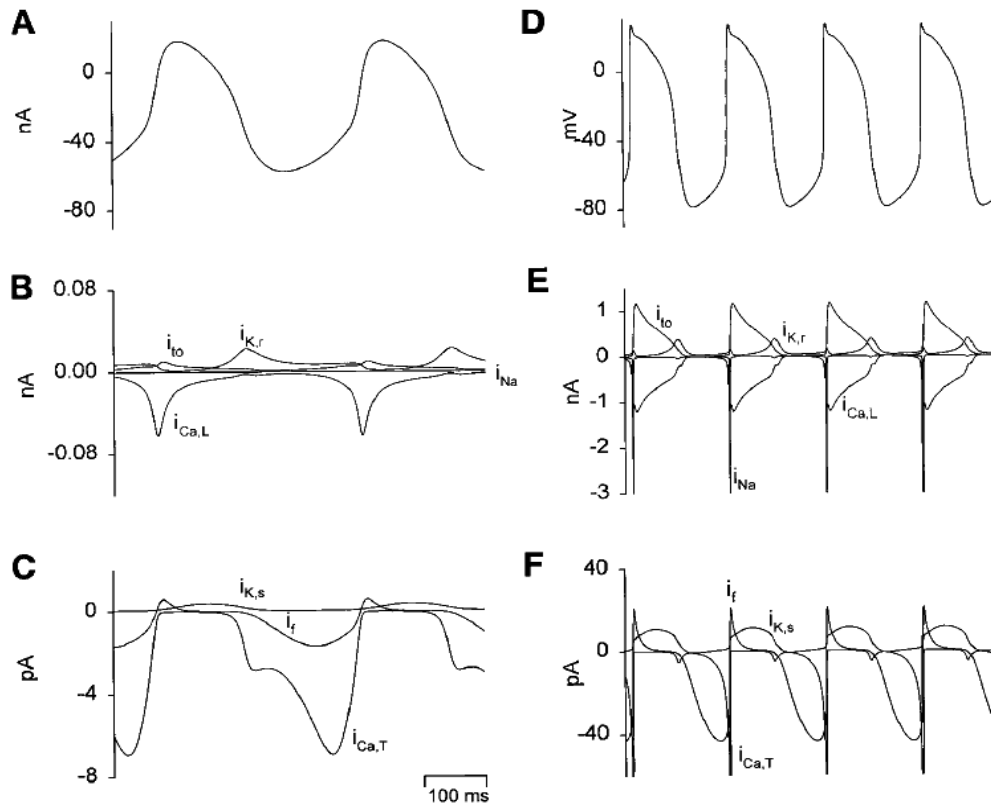


Рис. 1.2.1. Математическая модель генерации ПД клеток СП узла кролика. Потенциалы действия клеток центра (А–С) и периферии (D–F) и связанные с ними ионные токи (В и E: I_{Na} , I_{CaL} , I_{to} , I_{Kr} ; С и F: I_{CaT} , I_{Ks} , I_f) [Zhang et al., 2000].

Таблица. 1.2.1.

Параметры ПД и амплитуда ионных токов в различных математических моделях СП узла кролика

Характеристика	Модель СП узла кролика					
	Noble and Noble, 1984	Demir et al., 1994	Zhang et al., 2000	Kurata et al., 2002	Maltsev, Lakatta, 2009	Severi et al., 2012
E_{max} , мВ	-61	-61	-58	-59	-62.7	-58
АПД, мВ	84	96	79	75	75.9	80
ОДПД, мс	263	263	327	307.5	333	352
ДПД ₅₀ , мс	70	86	139	107	101	108
dV/dt_{max} , В/с	4.7	9.6	2.7	6.4	4.8	7.1
I_f , пА/пФ	0061	0.073	0.1	0.109	0.068	0.195
I_{CaT} , пА/пФ	–	0.188	0.353	0.227	0.09	0.077
I_{CaL} , пА/пФ	4.95	11.00	3.46	6.87	5.35	6.0
I_{st} , пА/пФ	–	–	–	0.40	0.1	–
I_{NCX} , пА/пФ	0.06	0.15	0.03	0.328	0.458	1.8

Примечание: E_{max} – максимальный диастолический потенциал; АПД – амплитуда ПД; ОДПД – общая длительность ПД; ДПД₅₀ – длительность ПД на уровне 50% реполяризации; dV/dt_{max} – скорость фазы 0; I_f – ток, активируемый гиперполяризацией; I_{CaT} – транзиторийный кальциевый ток Т-типа; I_{CaL} – медленный кальциевый ток L-типа; I_{st} – поддерживаемый направленный внутрь ток; I_{NCX} – ток Na^+/Ca^{2+} -обменного механизма. По данным из работ Maltsev, Lakatta (2009) и Severi et al. (2012).

На сегодняшний день существует более 12 математических моделей пейсмекерной деятельности для клеток СП узла кролика. Однако ионные механизмы могут варьировать в зависимости от конкретной модели (табл. 1.2.1.) [Cummins et al., 2013; Verkerk, Wilders, 2013].

Обобщая литературные данные [Zhang et al., 2000; Kurata et al., 2002; Zaza et al., 2009], можно представить механизм инициации автоматизма сердца млекопитающих следующим образом (рис. 1.2.1.). В фазу медленной диастолической деполяризации (фаза 4, пейсмекерный потенциал) активируются ток, активируемый гиперполяризацией I_f (переносится ионами Na^+ и K^+), ток $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ – обменного механизма и транзиторный Ca^{2+} –ток I_{CaT} . Не исключен вклад в этот процесс продолжительного входящего натриевого тока I_{st} (табл. 1.2.1). В конце фазы 4 активируются каналы Ca^{2+} –тока L–типа, которые после достижения порогового потенциала обеспечивают фазу быстрой деполяризации (фаза 0). На периферии СП узла в генерацию фазы 0 также вносит вклад входящий Na^+ –ток [Kodama et al., 1997; Zhang et al., 2000]. Фаза реполяризации (фаза 2 и фаза 3) обусловлена выходящими калиевыми токами (кратковременный ток I_{to} , ток задержанного выпрямления I_{K}) [Dobrzynski et al., 2007; Monfredi et al., 2010]. В свою очередь потенциалы действия, вызванные трансмембранными ионными токами натрия, калия и кальция, запускают процессы активации белков саркоплазмы, что приводит к сокращению кардиомиоцитов [Nikitina et al., 2015].

Таким образом, натрий, являясь одним из потенциалобразующих ионов, поступает в клетку с током, активируемый гиперполяризацией I_f , током $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ – обменного механизма, входящим Na^+ –током и возможно с продолжительным входящим натриевым током I_{st} . Удаление ионов натрия из клетки и поддержание гомеостаза осуществляется за счет функционирования Na^+/K^+ –АТФазы.

1. 2. 1. Входящий быстрый Na^+ –ток, I_{Na}

Быстрый Na^+ –ток хорошо выражен в рабочем миокарде предсердий и ответственен за быструю начальную деполяризацию (фаза 0) потенциала

действия [Nattel et al., 2007; Monfredi et al., 2010]. Однако считалось, что функциональный вклад Na^+ -тока в генерацию ПД клеток СП узла отсутствует или незначителен. Такой вывод был сделан на основе экспериментов, которые продемонстрировали, что ТТХ (блокатор Na^+ -каналов) непосредственно не влиял на частоту спонтанных сокращений препарата СП узла или изолированных клеток взрослых кроликов [Baruscotti, Robinson, 2007; Zhang et al., 2007]. Ток I_{Na} достигает максимума приблизительно при -65 мВ, а это значение более отрицательно по отношению к максимальному диастолическому потенциалу большинства клеток СП узла [Zhang et al., 2007].

На сегодняшний день тот факт, что у клеток СП области с $dV/dt_{\text{max}} > 20$ В/с в формирование фазы быстрой деполяризации ПД (фаза 0) существенный вклад вносит чувствительный к тетродотоксину (ТТХ) Na^+ -ток не вызывает сомнений. Показано, что ТТХ (20 мкМ) снижает скорость нарастания фазы быстрой деполяризации и частоту спонтанных сокращений у клеток периферии СП узла кролика (в эксперименте dV/dt_{max} снижалась от 100 до 5 В/с, а в модели – от 60 до 8 В/с), но не затрагивает параметры ПД центральных клеток [Kodama, et al. 1997; Zhang et al., 2000]. Установлено, что у новорожденных морских свинок, кроликов и собак эффекты блокаторов Na^+ -тока выражены сильнее, чем у взрослых животных [Bosnjak et al., 1986; Baruscotti et al., 1996, 2000; 2001; Baruscotti, Robinson, 2007; Protas et al., 2010]. Предполагается, что основная функция Na^+ -тока на периферии СП узла у взрослых животных заключается в проведении импульса к рабочему миокарду [Kurata et al., 2008; Mangoni, Nargeot, 2008].

Существуют и другие экспериментальные данные, которые позволяют предположить наличие Na^+ -тока у клеток водителя ритма с более медленной dV/dt_{max} , расположенных в центральной зоне СП узла и отвечающих за формирование электрических импульсов. Известно, что ТТХ (30 мкМ) приводит к замедлению скорости фазы 0 у клеток СП узла кролика с $dV/dt_{\text{max}} < 8$ В/с [¹Denyer, Brown, 1990; Muramatsu et al., 1999], но при этом не

затрагивает пейсмекерный потенциал (фаза 4). На препаратах СП области кролика показано, что снижение электрохимического градиента Na^+ на 50% вызывало замедление dV/dt_{\max} (от 3.2 до 1.1 В/с) у клеток истинного водителя ритма [Головко, 2009]. В модели, разработанной Zhang и соавт. [Zhang et al., 2007] для целостного СП узла кролика с учетом гетерогенности, удаление I_{Na} приводило к замедлению частоты генерации ПД, увеличению времени проводимости и вызывало блок проведения импульса. Увеличение длительности цикла ПД сопровождалось снижением овершута и замедлением скорости фазы 0 (dV/dt_{\max}) не только у клеток периферии, но и в центре (в среднем на 40% у клеток с $dV/dt_{\max} = 3.2\text{--}3.3$ В/с).

Другой блокатор Na^+ -тока, лидокаин дозозависимо снижал частоту сердечных сокращений в перфузированном сердце собаки [Satoh, 1981; Wheeler et al., 1988]. При концентрации блокатора в 25–35 мкг/мл частота сердечных сокращений снижалась в среднем на 22%, а ДПД₅₀ удлинялась на 11% [Wheeler et al., 1988]. В изолированной предсердии крысы лидокаин (10 мкМ) снижал частоту сердечных сокращений на $8.1 \pm 0.5\%$ [Létienne et al., 2006], а в СП узле морских свинок (0.4 мМ) существенно замедлял скорость фазы быстрой деполяризации dV/dt_{\max} (от 2.9 ± 0.3 до 1.5 ± 0.3 В/с) и скорость пейсмекерного потенциала V_4 (от 123 ± 14 до 77 ± 24 мВ/с), снижая частоту генерации ПД (от 280 до 208 уд/мин) [Bosnjak et al., 1986].

Изоформы Na^+ -каналов в сердце. О возможном вкладе Na^+ -тока в процесс автоматизма СП узла также свидетельствует экспрессия нескольких изоформ Na^+ -каналов. В СП узле кролика сердечная изоформа $\text{Na}_v1.5$, которая отвечает за классический Na^+ -ток и нечувствительна к ТТХ (блокируется микромолями ТТХ), присутствует на периферии СП узла и отсутствует в центре [Maier et al., 2003; Baruscotti, Robinson, 2007; Lei et al., 2008; Nikmaram et al., 2008]. Количество $\text{Na}_v1.5$ на периферии СП узла ниже, чем в окружающей предсердной ткани. Аналогичные данные получены на СП узле крысы и мыши [Lei et al., 2004; Marionneau et al., 2005; Nikmaram et al., 2008], однако в СП узле хорька $\text{Na}_v1.5$ присутствуют не только на

периферии, но и в центре [Brahmajothi et al., 2010]. В СП узле человека также была обнаружена экспрессия $Na_v1.5$ [Chandler et al., 2009] и зарегистрирован входящий ток по своим характеристикам схожий с Na^+ -током [Verkerk et al., 2009].

Изоформы ТТХ-чувствительных Na^+ -каналов нейронального типа ($Na_v1.1$, $Na_v1.3$ и $Na_v1.9$) присутствуют в миоцитах желудочков и СП узле мыши, крысы, кролика и собаки. Изоформы $Na_v1.3$ и $Na_v1.9$ обнаружены только в волокнах и телах нервных клеток в пределах и около СП узла [Lei et al., 2004; Marionneau et al., 2005; Lei et al., 2008; Nikmaram et al., 2008]. Изоформа $Na_v1.1$ канала равномерно распространена по всему СП узлу и практически отсутствует в предсердной ткани, и в отличие от $Na_v1.5$, инактивируются при более положительных значениях ПД. Эти каналы блокируются наномолярными концентрациями ТТХ [Lei et al., 2004; Baruscotti, Robinson, 2007]. Экспрессия и распределение Na^+ -каналов, в частности ТТХ-чувствительной и ТТХ-устойчивой изоформ, может варьировать у разных видов животных, что может быть причиной различий в генерации ПД [Lei et al., 2007].

Установлено, что мутации гена *SCN5A*, кодирующего порообразующую субъединицу сердечной изоформы Na^+ -канала $Na_v1.5$, вызывают целый спектр антиаритмических синдромов, в том числе синдром слабости синусно-предсердного узла, синдром удлиненного QT и синдром внезапной детской смерти [Lei et al., 2007; Lei et al., 2008; Berecki et al., 2010; Butters et al., 2010; Monfredi et al., 2010; Wu et al., 2012; Zhang et al., 2013]. Показано, что мутации различных участков гена могут приводить к потере функций Na^+ -канала (в результате происходит снижение плотности Na^+ -тока и нарушение быстрой инактивации), к усилению функций Na^+ -канала (вызывает продолжительный Na^+ -ток и задержку инактивации канала) или к снижению количества функционирующих ионных каналов в клетках [Butters et al., 2010; Wu et al., 2012; Zhang et al., 2013].

Потеря функции гена SCN5A у мыши приводила к брадикардии, увеличению времени проводимости импульса и блоку генерации ПД. При этом плотность Na^+ -тока в изолированных клетках с нокаутом гена SCN5A снижалась (от 57 ± 4 pA/pF⁻¹ до 36 ± 1 pA/pF⁻¹ по сравнению с животными дикого типа), а у препаратов СП узла регистрировали увеличение общей длительности цикла ПД почти на 30% (от 170 ± 7 до 223 ± 14 мс по сравнению с животными дикого типа) [Lei et al., 2005]. Схожие данные были получены в результате моделирования мутации гена SCN5A у кролика [Butters et al., 2010]. Мутация этого гена была найдена у пациентов с симптомами слабости СП узла [Lei et al., 2004; Zhang et al., 2007; Butters et al., 2010; Monfredi et al., 2010].

Na⁺-ток в клетках СП узла мыши. Исследования, проведенные на клетках СП узла мыши, продемонстрировали экспрессию α -субъединиц для $\text{Na}_v1.5$ и $\text{Na}_v1.1$ и β_1 - и β_2 -субъединиц [Dhar Malhotra et al., 2001], как было ранее получено у других видов животных.

В клетках водителя ритма мыши ($dV/dt_{\max} \sim 50$ В/с) выявлено два различных компонента Na^+ -тока: ТТХ-устойчивый (блокируется микромолями ТТХ) и ТТХ-чувствительный (блокируется наномолями ТТХ) [Cho et al., 2003; Lei et al., 2004]. При 37 °С ТТХ-устойчивый и ТТХ-чувствительный компоненты Na^+ -тока активировались при -70 и -60 мВ, достигали максимума при -30 и -10 мВ, а плотность токов составила 22 ± 3 и 18 ± 1 pA/pF, соответственно [Lei et al., 2004]. Плотность общего Na^+ -тока варьировала и соотносилась с размером клетки СП узла. Плотность ТТХ-устойчивого компонента снижалась от периферии к центру, тогда как плотность ТТХ-чувствительного компонента оставалась постоянной и не зависела от типа пейсмекерной клетки. Соотношение компонентов Na^+ -тока в клетках согласуется с распределениями изоформ $\text{Na}_v1.5$ и $\text{Na}_v1.1$ в пределах СП узла. Ингибирование ТТХ-чувствительного компонента 100 нМ ТТХ увеличивало общую длительность цикла ПД на $22 \pm 6\%$ у многоклеточных препаратов и на $15 \pm 2\%$ у изолированных клеток СП узла мыши. Показано,

что ТТХ-чувствительный Na^+ -ток активировался во время диастолической деполяризации [Lei et al., 2004; Lei et al., 2008]. Ингибирование обоих компонентов Na^+ -тока у мыши, как и у кролика, приводило к снижению спонтанной частоты сердечных сокращений, значительно большей variability сердечного ритма, замедлению и блоку проведения импульса в СП узле. Но даже в этом случае генерация ПД сохранялась, поскольку кроме Na^+ -тока существуют другие ионные токи, которые участвуют в автоматизме сердца [Lei et al., 2004; Zhang et al., 2007].

Однако в математической модели клеток СП узла мыши ($dV/dt_{\max} = 10$ В/с) блок изоформы $\text{Na}_v1.1$ не влиял на общий цикл ПД. Ингибирование $\text{Na}_v1.5$ приводило к увеличению длительности цикла ПД на 32%. При этом снижения скорости фазы быстрой деполяризации в модели не получено. В то же время авторы отмечают, что в эксперименте тетродотоксин (100 нМ и 30 мкМ) существенно замедлял dV/dt_{\max} [Kharche et al., 2011], что противоречит результатам математического моделирования.

Таким образом, на сегодняшний день остается неясным какой вклад вносит Na^+ -ток в автоматизм клеток водителя ритма СП узла. Отсутствуют данные о роли Na^+ -тока у клеток СП узла мыши с самой медленной скоростью нарастания переднего фронта ПД (< 10 В/с). В то же время данные литературы позволяют предположить вклад этого тока в формировании фазы быстрой деполяризации и фазы медленной диастолической деполяризации, в том числе и у клеток типа истинного водителя ритма. Для проверки этой гипотезы мы исследовали эффекты специфических блокаторов Na^+ -каналов (ТТХ и лидокаина) и гипонатриевых растворов на параметры трансмембранных ПД у клеток с разной скоростью фазы быстрой деполяризации. Сопоставление данных, полученных на мыши и кролике, позволило выявить видовые особенности генерирования ПД и расширить понимание фундаментальной роли Na^+ -тока в процессе автоматизма пейсмекерных клеток СП узла.

1. 2. 2. Ток Na^+/K^+ -насоса, I_{NaK}

Na^+/K^+ -насос (Na^+/K^+ -АТФаза, $I_{\text{Na/K pump}}$, I_{NaK}), представляющий собой интегральный белок плазматических мембран (впервые был обнаружен в 1957 году), играет ключевую роль в поддержании гомеостаза ионов K^+ и Na^+ , поскольку осуществляет активный транспорт ионов K^+ через клеточную мембрану против концентрационного градиента [Zahler et al., 1992; Болдырев, 1998, 2006; Ogawa et al., 2009]. Гидролизуя АТФ, Na^+/K^+ -АТФаза осуществляет сложную многостадийную реакцию с участием ионов Na^+ , K^+ и Mg^{2+} . За полный гидролитический цикл происходят выброс из клетки трех ионов Na^+ , обогащение цитоплазмы двумя ионами K^+ и гидролиз одной молекулы АТФ. Функционирование Na^+/K^+ -насоса обеспечивает высокую внутриклеточную концентрацию ионов K^+ , низкую внутриклеточную концентрацию ионов Na^+ и генерирует общий направленный наружу гиперполяризующий ток [Sakai et al., 1996; Pieske, Houser, 2003; Резник и др., 2006; Mangoni, Nargeot, 2008]. Na^+/K^+ -АТФаза также выполняет сигнальную функцию и способна регулировать процессы роста и пролиферации клеток тканей разных типов [Лопатина и др., 2010].

Попытка охарактеризовать свойства тока I_{NaK} в пейсмекерных клетках СП узла была предпринята Sakai и соавт. [Sakai et al., 1996] с помощью техники patch-clamp на изолированных клетках СП узла кролика. Результаты показали, что I_{NaK} представляет собой существенный направленный наружу ток, равный 22.5 ± 3.5 пА. Ток полностью блокировался 10 мкМ убаина и демонстрировал потенциалзависимые свойства. Результаты этого исследования использовались при разработке некоторых математических моделей СП узла кролика [Kurata et al., 2002; Severi et al., 2012].

Ток I_{NaK} вносит вклад в формирование максимального диастолического потенциала на уровне -60 мВ [Mangoni, Nargeot, 2008]. Полная блокада тока Na^+/K^+ -насоса на первых минутах приводит к гиперполяризации, а затем к повышению потенциала покоя за счет уменьшения градиентов концентрации ионов. В результате чего уменьшается скорость нарастания потенциала

действия и скорость распространения возбуждения вплоть до полной потери возбудимости [Резник и др., 2006; Камкин, Киселева, 2008].

Na^+/K^+ -насос относится к мембранным АТФ-азам Р-типа. В его состав входят две полипептидные цепи: бóльшая (α -субъединица) и меньшая (β -субъединица). Активный центр фермента обращен в цитоплазму и доступен для цитоплазматического АТФ. Оба полипептида образуют компактную глобулу (рис. 2.3.1.), насквозь пронизывающую мембрану [Zahler et al., 1992; Резник и др., 2006; Болдырев, 2008; Bers, Despa, 2009]. В сердце млекопитающих известно несколько изоформ α - ($\alpha 1$ – $\alpha 3$) и β -субъединиц ($\beta 1$ – $\beta 3$) и любая комбинация способствует образованию нормально функционирующей Na^+/K^+ -АТФазы. Изоформа $\alpha 1$ присутствует в сердце всех изученных видов, в то время как экспрессия $\alpha 2$ и $\alpha 3$ может существенно отличаться [Zahler et al., 1992; Болдырев, 2008; Bers, Despa, 2009]. У человека экспрессируются изоформы $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ и $\beta 1$ [Chandler et al., 2009; Bers, Despa, 2009].

Функционирование Na^+/K^+ -АТФазы в клетке регулируется несколькими способами. Na^+/K^+ -насос чувствителен к изменениям концентрации внутриклеточного Na^+ и внеклеточного K^+ . Ток I_{NaK} возрастает вдвое при увеличении концентрации Na^+ в клетке от 15 до 25 мМ [Mangoni, Nargeot, 2008] и при увеличении внеклеточного K^+ [Sakai et al., 1996]. Кроме того, активность Na^+/K^+ -насоса регулируется эндогенными стероидами, называемыми кардиотоническими стероидами или сердечными гликозидами.

Ингибирование Na^+/K^+ -АТФазы сердечными гликозидами имеет клиническое значение. Наномолярные концентрации этих веществ модулируют трансдукторную (сигнальную функцию) Na^+/K^+ -АТФазы, а микромолярные ингибируют насосную функцию [Лопатина и др., 2010]. Их аналоги (уабаин, дигоксин и др.) широко применяются при лечении сердечной недостаточности и представляют важный класс лекарственных соединений [Zahler et al., 1992; Pieske, Houser, 2003; Болдырев, 2008; Ogawa et al., 2009; цит. по Кривой, 2012]. Их эффекты особенно важны в сердечной

мышце, поскольку в низких концентрациях эти вещества оказывают положительное инотропное действие, проявляющееся в усилении сокращений сердечной мышцы [Steinbeck et al., 1980; Болдырев, 1998; Dostanic et al., 2003; цит. по Кривой, 2012]. Связываясь обратимо с внеклеточной стороной Na^+/K^+ -АТФазы, сердечные гликозиды тормозят гидролиз АТФ и ионный транспорт, что приводит к росту внутриклеточного уровня ионов Na^+ и накоплению внутриклеточного Ca^{2+} . За счет активации Ca^{2+} -АТФазы (SERCA) увеличивается концентрация Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме, что вызовет повышение выброса Ca^{2+} в ответ на приходящий потенциал действия и усиление сокращений сердца [Болдырев, 1998, 2008; Bagrov et al., 2009; цит. по Кривой, 2012].

В то же время, изоформы Na^+/K^+ -АТФазы отличаются по чувствительности к сердечным гликозидам. Наибольшим сродством к убаину обладают изоформы в комбинации $\alpha 3\beta 1$ и $\alpha 3\beta 2$, наименьшим – в $\alpha 1\beta 1$ [Blanco, Mercer, 1998; Bagrov et al., 2009; Laursen et al., 2013]. Сродство Na^+/K^+ -АТФазы к убаину зависит от внешней концентрации K^+ из-за антагонистического взаимодействия между ионами K^+ и молекулами убаина за место связывания фермента [Stimers et al., 1991; Ogawa et al., 2009]. Кроме того, важную роль в чувствительности к убаину играют аминокислотные остатки Gln111 и Asn122. Замена этих остатков приводит к значительному уменьшению сродства к убаину [Sandtner et al., 2011; Laursen et al., 2013; Miles et al., 2013].

Учитывая тот факт, что сердечные гликозиды являются одним из факторов, регулирующих ионный транспорт и функции Na^+/K^+ -АТФазы, то нарушение их синтеза или передозировка лекарственных препаратов приводят различным формам патологий, в частности к сердечно-сосудистым заболеваниям, в том числе и к появлению аритмий [Bagrov et al., 2009; цит. по Кривой, 2012]. В то же время данные об эффектах сердечных гликозидов на автоматизм синусно-предсердного узла единичны. Остается неясным как изменение активности Na^+/K^+ -насоса влияет на формирование

трансмембранных потенциалов действия клеток водителя ритма. Кроме того, несмотря на то, что мышь является одной из самых востребованных экспериментальных моделей в частности и для оценки физиологической роли Na^+/K^+ -АТФазы [цит. по Кривой, 2012], в доступной литературе отсутствуют экспериментальные данные о функциональном вкладе тока Na^+/K^+ -насоса в генерацию пейсмекерной активности у этих животных.

1. 2. 3. Другие трансмембранные токи с участием ионов Na^+

Кроме описанных входящего Na^+ -тока (I_{Na}) и выходящий тока Na^+/K^+ -насоса (I_{NaK}) в пейсмекерных клетках зарегистрированы активируемый гиперполяризацией ток (I_f), поддерживаемый (sustained) направленный внутрь ток (I_{st}) и ток $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма (I_{NCX}) [Brown et al., 1976, 1979; DiFrancesco, 1993; Guo et al., 1995; Sakai et al., 1996; Lei et al., 2004; Lakatta, DiFrancesco, 2009].

1. 2. 3. 1. Активируемый гиперполяризацией ток, I_f

Ток, активируемый гиперполяризацией (I_f), или «funny» ток впервые был зарегистрирован в 1979 году группой исследователей из Миланского университета [Brown et al., 1976, 1979]. В настоящее время ток I_f считается одним из основных пейсмекерных токов, участвующих в формировании фазы медленной диастолической деполяризации [DiFrancesco, 1993; Бокерия и др., 2009; Крыжановский, Вититнова, 2009; Monfredi et al., 2010; Cummins et al., 2013]. Этот ток активируется ближе к концу реполяризации приблизительно при -55 мВ и переносит внутрь клетки катионы Na^+ и K^+ . Причем, натриевая составляющая тока преобладает над калиевой [Brown et al., 1976, 1979; DiFrancesco, 1993; Mangoni, Nargeot, 2008; Monfredi et al., 2010; Verkerk, Wilders, 2013]. Ток активен в течение диастолической деполяризации, достигает максимума в последней трети [Zaza et al., 1997] и присутствует во всех клетках со спонтанной активностью [Herrmann et al., 2007; Liu et al., 2007]. Уменьшение околочлеточного Na^+ приводило пропорциональному снижению I_f , а при концентрации ионов Na^+ в

окружающей среде 25% он полностью исчезал [DiFrancesco, Ojeda, 1980; Mangoni, Nargeot, 2001].

Ток, активируемый гиперполяризацией, переносится через группу специфических каналов – HCN (чувствительные к циклическим нуклеотидам катионные каналы – hyperpolarization – activated cyclic nucleotide gated channels – HCN). Всего выделяют 4 типа этих каналов (HCN1–4) [Satoh, 2003; Verkerk et al., 2009; Бокерия и др., 2009; Крыжановский, Вититнова, 2009; Larsson, 2010; Monfredi et al., 2010]. HCN каналы обладают высокой избирательностью для Na^+ и K^+ и через них не проходят аналогичные ионы Li^+ и Rb^+ , что говорит об их высокой селективности [Ho et al., 1994]. Все четыре HCN изоформы были найдены в сердце позвоночных, но экспрессия изоформ этих каналов изменяется в пределах сердечной ткани, имеет видовые различия, зависит от возраста и патологического состояния [Tellez et al., 2006; Verkerk et al., 2009]. У большинства видов животных доминирующей является HCN4 изоформа [Liu et al., 2007; Ludwig et al., 2008]. Удаление HCN4 у взрослых мышей приводило к резкому снижению I_f примерно на 75% [Ludwig et al., 2008]. Показано, что HCN4, кроме участия в диастолической деполяризации у взрослых клеток СП узла, имеет первостепенное значение для создания функциональных клеток водителя ритма у эмбрионов [Herrmann et al., 2007]. Остальная часть HCN каналов представлена HCN2 или HCN1 изоформами [Liu et al., 2007; Ludwig et al., 2008]. Установлено, что инактивация каналов HCN2 приводит к дисфункции СП узла мыши, а ток I_f снижался на 30%. Возможно каналы HCN2 вносят вклад в быстрый кинетический компонент I_f и играют роль в стабилизации сердечной частоты [Ludwig et al., 2003]. HCN3 изоформа также была обнаружена в СП узле мыши, но ее экспрессия очень низка. У взрослых крыс в СП узле экспрессия HCN несколько иная, чем у других видов и более сильно выражена транскрипция HCN2, чем HCN4 [Verkerk et al., 2009].

Свойства тока I_f подробно изучались как на изолированных миоцитах, так и на многоклеточных препаратах СП области разных видов животных

[Mangoni, Nargeot, 2001; Zhang, Vassalle, 2001; Ono et al., 2003; Verkerk et al., 2007]. Однако в настоящее время нет единого мнения о физиологической роли тока I_f в генерации спонтанных потенциалов действия (табл. 1.2.1) [DiFrancesco, Camm, 2004, Du et al., 2004; Lakatta, DiFrancesco, 2009; Maltsev, Lakatta, 2010; Verkerk, Wilders, 2013].

В зависимости от вида животных, специфические блокаторы тока I_f (ивабрадин, затебрадин (ZD7288), ионы Cs^+) снижали частоту генерации ПД на 10-40% [Denyer, Brown, 1990; Choi et al., 1999; Ono et al., 2003; Baruscotti, DiFrancesco, 2004; Liu et al., 2007; Verkerk et al., 2007; Гонотков, Головко, 2011]. Полная блокада тока I_f не приводила к остановке спонтанной активности клеток СП узла. Это свидетельствует о том, что ток, активируемый гиперполяризацией, не является единственным током, вносящим вклад в генерацию диастолической деполяризации [DiFrancesco, 1993; Zaza et al., 1997; Dobrzynski et al., 2007; Liu et al., 2007].

Ранее группой авторов под руководством Головко В.А. были подробно изучены эффекты ионов Cs^+ и ивабрадина и оценен вклад тока I_f в формировании трансмембранных ПД клеток типа истинного и скрытого водителя ритма СП узла мыши [Гонотков, Головко, 2011; Golovko, Gonotkov, 2014]. Однако существуют литературные данные, демонстрирующие, что ток I_f , возможно, блокируется лидокаином – блокатором быстрых потенциалуправляемых Na^+ -каналов. Rocchetti и соавт. [Rocchetti et al., 1999] на изолированных клетках кролика показали, что лидокаин дозозависимо ингибировал ток I_f . Концентрация блокатора, при которой величина тока снижалась на 50% (EC_{50}), составила 38.2 мкМ, а при 75 мкМ ток I_f сокращался на 70%. Сопоставление эффектов лидокаина, ивабрадина, специфического блокатора тока I_f , и гипонатриевых растворов на трансмембранные ПД сердца мыши позволит оценить специфичность лидокаина и дополнить имеющиеся сведения о вкладе тока I_f в формирование фазы медленной диастолической деполяризации.

1. 2. 3. 2. Поддерживаемый (sustained) направленный внутрь ток, I_{st}

В 1995 году Guo и соавт. [Guo et al., 1995] сообщили о токе, активирующемся во время диастолической деполяризации в СП узле кролика, который переносился ионами натрия. Диапазон активации тока составил от -70 до -30 мВ и охватывал фазу медленной диастолической деполяризации. Данный ток зарегистрирован только в пейсмекерных клетках СП узла [Mitsuiye et al., 1999; Kurata et al., 2002; Satoh, 2003]. Позднее он был найден и у морских свинок [Mitsuiye et al., 1999], крыс [Kurata et al., 2002] и свиней [Ono et al., 2003]. Амплитуда I_{st} варьировала у разных клеток СП узла и, возможно, она соотносится со скоростью фазы быстрой деполяризации [Mitsuiye et al., 2000].

Поддерживаемый направленный внутрь ток (I_{st}) блокировался органическими и неорганическими блокаторами Ca^{2+} -каналов, а также повышенной концентрацией ионов Ca^{2+} от 0.1 до 1.8 мМ во внеклеточном растворе и не проявлял чувствительности к ТТХ [Kurata et al., 2002; Satoh, 2003]. Снижение внешней концентрации ионов Na^+ приводило к подавлению I_{st} . Гипонатриевый раствор (70 мМ Na^+ при 0.1 мМ Ca^{2+}) уменьшал величину тока на 53% [Guo et al., 1995; Mitsuiye et al., 1999]. Неизвестно по каким каналам протекает ток I_{st} , однако есть предположение, что он идет по подтипу Ca^{2+} -каналов L-типа [Guo et al., 1995]. Некоторые авторы предполагают, что за счет низкого порога активации и медленной инактивации, I_{st} может вносить существенный вклад в развитие и ускорение процесса деполяризации [Mitsuiye et al., 1999; Mangoni, Nargeot, 2008].

Оценка роли тока I_{st} с помощью математического моделирования сильно варьирует и зависит от конкретной математической модели клеток водителя ритма (табл. 1.2.1). В одних моделях току I_{st} отводится существенная роль в формировании пейсмекерного потенциала [Kurata et al., 2002; Cha et al., 2009], в других он отсутствует или вносит незначительный вклад в процесс генерации ПД [Zhang et al., 2000; Kharche et al., 2011; Severi et al., 2012].

В настоящее время не существует избирательных фармакологических блокаторов тока I_{st} , а молекулярная основа каналов, по которым он протекает, до конца не известна. Поэтому на данный момент нет единого мнения о том, вносит ли вклад «sustained» направленный внутрь ток (I_{st}) в генерацию ПД [Guo et al., 1995; Mangoni, Nargeot, 2008]. В связи с этим данный ионный ток нами не рассматривался.

1. 2. 3. 3. Ток Na^+/Ca^{2+} обменного механизма, I_{NaCa}

Na^+/Ca^{2+} -обменный механизм (I_{NCX} , I_{NaCa}) был впервые описан в аксоне кальмара и в сердце млекопитающих около сорока лет назад [DiPolo, Beaugé, 2006; Lytton, 2007]. Основная функция Na^+/Ca^{2+} -обмена в кардиомиоцитах заключается в удалении ионов Ca^{2+} из клетки. Для поддержания гомеостаза то же количество кальция, поступившего в клетку через Ca^{2+} -каналы, должно быть удалено Na^+/Ca^{2+} -обменным механизмом. При этом важность Na^+/Ca^{2+} -обменного механизма, как одного из путей удаления Ca^{2+} из клетки, варьирует в зависимости от вида животного и стадий онтогенеза.

В большинстве клеток в обмен на три иона Na^+ , поступающих в клетку, происходит удаление одного иона Ca^{2+} . Процесс является электрогенным и в результате возникает направленный внутрь ток I_{NaCa} [Hryshko, Philipson, 1997; Blaustein, Lederer, 1999; Sanders et al., 2006; Lytton, 2007; Pott et al., 2007; Sher et al., 2008].

Максимальная величина тока I_{NaCa} , зарегистрированная при -40 мВ, составляет ~ 0.8 пА/пФ. При замене в нормальном солевом растворе натрия на литий, происходило прекращение пейсмекерной активности клеток [Sanders et al., 2006]. В математической модели ПД клеток СП узла мыши [Kharche et al., 2011] постепенное снижение I_{NaCa} приводило к уменьшению амплитуды ПД и скорости диастолической деполяризации и, в конечном счете, к осцилляциям. При снижении I_{NaCa} на 70% наступала остановка пейсмекерной активности [Kharche et al., 2011].

Регуляция работы Na^+/Ca^{2+} -обменного механизма зависит от большого количества факторов. Решающее значение в физиологических условиях

играют концентрационные градиенты ионов Na^+ и Ca^{2+} [Reppel et al., 2007; Sher et al., 2008]. Высокие концентрации цитозольного Na^+ или отсутствие цитозольного Ca^{2+} способствуют образованию неактивного состояния белка [Reeves, 1998]. Нарушение функционирования $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма может привести к появлению и развитию аритмий, поскольку существенно влияет на кальциевую нагрузку саркоплазматического ретикулума или способствовать появлению более сильного входящего тока. Изменение мембранного потенциала и/или изменение градиента ионов может привести к нерегулируемому обратному режиму работы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма, что может привести к Ca^{2+} перегрузке [Lytton, 2007].

Центральную роль току I_{NaCa} отводят в гипотезе « Ca^{2+} -часов». Освобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума опосредованно через I_{NaCa} способно контролировать скорость пейсмекерного потенциала, ускоряя его в последней трети, и именно этот процесс, по мнению некоторых авторов, лежит в основе автоматизма клеток СП узла [Maltsev et al., 2004; Sanders et al., 2006; Абрамочкин и др., 2009; Lakatta, DiFrancesco, 2009]. Однако не все исследователи согласны с этой гипотезой, поскольку она не может объяснить ряд экспериментальных данных [Dobrzynski et al., 2007; Lakatta, DiFrancesco, 2009; Monfredi et al., 2010; Zhang et al., 2010; Severi et al., 2012; Verkerk et al., 2013]. Например, у мышей, лишенных гена NCX1, отвечающего за формирование белка $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма, наблюдался небольшой дефицит в сердечной функции и сокращение Ca^{2+} -тока L-типа на 20%. Но, несмотря на это, отсутствие NCX1 не приводило к летальному исходу [Lytton, 2007; Pott et al., 2007].

Таким образом, вопрос о роли тока I_{NaCa} в автоматизме клеток водителя ритма остается спорным. На сегодняшний день не существует достаточно селективных ингибиторов $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма, которые могли бы быть использованы для изучения этого тока в интактных клетках и тканях [Blaustein, Lederer, 1999], что затрудняет оценку вклада тока I_{NaCa} в генерацию ПД. Однако, как один из токов переносимый ионами Na^+ , ток I_{NaCa}

будет чувствителен к понижению транссарколеммального градиента Na^+ и его вклад можно косвенно оценить, исключив эффекты специфических блокаторов других Na^+ -токов.

1. 2. 4. Ca^{2+} -ток и его роль в формировании ПД

В клетках СП узла выделяют два типа Ca^{2+} -токов: медленный Ca^{2+} -ток L-типа ($I_{\text{Ca,L}}$) и проходящий Ca^{2+} -ток T-типа ($I_{\text{Ca,T}}$). Они отличаются как по своим кинетическим, так и фармакологическим свойствам. Ток $I_{\text{Ca,L}}$ участвует в формировании фазы быстрой деполяризации (фаза 0) и способствует заключительной части диастолической деполяризации. Ток $I_{\text{Ca,T}}$ вносит вклад в генерирование второй половины медленной диастолической деполяризации [Zaza et al., 1997; Mangoni, et al., 2006; Baruscotti, Robinson, 2007; Baruscotti, Robinson, 2007; Mangoni Nargeot, 2008].

1. 2. 4. 1. Медленный Ca^{2+} -ток L-типа, $I_{\text{Ca,L}}$

Медленный Ca^{2+} -ток L-типа ($I_{\text{Ca,L}}$) впервые зарегистрирован в 1964 году и в настоящее время является наиболее изученным из всех ионных токов сердца [van der Heyden et al., 2005]. Считается, что в клетках центральной части СП узла Ca^{2+} -ток L-типа играет ведущую роль в формировании фазы быстрой деполяризации ПД, тогда как I_{Na} инактивирован [Shih, 1994; Kodama et al., 1997; Mangoni, Nargeot, 2008]. Ток активизируется при значении мембранного потенциала -30 мВ в фазу медленной диастолической деполяризации, его плотность увеличивается и достигает максимума в фазу быстрой деполяризации [DiFrancesco, 1993; Kodama et al., 1997; Zaza et al., 1997; van der Heyden et al., 2005; Mangoni, Nargeot, 2008].

Антагонисты Ca^{2+} , такие как нифедипин, блокируют спонтанные потенциалы действия, а при более низких концентрациях подавляют и замедляют последнюю часть пейсмекерного потенциала [Satoh, 2003; Dobrzynski et al., 2007; Mangoni et al., 2006; Карпушев и др., 2013]. Показано, что нифедипин значительно укорачивает длительность ПД на уровне 50%

реполяризации и снижает скорость диастолической деполяризации [Verheijck et al., 1999].

Вклад тока I_{CaL} в генерацию автоматизма варьирует в зависимости от вида животного и стадий онтогенеза. В СП узле кролика плотность тока I_{CaL} снижается после рождения и у взрослых животных составляет 12.1 pA/pF [Baruscotti, Robinson, 2007]. В клетках СП узла мыши и крысы наблюдалась противоположная картина. Плотность I_{CaL} увеличивается в пять раз в течение первых 7 дней после рождения в желудочковых миоцитах у новорожденных крыс [van der Heyden et al., 2005]. В СП узле мыши плотность Ca^{2+} -тока L-типа выше, чем у новорожденных животных [Adachi et al., 2013], и составляет $\sim 2.6 \pm 2$ pA/pF [Mangoni, Nargeot, 2001].

Ток I_{CaL} протекает через Ca^{2+} -каналы, образованные двумя изоформами – $Ca_v1.2$ и $Ca_v1.3$. Предполагается, что $Ca_v1.2$ каналы участвуют в фазе быстрой деполяризации, а $Ca_v1.3$ каналы в значительной степени способствуют диастолической деполяризации и имеют более низкую чувствительность к дигидропиридинам, в частности нифедипину, чем $Ca_v1.2$ [Mangoni et al., 2006; Mangoni, Nargeot, 2008]. У кролика мРНК $Ca_v1.2$ значительно меньше распространена в СП узле, чем в предсердной мышце, в то время как мРНК $Ca_v1.3$ наоборот преобладает в тканях СП узла, при этом мРНК $Ca_v1.3$ значительно больше в центре, чем на периферии [Tellez et al., 2006]. В клетках СП узла мыши, в отличие от кролика, $Ca_v1.2$ является основной изоформой. Изоформа $Ca_v1.3$ каналов была обнаружена, но в гораздо меньших количествах и активировались при более отрицательных потенциалах, чем $Ca_v1.2$ [Cho et al., 2003; Marionneau et al., 2005].

Оба типа каналов играют важную роль в автоматизме СП узла. Однако Ca^{2+} -ток, идущий по ним, отличается по своим свойствам. У мышей, лишенных $Ca_v1.3$ каналов, была выраженная брадикардия и аритмия СП узла и отсутствовал ток I_{CaL} в диапазоне напряжений, соответствующих диастолической деполяризации. Инактивация $Ca_v1.3$ каналов снижала плотность $I_{CaL} \sim 70\%$. Оставшаяся часть тока проходила по $Ca_v1.2$ каналам

[Mangoni et al., 2006; Mangoni, Nargeot, 2008]. Нарушение экспрессии $Ca_v1.2$ каналов приводило к летальному исходу у эмбрионов мыши. При этом наблюдалась сверхэкспрессия $Ca_v1.3 \alpha 1$ - субъединицы [Cho et al., 2003].

Вклад тока $I_{Ca,L}$ в формирование электрической активности клеток СП узла имеет региональные различия. Нифедипин (2 мкМ) полностью прекращал генерацию ПД у клеток типа истинного водителя ритма, расположенных в центре СП узла кролика. В клетках периферии пейсмекерная активность снижалась, но полной остановки генерации ПД не происходило, поскольку в фазу быстрой деполяризации на периферии вносит ток I_{Na} [Shih, 1994; Kodama et al., 1997; Mangoni, Nargeot, 2008]. Однако не известно насколько выражены эти различия у других видов животных. В сравнении с кроликом, мышь имеет более высокую частоту сердечных сокращений, и относительный вклад ионных токов в процесс автоматизма у этих животных может существенно различаться. Оценка вклада Ca^{2+} -тока L-типа у разных типов клеток СП узла мыши позволит выявить соотношение Ca^{2+} - и Na^+ -токов в формировании фазы быстрой деполяризации у клеток типа истинного и скрытого водителей ритма.

1. 2. 4. 2. Проходящий Ca^{2+} -ток T-типа, $I_{Ca,T}$

На сегодняшний день ток $I_{Ca,T}$ зарегистрирован во всех тканях сердца, в том числе в СП узле, АВ узле, волокнах Пуркинье млекопитающих и венозном синусе амфибий [Mangoni et al., 2006].

Ток $I_{Ca,T}$ начинает активироваться примерно при -50 мВ, достигает максимума при -40 мВ [Hagiwara et al., 1988; Mangoni, Nargoet, 2001; Cho et al., 2003] и вносит вклад в формирование пейсмекерного потенциала и, возможно, способствует плавному переходу от фазы МДД к фазе быстрой деполяризации [Sato et al., 2003; Абрамочкин и др., 2009; Tellez et al., 2011]. Сравнительный анализ тока $I_{Ca,T}$ в клетках новорожденных и взрослых кроликов не показал различий, что говорит о том, что его вклад в развитие СП узла невелик [Baruscotti et al., 2007]. Тем не менее, ингибиторы $I_{Ca,T}$, такие

как Ni^{2+} и тетраметрин, замедляют активность клеток водителя ритма СП узла кролика примерно на 14% [Hagiwara et al., 1988; Mangoni, Nargeot, 2008].

Величина вклада тока $I_{\text{Ca,T}}$ может меняться в зависимости от вида животного или патофизиологического состояния [Ono, Iijima, 2005; Tanaka et al., 2008]. В СП узле мыши плотность тока I_{CaT} составляет 10.4 pA/pF [Cho et al., 2003], тогда как у кролика – 2.1 pA/pF [Hagiwara et al., 1988]. У морской свинки I_{CaT} выражен слабее, чем у мыши, но сильнее, чем у кролика [Tanaka et al., 2008].

Ток $I_{\text{Ca,T}}$ переносится по каналам $\text{Ca}_v3.2$ и $\text{Ca}_v3.1$. [Ono, Iijima, 2005; Dobrzynski et al., 2007; Mangoni et al., 2008]. В клетках СП узла мыши наиболее значительна экспрессия канала $\text{Ca}_v3.1$. Количество мРНК $\text{Ca}_v3.1$ примерно в 30 раз больше в пейсмекерных клетках по сравнению с клетками рабочего миокарда. Экспрессия $\text{Ca}_v3.2$, как правило, ниже, чем $\text{Ca}_v3.1$, но все равно выше, чем в окружающей предсердной ткани. У мышей, лишенных экспрессии $\text{Ca}_v3.2$ каналов, ЭКГ не изменяется. Это указывает на то что, либо эта изоформа не участвует при создании и проведении сердечных импульсов, либо отсутствие этой изоформы компенсируется за счет других токов [Ono, Iijima, 2005; Mangoni, Nargeot, 2008].

Поскольку в доступной литературе нет упоминаний о возможном вкладе тока $I_{\text{Ca,T}}$ в формирование фазы быстрой деполяризации (фаза 0), то этот ток в данном исследовании не рассматривался.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2. 1. Методика препаровки сердца и подготовка препарата СП узла

Эксперименты проводили на самцах мышей альбиносов (возраст 8–10 недель, масса тела 30 ± 5 г, $n_{\text{препаратов}}=30$), и кроликах обоих полов породы Шиншилла (возраст 6–7 месяцев, масса тела 3.0–3.5 кг, $n_{\text{препаратов}}=12$), полученных из питомника экспериментальных животных Института биологии Коми НЦ УрО РАН (Сыктывкар). Животных содержали в пластиковых клетках с металлическими решетками и давали стандартное

питание. Экспериментальный протокол был одобрен независимым Комитетом по биоэтике Института физиологии Коми НЦ УрО РАН (заключение от 24 декабря 2009 г.) и соответствовал международным правилам «Для использования лабораторных животных» (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8-е издание, опубликованное National Academies Press (US) 2011 г.).

Препарат синусно-предсердной области. Животных обездвигивали введением золетила (кролики, 15 мг/кг массы тела) или путем мгновенного смещения шейных позвонков (мышы).

После вскрытия грудной клетки сердце извлекали и помещали в чашку Петри с контрольным раствором Тироде (31 ± 1 °C). Под стереомикроскопом (ув. $\times 40$), после идентификации нижней и верхней полых вен, сердце закрепляли на подложке в чашке Петри, удаляли желудочки и левое предсердие, правое предсердие вскрывали. Полученный препарат включал в себя синусно-предсердный узел, фрагмент *crista terminalis* (поперечный гребешок) и сегменты верхней и нижней полых вен [Гонотков, Головки, 2011]. У кролика препарат СП узла дополнительно разрезали на 2 спонтанно сокращающиеся полоски. Размер спонтанно сокращающихся полосок составил 3 мм \times 2 мм \times 0.3 мм. Далее накладывали лигатуры, крепили препарат субэпикардом вверх в экспериментальной камере и оставляли на 30 минут для стабилизации электрической активности мышечных клеток. Аккуратно приготовленный препарат и перфузия обеспечивали спонтанную ритмичную генерацию потенциалов действия в течение 4–7 ч. эксперимента.

Проведение экспериментов на небольших препаратах изолированной ткани имеет ряд преимуществ:

– находясь в физиологическом растворе, многоклеточный препарат спонтанно генерирует ПД, работая в собственном ритме. Электрические связи и взаимодействие между клетками сохраняются;

– за счет небольших размеров препарата облегчаются процессы диффузии, в результате чего клетки лучше снабжаются кислородом и глюкозой, а также сокращается время для действия блокаторов и физиологически активных веществ;

– за счет снижения амплитуды сокращения препаратов уменьшается повреждающее действие регистрирующего микроэлектрода на клетки, что способствует более устойчивым отведениям ПД;

– уменьшается вероятность феномена смещения пейсмекера;

– данный метод позволяет использовать жестко зафиксированные микроэлектроды. Это дает возможность точно идентифицировать место локализации клетки, от которой отводятся трансмембранные потенциалы, что важно, поскольку СП узел представляет собой гетерогенную электрическую область;

– уменьшается вероятность механических артефактов, вызванных асинхронизмом электрической активности соседних клеток.

2. 2. Микроэлектродный метод регистрации биоэлектрических потенциалов

Микроэлектродный метод регистрации биоэлектрических потенциалов является одним из основных методов электрофизиологии. Он позволяет изучать физиологические процессы в клетках и в отличие от метода фиксации потенциалов («patch–clamp») дает возможность работать с многоклеточными препаратами в условиях, максимально близких к естественным.

Регистрация биопотенциалов с помощью микроэлектродов требует специальной электронно–измерительной аппаратуры. Экспериментальная установка для внутриклеточных отведений (рис. 2.2.1.) включает в себя систему для поддержания жизнедеятельности препарата (система перфузии) и систему регистрации потенциалов действия.

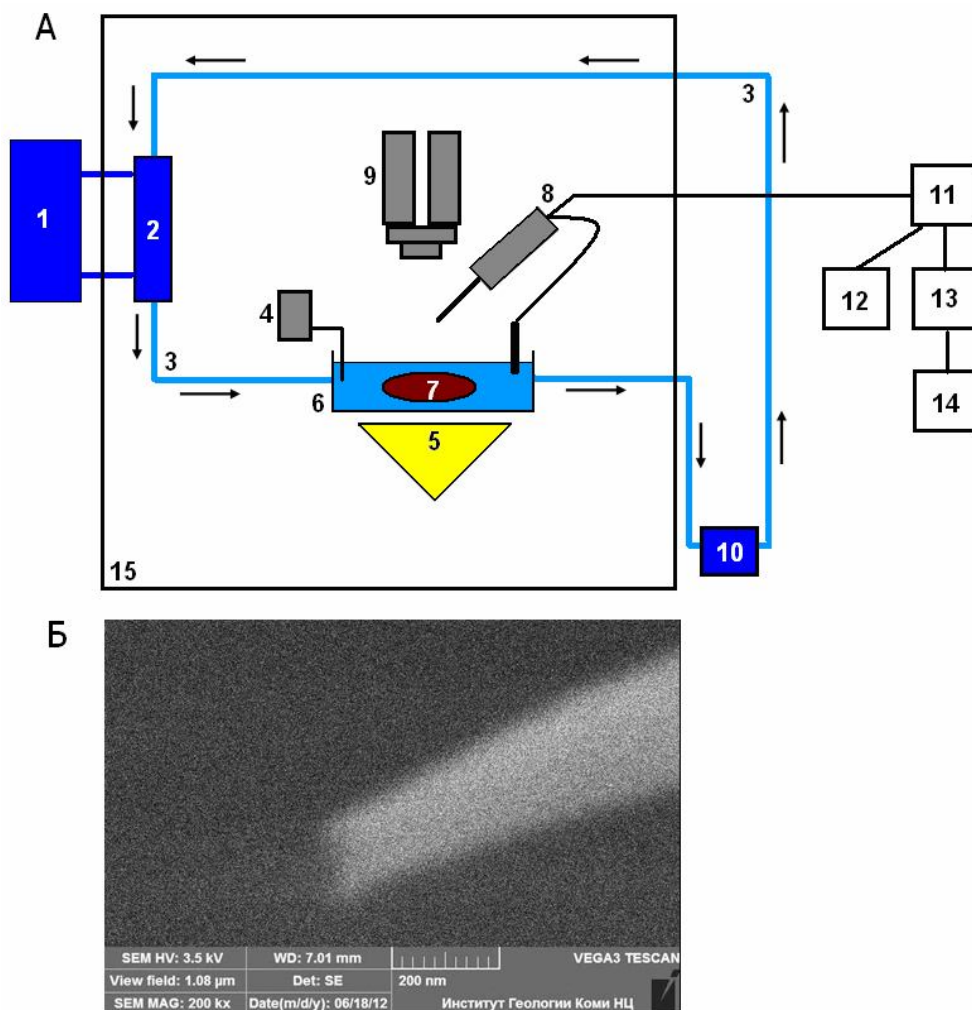


Рис. 2.2.1. А. Блок – схема установки для микроэлектродных исследований: 1 – термостат; 2 – теплообменник; 3 – система перфузии; 4 – электротермометр; 5 – осветитель; 6 – экспериментальная камера; 7 – многоклеточный препарат СП узла; 8 – микроманипулятор с микроэлектродом; 9 – стереомикроскоп; 10 – насос; 11 – усилитель; 12 – осциллограф; 13 – аналогово-цифровой преобразователь; 14 – компьютер; 15 – экранирующая камера. Стрелками показано направление движения экспериментального раствора.

Б. Кончик микроэлектрода под просвечивающим электронным микроскопом тип Тесла BS-500 (фото предоставлено Институтом геологии Коми НЦ УрО РАН). Нетрудно заметить, что наружный диаметр кончика микроэлектрода не превышает 0.1 мкм.

Система перфузии. Препарат помещали в экспериментальную камеру (объем 6 мл) из органического стекла, имеющую два отсека. Разделение камеры на отсеки позволяет предотвратить гидравлические удары, что способствует более устойчивым отведениям ПД.

В первом отсеке термостатированный раствор насыщался газовой смесью 95% O₂ и 5% CO₂. Парциальное насыщение кислородом составляло

180 мм.рт.ст. Измерения проводили с помощью специального кислородного датчика (тип Inlab 605, фирма Меттлер-Толедо, Швейцария). Во втором отсеке находился многоклеточный препарат СП области. Перфузирующий раствор протекал через камеру со средней скоростью 6 мл/мин и отсасывался через стеклянную трубочку. Общий объем перфузата составлял от 0.1 до 0.3 л. Протекание солевого раствора осуществляли по замкнутому кругу с помощью перистальтического насоса. Наблюдение за объектом и определение места регистрации ПД велось с помощью стереобинакулярной лупы (ув. 14×2 или 14×4).

Система регистрации потенциалов действия. Для регистрации внутриклеточных потенциалов действия необходимо использовать тонкие микроэлектроды с диаметром не превышающем 0.4 мкм. Такие микроэлектроды не повреждают сарколемму клеток при прокалывании и способствуют более устойчивым отведениям ПД. О наружном диаметре кончика микроэлектрода можно косвенно судить по величине омического сопротивления: чем оно выше, тем тоньше кончик [Кожечкин, 1975; Крафтс, 1975].

В наших экспериментах использовались микропипетки из заготовок стекла «Пирекс» (Пушино) или из боросиликатного стекла (Sutter Instruments, Великобритания) с наружным диаметром 1.2 мм и внутренним диаметром 0.8 мм. Микропипетки вытягивали на микрокузнице тип ЮФВК. 941 419. 001 (Пушино, Россия). Длина шейки полученных микроэлектродов составляла ~5 мм, наружный диаметр кончика не превышала 0.2 мкм (рис. 2.2.1. Б). Непосредственно перед экспериментом микроэлектроды заполняли 2.5 М раствором хлористого калия. Измерение сопротивления микроэлектродов проводили в экспериментальной камере с помощью калибратора, встроенного в усилитель. Рабочее сопротивление микроэлектродов составляло 50–60 МΩ. Подведение микроэлектрода к ткани осуществлялось с помощью манипулятора М3301 фирмы World Precision Instruments.

Для передачи измерений потенциалов от клетки на осциллограф или аналогово-цифровой преобразователь с минимальным искажением требуется предварительный усилитель, имеющий высокое входное сопротивление ($R_{ВХ}$) и низкое выходное сопротивление ($R_{ЭЛ}$). Так, для получения точности измерения выше 1%, должно выполняться соотношение $R_{ВХ} > 100 R_{ЭЛ}$ [Максимов, Мумладзе, 1975]. В данной работе использовался усилитель для микроэлектродных исследований тип Electro 705 (WPS, США) с низким уровнем шумов и частотной полосой пропускания от 0 до 5 кГц. Усилитель имел высокое входное сопротивление ($R > 10^{12}$ Ом), низкое выходное (~ 100 Ом), уровень шума ≈ 50 мкВ, остаточную некомпенсированную емкость $\approx 0-10$ пФ, и отвечал всем требованиям, необходимым для регистрирования сигналов от высокоомных электродов.

Сигнал от усилителя подавали на осциллограф тип С1-114/1, а также на аналогово-цифровой преобразователь тип Е14-140 (L-Card, РФ), подключенный к компьютеру. Полученные данные сохраняли и обрабатывали в программе PowerGraph Professional версия 3.3 (DIsoft, РФ) на жестком диске персонального компьютера.

2. 3. Растворы и ингибиторы ионных каналов

В качестве контрольного раствора для поддержания физиологической активности многоклеточного препарата СП узла использовали раствор Тироде следующего состава (мм/л): NaCl 140, NaHCO₃ 10 мм, KCl 5.4, CaCl₂ 1.8, MgSO₄ 1, глюкоза 10, HEPES 5; pH раствора довели до 7.4 добавлением NaOH или HCl. Ионы натрия в экспериментах с гипонатриевым раствором заменяли на трис (2-амино-2-(гидроксиметил)-пропан-1,3-диол). Все компоненты солевого раствора, кроме MgSO₄ и глюкозы, производства фирмы ROTH (Германия). Концентрацию водородных ионов измеряли pH-метром (тип SevenGo Duo (pro) SG6, Швейцария) до опыта и после его окончания. Все эксперименты проводили при 31 ± 1 °С. При этой температуре препараты СП узла дольше (> 8 ч) сохраняют свои электрофизиологические

свойства (включая частоту спонтанных сокращений и конфигурацию потенциалов действия), чем при 37 °С [Boyett et al., 1999].

Микроэлектродная техника не позволяет проводить измерение ионных токов напрямую, однако ионные токи можно выделить фармакологически с помощью специфических блокаторов. В этом случае необходимо подобрать наиболее специфичные вещества и использовать концентрации, максимально ингибирующие ионные каналы.

Блокаторы ионных токов (производство «Sigma-Aldrich», Германия) растворяли в небольшом количестве бидистиллированной воды или в растворе Тироде, затем добавляли в солевой раствор до необходимой концентрации. Эффекты блокаторов регистрировали в течение 15–20 мин экспозиции, после чего проводили отмывание препарата до стационарного уровня.

Тетродотоксин (ТТХ) – гетероциклическое гуанидиновое соединение, являющееся сильным небелковым ядом естественного происхождения. ТТХ считается одним из наиболее специфичных токсинов, способных блокировать Na^+ -каналы (рис. 2.3.1). Однако существуют данные демонстрирующие, что у изолированных клеток желудочков собаки ТТХ блокировал медленный Ca^{2+} -ток L-типа ($\text{EC}_{50} = 55 \text{ мкМ}$) [Hegyí et al. 2012]. В то же время у изолированных клеток желудочков мыши ТТХ (60 мкМ) не проявлял ингибирующих свойств по отношению к этому току [Su et al., 2004]. Транзиторный Ca^{2+} -ток T-типа ($I_{\text{Ca,T}}$) [Sun et al., 2008] и поддерживаемый (sustained) направленный внутрь ток (I_{st}) [Kurata et al., 2002; Satoh, 2003] не чувствительны к ТТХ. Данные о влиянии ТТХ на другие ионные токи в литературе отсутствуют.

Концентрация ТТХ, использованная в данной работе, составила 25 мкМ. По литературным данным эта концентрация полностью блокирует изформы Na^+ -каналов $\text{Na}_v1.5$ и $\text{Na}_v1.1$ [Lei et al., 2004; Baruscotti, Robinson, 2007] и не ингибирует другие ионные каналы.

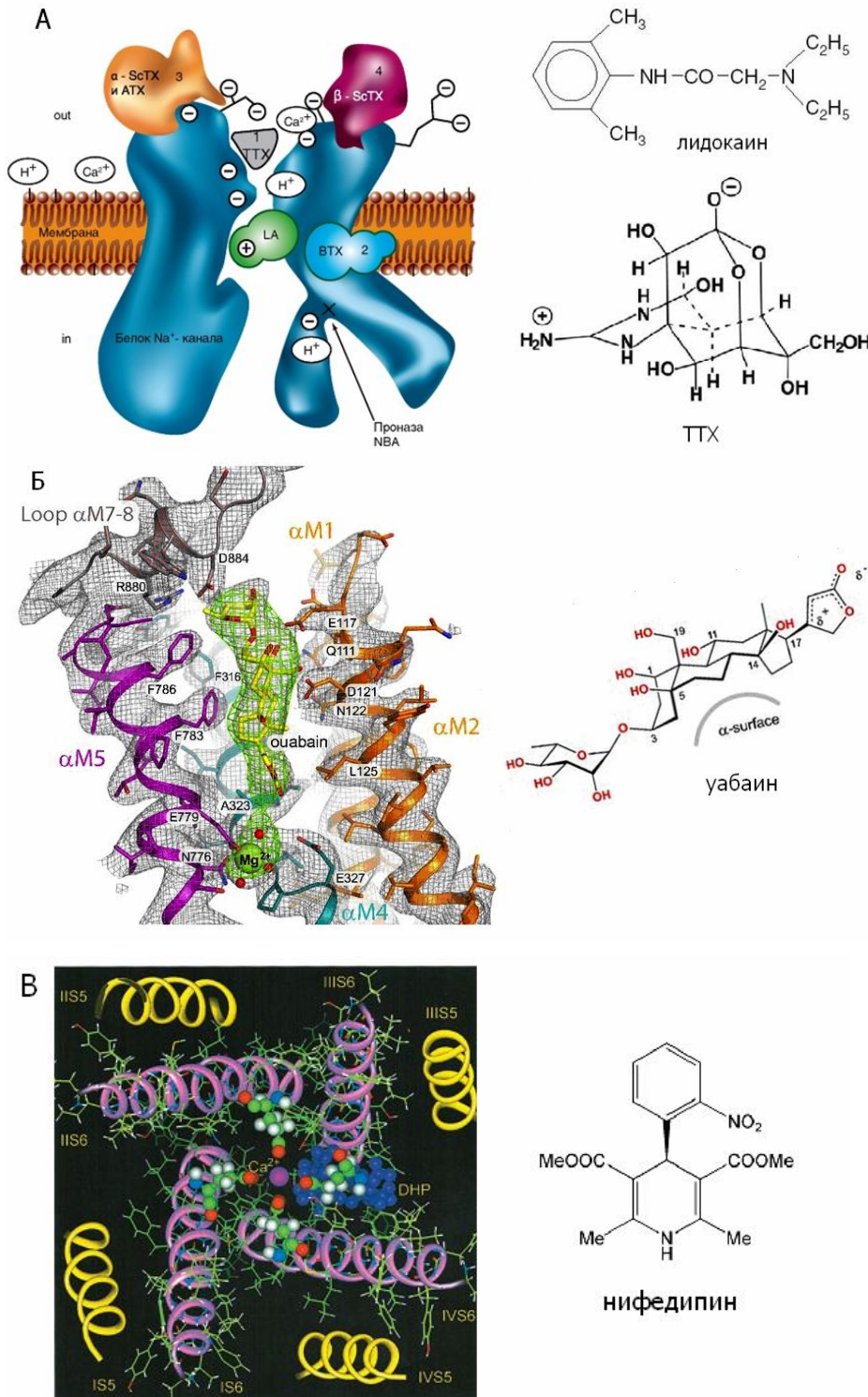


Рис. 2.3.1. Структура ионных каналов и химические формулы специфических блокаторов. А – модель белковой структуры Na⁺-канала и места связывания ТТХ (1ТТХ, серый цвет) и лидокаина (LA, зеленый цвет) [Камкин, Киселева, 2010]; Б – взаимодействие уабаина с каналом Na⁺/K⁺-насоса [Laursen et al., 2013]; В – ингибирование нифедипином (DHP, синий цвет) Ca²⁺-канала L-типа, вид сверху [Lipkind, Fozzard, 2003].

Лидокаин ((2-диэтиламино)-N-(2',6'-диметилфенил) ацетамид, ксикаин) представляет собой сложный амид с ароматическим радикалом и гидрофобным хвостом. Лидокаин, а также подобные вещества, такие как прокаин, бупивакаин относятся к классу лекарственных соединений, называемых местными анестетиками. Они широко используются как антиаритмические препараты (впервые лидокаин был использован в качестве антиаритмического препарата в 1950 году), а также как местные анестезирующие средства. Их эффект основан на обратимом блоке проведения импульса за счет ингибирования потенциалуправляемых Na^+ -каналов (рис. 2.3.1) [Sunami et al., 1997; Sheets et al., 2010; Вислобоков и др., 2012].

Эффекты лидокаина хорошо изучены на нервных клетках, но до сих пор не ясно, какое влияние он оказывает на генерацию ПД у клеток водителя ритма СП узла млекопитающих. При высоких концентрациях лидокаин теряет свою специфичность и может блокировать некоторые типы Ca^{2+} - и K^+ -каналов (EC_{50} для Ca^{2+} -каналов в нейронах крысы равно 2.8 мМ) [Sugiyama, Muteki, 1994; Gold et al., 1998; Scholz, 2002], но избирательность лидокаина к Na^+ -каналам в 10–80 раз выше, чем для K^+ - или Ca^{2+} -каналов [Scholz, 2002; Lingamaneni, Hemmings, 2003].

В данном исследовании концентрации лидокаина в экспериментах на СП узле мыши варьировали в следующем порядке: 12, 25, 50, 500 и 1000 мкМ/л. Для опытов на СП узле кролика диапазон исследуемых концентраций был следующий: 25, 50, 100, 500 и 1000 мкМ/л. Максимальная концентрация лидокаина составила 1000 мкМ, что значительно ниже, чем требуется для ингибирования K^+ - или Ca^{2+} -каналов.

Убаин (g-строфантин) относится к классу сердечных гликозидов и является специфическим блокатором Na^+/K^+ -АТФазы. Убаин представляет собой вещество растительного происхождения, которое обладает выраженным кардиотоническим действием и используется при лечении сердечной недостаточности и наджелудочковых аритмий [Zahler et al., 1992,

Болдырев, 2008; Ogawa et al., 2009]. Наиболее чувствительна к действию блокатора конформация E2, то есть активная форма фермента [Болдырев, 2008; Sandtner et al., 2011; Laursen et al., 2013; Miles et al., 2013]. После фосфорилирования Na^+/K^+ -АТФазы убаин связывается с внутренней частью канала по направлению к цитоплазме клетки между трансмембранными сегментами $\alpha\text{M1-5}$ и петлей $\alpha\text{M5-6}$ (рис. 2.3.1.). Сердечные гликозиды являются высокоспецифичными ингибиторами и на данный момент Na^+-K^+ -АТФаза является единственным известным рецептором для убаина [Zahler et al., 1992; Dostanic et al., 2003].

В опытах на СП узле кролика и мыши использовались следующие концентрации убаина: 1, 10 и 100 мкМ/л.

Нифедипин относится к группе лекарственных соединений 1,4-дигидропиридинов, широко используемых в кардиологии при лечении гипертонии и сердечно-сосудистых заболеваний [Lipkind, Fozzard, 2003]. Дигидропиридины действуют аллостерически, сдвигая модуль функционирования Ca^{2+} -каналов L-типа в направлении закрытого или открытого канала быстрее, чем закупоривают пору (рис. 2.3.1.). Рецепторный участок для этих веществ включает аминокислотные остатки в сегментах S6 в доменах III и IV и в сегменте S5 домена III [Камкин, Киселева, 2008]. Данных о влиянии нифедипина на другие ионные каналы в доступной литературе не обнаружено.

Концентрации нифедипина в опытах на СП узле у обоих видов животных варьировали в следующем порядке: 0.05, 0.1, 0.5, 1 и 2 мкМ/л.

Таким образом, выбранные концентрации блокаторов, являются высоко специфичными и не ингибируют другие ионные каналы. Это позволит выделить ионные токи фармакологически и оценить их вклад в формирование автоматизма.

2. 4. Расчет амплитудных, временных и скоростных параметров ПД

Электрофизиологическим выражением возбуждения сарколеммы клеток является потенциал действия, который может значительно отличаться

по своей конфигурации в пределах синусно-предсердного узла, поскольку его клетки неоднородны по своим электрофизиологическим характеристикам. Независимо от типа клетки, потенциал действия можно охарактеризовать амплитудными, временными и скоростными (значения первой производной амплитуды потенциала действия по времени) параметрами. Графическое определение основных электрических параметров мембранного потенциала клетки водителя ритма представлено на рис 2.4.1.

Амплитудные параметры отражают состояние сарколеммы. К ним относятся максимальный диастолический потенциал (E_{\max} , мВ), потенциал порога (ПП, мВ), амплитуда спонтанной деполяризации (СД, мВ), потенциал превышения или овершут (ОВ, мВ), амплитуда потенциала действия (АПД, мВ). Эти параметры могут снижаться при повреждении мембраны микроэлектродом.

Временные параметры характеризуют длительность пребывания мембраны в возбужденном состоянии, а также длительность пейсмекерного потенциала (фазы медленной диастолической деполяризации). У клеток водителя ритма выделяют фазу быстрой деполяризации («upstroke», фаза 0), фазу реполяризации (фаза 3) и фазу медленной диастолической деполяризации (фаза 4). Фаза начальной быстрой реполяризации (фаза 1) отсутствует, а фаза плато (фаза 2) слабо выражена. Границы между отдельными фазами устанавливали графически с помощью тангенциальных кривых, что позволяло однозначно разделять и характеризовать фазы ПД. Это важно для выявления межвидовых особенностей генерации ПД и анализа эффектов блокаторов. Отдельное внимание уделялась скоростным параметрам, в частности максимальной скорости нарастания потенциала действия в фазу 0 (dV/dt_{\max}). По изменению данного параметра можно судить о суммарном ионном токе, направленном внутрь клетки [Головко, 2009].

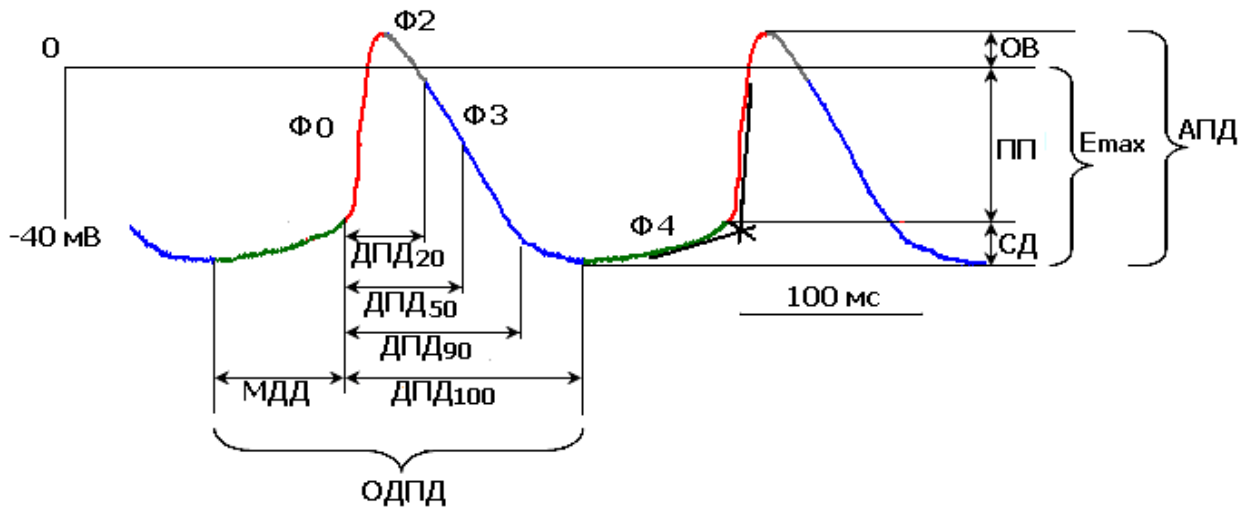


Рис. 2.4.1. Измерение основных амплитудных и временных параметров потенциала действия клеток водителя ритма сердца. Φ_0 – фаза быстрой деполяризации; Φ_2 – фаза «плато»; Φ_3 – фаза реполяризации; Φ_4 – фаза медленной диастолической деполяризации; E_{max} – максимальный диастолический потенциал; ПП – потенциал порога; СД – амплитуда спонтанной деполяризации; ОВ – овершут; АПД – амплитуда ПД; ДПД₂₀, ДПД₅₀, ДПД₉₀, ДПД₁₀₀ – длительность потенциала действия на уровне 20, 50, 90 и 100% реполяризации; МДД – длительность фазы медленной диастолической деполяризации; ОДПД – общая длительность ПД.

Для анализа зарегистрированных потенциалов действия выбирали участок записи, предварительно сохраненной на жестком диске компьютера в программе PowerGraph Professional версия 3.3 (DIsoft, РФ). Считывание параметров ПД производилось в программе PowerGraph Professional версия 3.3 (DIsoft, РФ), а также с помощью оригинальных программ вычисления параметров потенциалов действия и построения дозозависимых кривых в программной среде Delphy, разработанной старшим научным сотрудником Института физиологии Коми НЦ УрО РАН к.б.н. Артеевой Н. В. Полученные данные обрабатывались с помощью программы Microsoft Office Excel.

Измеряли и анализировали следующие параметры потенциалов действия: амплитуда потенциала действия (АПД), овершут (ОВ), максимальный диастолический потенциал (E_{max}), потенциал порога (ПП), амплитуда спонтанной деполяризации (СД), длительность пика потенциала действия на уровне 20 (ДПД₂₀), 50 (ДПД₅₀), 90 (ДПД₉₀) и 100% (ДПД₁₀₀) реполяризации, длительность медленной диастолической деполяризации

(МДД, фаза 4), длительность общего цикла генерации потенциалов действия (ОДПД) или частота спонтанных сокращений (ЧСС), максимальная скорость нарастания потенциала действия в фазу 0 (dV/dt_{\max}), средняя скорость диастолической деполяризации (V_4). Границу между диастолической деполяризацией (фаза 4) и быстрой (фаза 0) определяли графически: строили касательные, а с точки их пересечения опускали перпендикуляр (рис. 2.4.1.) [Головко, 1989].

Значимость различий параметров потенциала действия определяли в программе BIOSTAT 4.03. Использовали непараметрический критерий Вилкоксона для связанных выборок и U-критерий Манна-Уитни для несвязанных. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Результаты представлены в виде средней арифметической \pm стандартное отклонение ($M \pm \sigma$). Выбранный методический подход позволил успешно решить все задачи, поставленные в данном исследовании.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3. 1. Общая характеристика основных электрофизиологических параметров ПД синусно-предсердной области

Многоклеточные препараты СП области мыши и кролика включали СП узел, содержащий клетки водителя ритма, поперечный гребешок (*crista terminalis*), фрагменты верхней и нижней полых вен и межпредсердной перегородки. Регистрацию ПД проводили со стороны субэндокарда вдоль артерии СП узла в центре между верхней и нижней полыми венами [Головко, 2009; Гонотков, Головко, 2011]. Стоит отметить, что СП узел кролика по площади значительно больше, чем у мыши, поэтому у препаратов СП узла кролика практически не зарегистрированы ПД рабочего миокарда предсердий (рис. 3.1.1.; рис. 3.1.2.). Частота генерации ПД многоклеточных препаратов СП области мыши в контрольном растворе составила ~ 300 имп/мин, у препаратов СП узла кролика почти в три раза медленнее – 110 имп/мин (табл. 3.1.1.).

3.1.1. Характеристика ПД клеток СП области мышцы

В зависимости от места регистрации, потенциалы действия клеток водителя ритма мышцы различались по своей конфигурации и скорости фазы быстрой деполяризации (dV/dt_{\max}). В пределах зоны СП узла мышцы dV/dt_{\max} варьировала от 1.5 до 90 В/с (рис. 3.1.1.). Клетки с диастолической деполяризацией, имеющие самую медленную dV/dt_{\max} ПД (от 1.5 до 8 В/с, $n=30$), располагались вдоль артерии СП узла в ~ 100 мкм от поперечного гребешка. При перемещении регистрирующего микроэлектрода вверх или вниз вдоль артерии СП узла скорость фазы быстрой деполяризации постепенно возрастала и составила 26 ± 13.6 В/с ($n=30$). На границе с поперечным гребешком и в области верхней и нижней полых вен зарегистрированы ПД, имеющие $dV/dt_{\max} = 60-95$ В/с (74 ± 21 В/с, $n=5$). В зоне поперечного гребешка и межпредсердной перегородки у ПД фаза медленной диастолической деполяризации отсутствовала, а скорость фазы быстрой деполяризации составила 152 ± 28 В/с ($n=22$, рис.3.1.1.; табл. 3.1.1.).

На основе электрофизиологических характеристик ПД и места регистрации, клетки СП узла мышцы были условно разделены на три типа: клетки с медленной диастолической деполяризацией, работающие в режиме истинного и скрытого водителей ритма и клетки сократительного миокарда предсердий (табл. 3.1.1.).

Потенциалы действия клеток типа истинного водителя ритма имели $dV/dt_{\max} < 8$ В/с (в среднем 3.0 ± 1.5 В/с, $n=30$), наибольшую длительность потенциала действия на уровне 20%, 50% и 90% реполяризации и плавный переход от фазы медленной диастолической деполяризации (фаза 4) к фазе быстрой деполяризации (фаза 0) (рис. 3.1.1.; табл. 3.1.1.). Потенциалы действия с медленной диастолической деполяризацией, но с более высоким значением dV/dt_{\max} (> 9 В/с, в среднем 26 ± 13.6 В/с, $n=30$) и амплитудой ПД, менее продолжительным пиком ПД и более низкой скоростью диастолической деполяризации рассматривали, как ПД клеток, работающих в режиме скрытого водителя ритма.

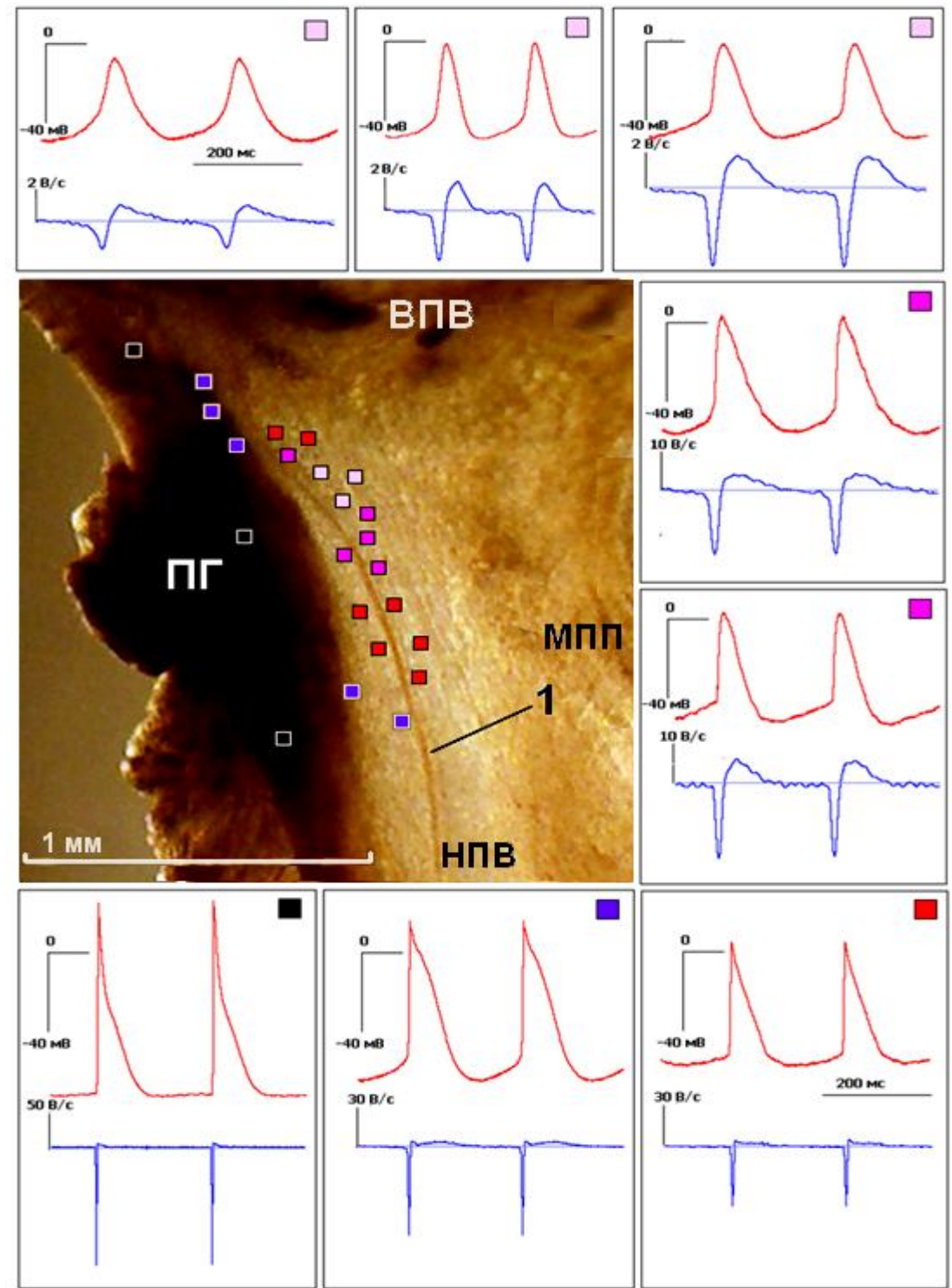


Рис. 3.1.1. Фото многоклеточного препарата СП области мыши (вид со стороны субэндокарда), примеры ПД и первая производная, характеризующая скорость фазы быстрой деполяризации (dV/dt_{\max}). Квадратиками отмечены точки регистрации ПД: \square – ПД с $dV/dt_{\max} = 1.5\text{--}8\text{ V/c}$; \blacksquare – ПД с $dV/dt_{\max} = 9\text{--}20\text{ V/c}$; \blacksquare – ПД с $dV/dt_{\max} = 20\text{--}40\text{ V/c}$; \blacksquare – ПД с dV/dt_{\max} выше 40 V/c , но имеющие фазу МДД; \blacksquare – ПД сократительного миокарда предсердия с dV/dt_{\max} выше 100 V/c . Примечания: **ВПВ** – верхняя полая вена, **НПВ** – нижняя полая вена, **ПГ** – поперечный гребешок; **МПП** – межпредсердная перегородка; **1** – артерия СП узла. Микроэлектродная идентификация клеток СП узла мыши была проведена аналогично, как изложено в работе Golovko et al. [Golovko et al., 2015].

Электрофизиологические характеристики ПД клеток синусно-предсердной области сердца мыши и кролика

Параметры ПД	Клетки СП области мыши			Клетки СП области кролика	
	Истинный водитель ритма n=30	Скрытый водитель ритма n=30	Клетки рабочего миокарда n=22	Истинный водитель ритма n=12	Скрытый водитель ритма n=12
E_{max}, мВ	-59±8	-63±13	-	-64±5*	-73±5
ОВ, мВ	-	-	19±8	9±6	10±6
АПД, мВ	43±5**	55±7	96±7**	68±5*	81±7
СД, мВ	7±2	6±3	-	12±5	11±4
ПП, мВ	-53±8	-57±13	-77±6**	-53±7*	-62±8
ДПД₂₀, мс	50±11**	26±11	6±1**	110±21	104±17
ДПД₅₀, мс	66±12**	49±11	14±5**	156±23	147±17
ДПД₉₀, мс	95±15**	85±23	54±13**	215±32	199±27
ДПД₁₀₀, мс	127±20	122±23	103±19	275±41	258±35
ЧСС, имп/мин	295±28	292±34	305±27	108±10	116±18
МДД, мс	80±18	86±18	-	283±43	281±65
dV/dt_{max}, В/с	3.0±1.5** (1.5÷7)	26±13.6 (11÷50)	152±28** (100÷200)	5.1±2.2** (2÷8)	24±8 (9÷40)
V₄, мВ/с	85±21*	67±20	-	42±14	39±8

Примечание. E_{max} – максимальный диастолический потенциал; ОВ – овершут; АПД – амплитуда ПД; СД – амплитуда спонтанной деполяризации; ПП – потенциал порога; ДПД₂₀, ДПД₅₀, ДПД₉₀ и ДПД₁₀₀ – длительность потенциала действия на уровне 20%, 50%, 90% и 100% реполяризации; ЧСС – частота генерации ПД; МДД – длительность медленной диастолической деполяризации; dV/dt_{max} – скорость фазы быстрой деполяризации; V₄ – скорость медленной диастолической деполяризации.

* – p<0.05 и ** – p<0.01, достоверность различий по сравнению с клетками, работающими в режиме скрытого водителя ритма мыши и кролика соответственно.

Клетки сократительного миокарда предсердий регистрировали в зоне поперечного гребешка (*crista terminalis*), в области нижней полой вены и рядом с межпредсердной перегородкой. Эти клетки имели более отрицательный максимальный диастолический потенциал (E_{max}), самую высокую амплитуду ПД и овершут. Скорость фазы быстрой деполяризации у этого типа клеток составила 152±28 В/с (рис. 3.1.1.; табл. 3.1.1.).

Таким образом, распределение клеток в СП области мышцы соответствует градиентной модели, как ранее было показано для крысы [Сутягин, 2009] и кролика [Zhang et al., 2001] и соотноситься с ранее полученными данными [Golovko et al., 2015]. В контрольном растворе скорость фазы быстрой деполяризации у клеток типа истинного водителя ритма (клетки центральной области) составила 3.0 ± 1.5 В/с (1.5 – 8 В/с), у клеток типа скрытого водителя ритма (клетки периферии) – 26 ± 13.6 В/с (9–50 В/с).

3. 1. 2. Характеристика ПД клеток СП узла кролика

По аналогии с клетками водителя ритма мышцы, клетки СП узла кролика были разделены на два типа: клетки, работающие в режиме истинного и скрытого водителей ритма.

Потенциалы действия клеток типа истинного водителя ритма, зарегистрированные вдоль артерии СП узла на расстоянии ~ 0.8 мм от поперечного гребешка (центральная зона), имели скорость фазы быстрой деполяризации от 2 до 8 В/с (в среднем 5.1 ± 2.2 В/с). Потенциалы действия с более отрицательным максимальным диастолическим потенциалом, более высокой амплитудой ПД и скоростью фазы быстрой деполяризации от 9 до 40 В/с (в среднем 25.5 ± 11.6 В/с) идентифицировали как ПД клеток, работающих в режиме скрытого водителя ритма (рис. 3.1.2.; табл. 3.1.1.). Такие ПД регистрировали при перемещении электрода на ~ 0.5 мм в направлении верхней и нижней полых вен от центральной зоны. На границе с поперечным гребешком, межпредсердной перегородкой и в области нижней полых вен зарегистрированы ПД с медленной диастолической деполяризацией с коротким пиком ПД и dV/dt_{\max} равной от 60 до 105 В/с (в среднем 75 ± 16 В/с, $n=6$). По своей конфигурации ПД этих клеток напоминали клетки рабочего миокарда предсердия, но имели медленную диастолическую деполяризацию (рис. 3.1.2.) и, скорей всего, относились к ПД клеток правого синусно–предсердного проводящего пучка.

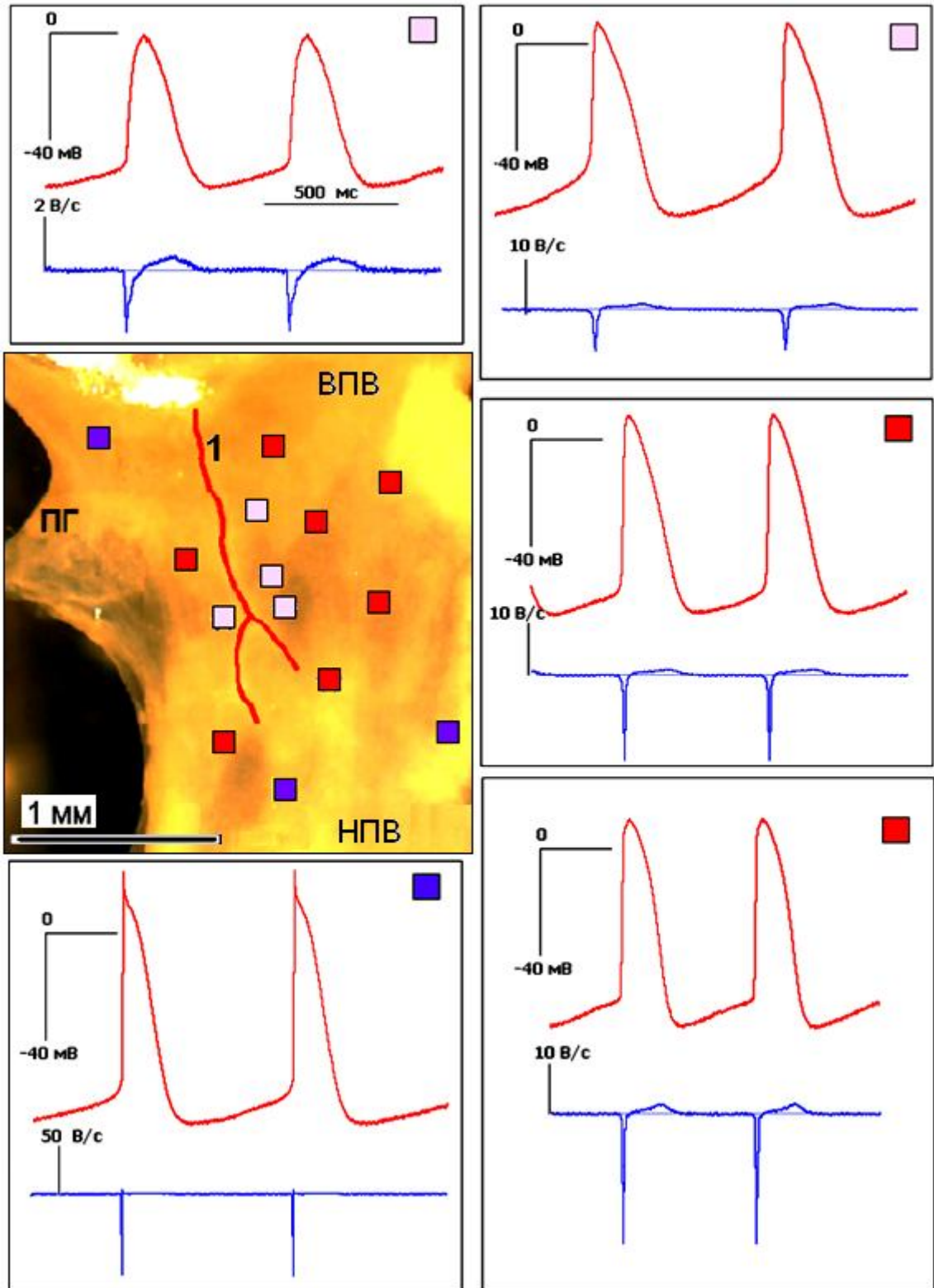


Рис. 3.1.2. Фото многоклеточного препарата СП области кролика (вид со стороны субэндокарда), примеры ПД и первая производная. Квадратиками отмечены точки регистрации ПД: \square – ПД с $dV/dt_{\max} = 2-8$ В/с; \blacksquare – ПД с $dV/dt_{\max} = 9-40$ В/с; \blacksquare – ПД с dV/dt_{\max} выше 50 В/с, Примечания: **ВПВ** – верхняя полая вена, **НПВ** – нижняя полая вена, **ПГ** – поперечный гребешок; **МПП** – межпредсердная перегородка; **1** – артерия СП узла.

Таким образом, в контрольных условиях у мыши и кролика зарегистрированы ПД с медленной диастолической деполяризацией, которые были разделены на ПД клеток, работающих в режиме истинного и скрытого водителей ритма. Скорость фазы быстрой деполяризации (dV/dt_{\max}), характеризующая входящий суммарный ток, у клеток мыши и кролика имели сопоставимые величины. При обработке экспериментальных данных, эффекты блокаторов на клетки истинного и скрытого водителей ритма анализировались отдельно, чтобы установить возможные различия. Потенциалы действия с фазой МДД, но имеющие высокую скорость фазы 0 (> 50 В/с) и зарегистрированные у мыши и кролика на периферии СП узла, а так же ПД рабочего миокарда предсердий мыши в дальнейшем в этом исследовании не рассматривались.

3. 2. Изменение морфологии ПД при блокировании Na^+ -каналов

Подробный анализ научной литературы дает основание предположить, что входящий Na^+ -ток может вносить заметный вклад в формирование фазы быстрой деполяризации ПД у клеток СП узла с самой медленной dV/dt_{\max} . Вероятно, участие наряду с Ca^{2+} -током L-типа, Na^+ -тока повышает надежность генерирования ПД у клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма сердца млекопитающих. Для проверки этой гипотезы мы исследовали эффекты специфических блокаторов Na^+ -каналов (лидокаин, ТТХ) на величину dV/dt_{\max} – показателя суммарного входящего тока во время фазы быстрой деполяризации ПД. Одновременно анализировали влияние блокаторов на основные электрофизиологические параметры ПД клеток в области артерии СП узла.

3. 2. 1. Эффекты ТТХ на генерацию ПД клеток СП узла мыши

С целью оценки роли Na^+ -тока в формировании ПД клеток водителя ритма мыши исследовано влияние ТТХ в концентрации 25 мкМ на электрофизиологические параметры ПД. Тетродотоксин является одним из

самых распространенных блокаторов, который используют при анализе электрической активности потенциал-управляемых Na^+ -каналов.

Эффекты ТТХ на параметры ПД клеток истинного водителя ритма.

При добавлении ТТХ (25 мкМ, $n=3$) в экспериментальную камеру у клеток типа истинного водителя ритма зарегистрировано снижение амплитуды ПД на 27% и замедление скорости фазы быстрой деполяризации на 50%. Длительность фазы медленной диастолической деполяризации увеличивалась на 72%, а ее скорость снижалась на 55%. При этом частота генерации ПД замедлялась на 30% (рис. 3.2.1.1., табл. 3.2.1.1.).

Стоит отметить, что у двух из трех препаратов СП области мышцы отмечено увеличение ДПД₂₀ и ДПД₁₀₀ на 30% и 41% соответственно. После удаления ТТХ из перфузирующего раствора восстановление генерации ПД до стационарного уровня происходило в течение 5–10 мин.

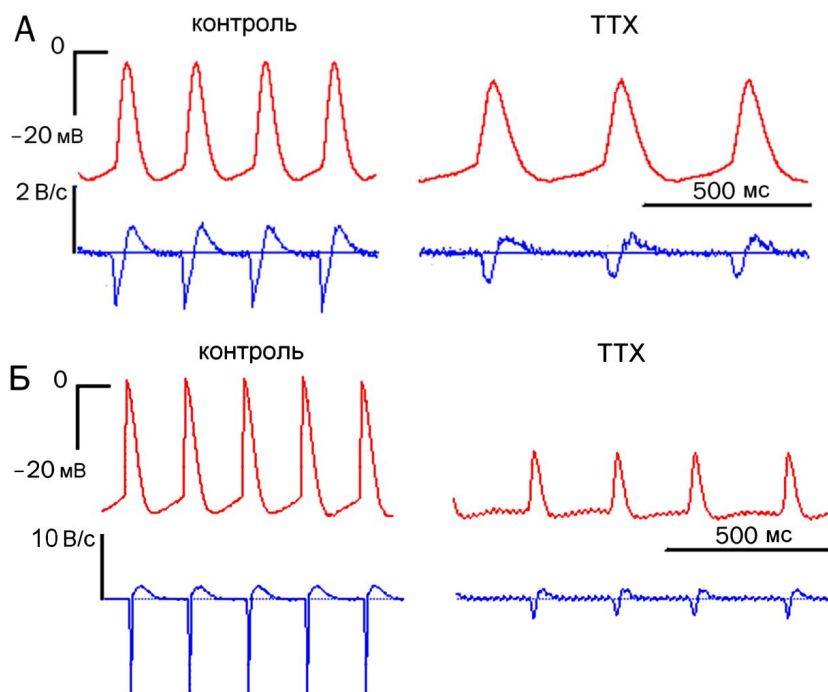


Рис. 3.2.1.1. Изменение конфигурации ПД и скорости нарастания переднего фронта ПД в фазу 0 (dV/dt_{\max}) клеток типа истинного (А) и скрытого (Б) водителей ритма у препаратов СП узла мышцы при экспозиции ТТХ (25 мкМ).

**Влияние ТТХ на электрофизиологические характеристики ПД
клеток водителя ритма СП области сердца мыши**

Параметры ПД	Контроль ИВР (n=3)	ТТХ 25 мкМ (n=3)	Контроль СВР (n=3)	ТТХ 50 мкМ (n=3)
E_{max} , мВ	-49±11	-49±9	-48±7	-43±4
АПД, мВ	30±5	22±5*	44±4	20±2**
СД, мВ	6±3	5±1	4±1	4±1
ПП, мВ	-43±9	-45±9	-44±6	-40±4
ДПД ₂₀ , мс	52±3	65±17	29±10	34±14
ДПД ₅₀ , мс	68±3	82±20	44±7	54±19
ДПД ₉₀ , мс	93±6	112±27	68±9	74±20
ДПД ₁₀₀ , мс	129±2	157±20	114±26	100±27
ЧСС, имп/мин	268±19	189±36**	294±20	213±30
МДД, мс	98±20	169±7**	92±29	188±22**
dV/dt_{max} , В/с	1.6±0.1	0.8±0.3**	13±2	1.8±0.3**
V_4 , мВ/с	63±25	28±4	50±16	19±4**

Примечание. E_{max} – максимальный диастолический потенциал; ОВ – овершут; АПД – амплитуда ПД; СД – амплитуда спонтанной деполяризации; ПП – потенциал порога; ДПД₂₀, ДПД₅₀, ДПД₉₀ и ДПД₁₀₀ – длительность потенциала действия на уровне 20, 50, 90 и 100% реполяризации; ЧСС – частота генерации ПД; МДД – длительность медленной диастолической деполяризации; dV/dt_{max} – скорость фазы быстрой деполяризации; V_4 – скорость медленной диастолической деполяризации (фаза 4).

** – $p < 0.01$, * – $p < 0.05$ достоверность различий по сравнению с контролем.

Эффекты ТТХ на параметры ПД клеток скрытого водителя ритма

У клеток, работающих в режиме скрытого водителя ритма, ТТХ (25 мкМ, n=3) снижал амплитуду ПД на 55% и замедлял скорость фазы быстрой деполяризации на 87%. Длительность МДД увеличивалась в два раза, а ее скорость замедлялась на 62%. В результате чего, частота генерации ПД снижалась на 28% (рис. 3.2.1.1.).

Таким образом, у клеток типа истинного и скрытого водителя ритма СП узла мыши скорость фазы быстрой деполяризации оказалась наиболее чувствительна к ТТХ. При этом скорость фазы быстрой деполяризации клеток типа истинного водителя ритма в 1.7 раза устойчивее к действию блокатора, чем у клеток типа скрытого водителя ритма. Частота генерации ПД у обоих типов пейсмекерных клеток снижалась на треть в основном за счет увеличения длительности медленной диастолической деполяризации.

3. 2. 2. Эффекты лидокаина на морфологию ПД клеток СП узла МЫШИ

Нами исследован дозозависимый эффект лидокаина в диапазоне концентраций от 12 до 1000 мкМ на основные электрофизиологические характеристики ПД клеток с различной dV/dt_{\max} у двух видов млекопитающих – кролика и мыши. Лидокаин является одним из наиболее доступных специфических блокаторов потенциал–управляемых Na^+ -каналов и широко используется в практической медицине как локальный анестетик.

Эффекты лидокаина на клетки типа истинного водителя ритма
Лидокаин в концентрации 12 мкМ не оказывал влияния на параметры ПД клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма. Повышение концентрации лидокаина от 12 до 25 мкМ (n=5) приводило к замедлению скорости фазы быстрой деполяризации от 2.6 ± 0.8 до 1.4 ± 0.3 В/с (на 46%). Зарегистрировано увеличение длительности ДПД₂₀ на 52% и ДПД₉₀ на 27%. В результате частота генерации ПД у клеток истинного водителя ритма замедлялась в среднем на 17% (рис. 3.2.2.1., табл. 3.2.2.1) по сравнению с контролем.

Лидокаин в концентрации 50 мкМ (n=6) приводил к дальнейшему снижению dV/dt_{\max} от 2.6 ± 0.8 до 1 ± 0.2 В/с (на 62%). Длительность фазы медленной диастолической деполяризации увеличивалась от 70 ± 22 до 101 ± 19 мс (на 42%), а ее скорость замедлялась от 73 ± 26 до 59 ± 18 мВ/с (на 20%). Эффекты блокатора на фазу реполяризации (ДПД₂₀, ДПД₉₀) были аналогичны, полученным при концентрации лидокаина 25 мкМ. Частота генерации ПД замедлялась на 23% (табл. 3.2.2.1.) по сравнению с контролем.

При дальнейшем повышении концентрации лидокаина от 50 до 500 мкМ (n=3) амплитуда ПД снижалась в два раза, dV/dt_{\max} замедлялась на 71% и наблюдали расщепление переднего фронта ПД (рис. 3.2.2.1.). Длительность фазы медленной диастолической деполяризации увеличивалась на 88%, а ее скорость замедлялась на 64%. В результате частота генерации ПД снижалась на 37% по сравнению с контролем.

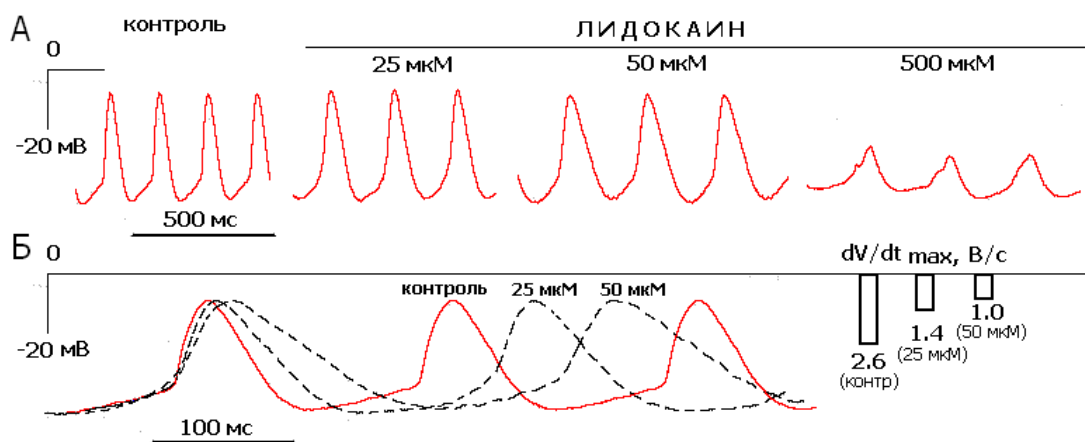


Рис. 3.2.2.1. Изменение конфигурации ПД типа истинного водителя ритма многоклеточных препаратов СП узла мышцы при экспозиции лидокаина. А – потенциалы действия клеток в нормальном растворе и при добавлении лидокаина разных концентраций. Б – потенциалы действия и изменение первой производной ПД (dV/dt_{max}) тех же клеток, что приведены на А.

Таблица 3.2.2.1.

Влияние лидокаина на электрофизиологические характеристики ПД клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма, СП области сердца мышцы

Параметры ПД	Контроль (n=5)	Лидокаин 25 мкМ (n=5)	Контроль (n=6)	Лидокаин 50 мкМ (n=6)
E_{max} , мВ	-54 ± 7	-53 ± 7	-50 ± 6	-47 ± 9
АПД, мВ	40 ± 10	34 ± 9	33 ± 5	28 ± 7
СД, мВ	8 ± 4	10 ± 3	5 ± 1	6 ± 1
ПП, мВ	-46 ± 7	-43 ± 9	-46 ± 6	-41 ± 9
ДПД ₂₀ , мс	44 ± 10	$67 \pm 11^*$	47 ± 13	$69 \pm 14^*$
ДПД ₅₀ , мс	65 ± 14	$88 \pm 13^*$	68 ± 14	$89 \pm 10^*$
ДПД ₉₀ , мс	90 ± 15	$114 \pm 19^*$	96 ± 15	$118 \pm 10^*$
ДПД ₁₀₀ , мс	118 ± 22	$144 \pm 23^*$	132 ± 17	$156 \pm 23^*$
ЧСС, имп/мин	303 ± 40	$252 \pm 36^{**}$	302 ± 28	$232 \pm 18^{**}$
МДД, мс	86 ± 19	92 ± 18	71 ± 22	$101 \pm 19^*$
dV/dt_{max} , В/с	2.6 ± 0.5	$1.4 \pm 0.3^{**}$	2.6 ± 0.7	$1.0 \pm 0.3^{**}$
V_4 , мВ/с	95 ± 37	113 ± 35	73 ± 16	$59 \pm 18^*$

Примечание. E_{max} – максимальный диастолический потенциал; ОВ – овершут; АПД – амплитуда ПД; СД – амплитуда спонтанной деполяризации; ПП – потенциал порога; ДПД₂₀, ДПД₅₀, ДПД₉₀ и ДПД₁₀₀ – длительность потенциала действия на уровне 20, 50, 90 и 100% реполяризации; ЧСС – частота генерации ПД; МДД – длительность медленной диастолической деполяризации; dV/dt_{max} – скорость фазы быстрой деполяризации; V_4 – скорость медленной диастолической деполяризации (фаза 4).

** – $p < 0.01$, * – $p < 0.05$ достоверность различий по сравнению с контролем.

Увеличение концентрации лидокаина от 500 до 1000 мкМ приводило к прекращению электрической активности у многоклеточных препаратов СП узла мышцы. Эффекты лидокаина обратимы. Генерирование ПД возобновлялось через 20–30 мин после помещения препарата СП области в нормальный раствор.

Анализ зависимости изменения скорости фазы 0 (dV/dt_{\max}) ПД от концентрации лидокаина выявил, что полученные данные соответствуют кривой, заданной уравнением Хилла (рис. 3.2.2.2). Пороговая концентрация лидокаина для скорости фазы быстрой деполяризации у клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма, составила ~ 20 мкМ. Концентрация, при которой данный параметр снижался на 50% (EC_{50}), равна ~ 35 мкМ.

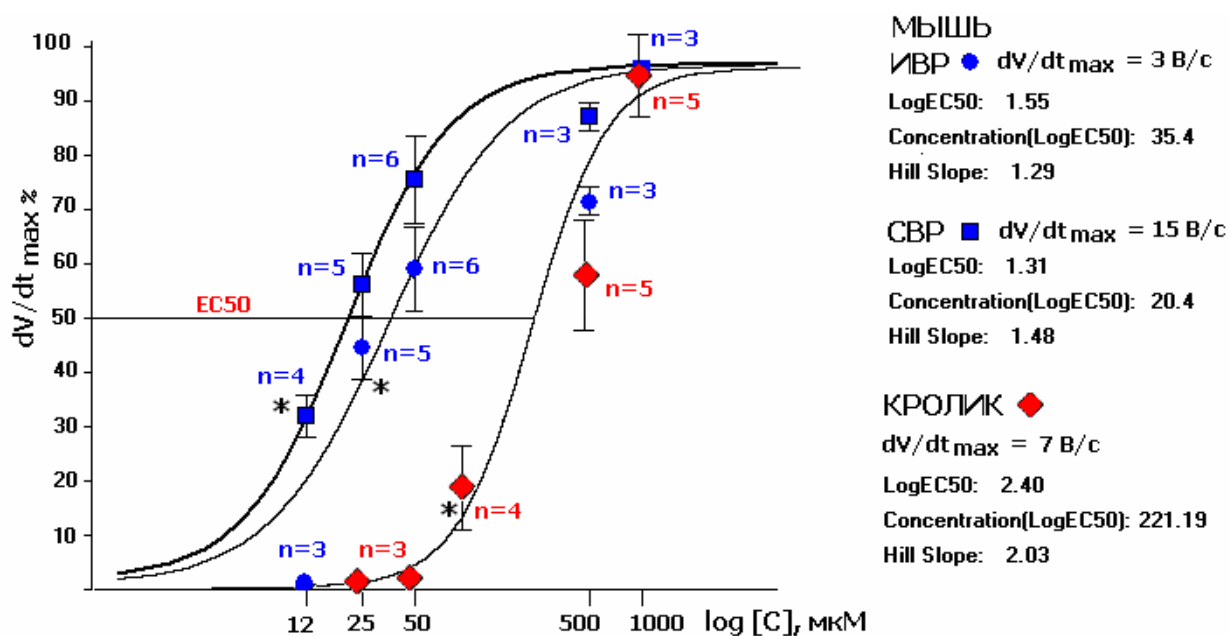


Рис. 3.2.2.2. Блокирование скорости фазы быстрой деполяризации (dV/dt_{\max}) ПД клеток типа истинного и скрытого водителей ритма СП узла мышцы и пейсмекерных клеток кролика в зависимости от концентрации лидокаина. Сплошные линии соответствуют значениям, вычисленным по уравнению Хилла. Значения приведены как $M \pm \sigma$; * – достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

Таким образом, лидокаин существенно влиял на длительность пика ПД, замедлял dV/dt_{\max} и скорость фазы МДД, увеличивая частоту генерации ПД в среднем на 20%. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии в клетках истинного водителя ритма СП узла мыши Na^+ -тока, чувствительного к лидокаину. Эти клетки генерировали ПД с самой низкой dV/dt_{\max} в фазу 0.

Эффекты лидокаина на клетки типа скрытого водителя ритма
Экспозиция лидокаина 12 мкМ ($n=4$) у клеток скрытого водителя ритма СП узла мыши вызывала снижение скорости нарастания ПД в фазу 0 на 33%. Зарегистрировано увеличение длительности ПД на уровне 20 и 90% реполяризации на 60% и 23% соответственно. В результате частота генерации ПД снижалась на 11% по сравнению с контролем.

Повышение концентрации лидокаина от 12 до 25 мкМ ($n=5$) приводило к дальнейшему замедлению dV/dt_{\max} на 59% по сравнению с контролем и на 24% по сравнению с 12 мкМ. Длительность фазы медленной диастолической деполяризации увеличилась от 89 ± 15 до 121 ± 12 мс (на 36%), а V_4 замедлялась от 63 ± 15 до 46 ± 12 мВ/с (на 27%). Длительность ПД на уровне 20 и 90% реполяризации изменялась аналогично, как было зарегистрировано при 12 мкМ лидокаина. В результате этого частота генерации ПД снижалась на 24% по сравнению с контролем (табл. 3.2.2.2.).

Лидокаин в концентрации 50 мкМ ($n=6$) вызывал снижение амплитуды ПД на 20% и dV/dt_{\max} на 77%. Зарегистрировано увеличение длительности ДПД₂₀ в два раза (от 27 ± 8 до 53 ± 13 мс) и ДПД₉₀ на 46% (от 70 ± 11 до 102 ± 15 мс). Фаза медленной диастолической деполяризации изменялась так же, как было зарегистрировано при 25 мкМ лидокаина (табл. 3.2.2.2.). В результате частота генерации ПД снижалась на 30% по сравнению с контролем.

Повышение концентрации лидокаина от 50 до 500 мкМ ($n=3$) приводило к снижению амплитуды ПД на 35% и замедлению скорости фазы быстрой деполяризации на 89% (табл. 3.2.2.2.; рис. 3.2.2.3.). Длительности ДПД₂₀ и ДПД₉₀ увеличивались в три и в два раза соответственно.

Зарегистрировано увеличение продолжительности фазы 4 и снижение V_4 в два раза по сравнению с контролем. В результате этого частота генерации ПД замедлялась вдвое. На пятой минуте экспозиции отмечено нарушение формирования переднего фронта ПД, однако полного блока генерации ПД не зарегистрировано (рис. 3.2.2.3.).

Таблица 3.2.2.2.

Влияние лидокаина на электрофизиологические характеристики ПД клеток, работающих в режиме скрытого водителя ритма, СП области сердца мыши

Параметры ПД	Контроль (n=5)	Лидокаин 25 мкМ (n=5)	Контроль (n=6)	Лидокаин 50 мкМ (n=6)
E_{max} , мВ	-55±6	-51±7	-50±6	-49±6
АПД, мВ	44±7	40±10	40±5	32±5*
СД, мВ	6±1	6±2	5±1	5±2
ПП, мВ	-50±6	-43±3	-44±7	-44±7
ДПД ₂₀ , мс	30±5	45±6*	27±8	53±13**
ДПД ₅₀ , мс	50±13	67±12*	45±9	71±10**
ДПД ₉₀ , мс	78±15	97±10*	70±11	102±15**
ДПД ₁₀₀ , мс	111±26	144±23*	104±20	152±32**
ЧСС, имп/мин	300±40	229±28**	312±39	218±32**
МДД, мс	89±15	121±12*	92±19	127±30**
dV/dt_{max} , В/с	15.2±7.0	6.3±2.8**	15.4±5.5	3.6±2.0**
V_4 , мВ/с	63±15	46±12*	61±17	45±15*

Примечание. E_{max} – максимальный диастолический потенциал; ОВ – овершут; АПД – амплитуда ПД; СД – амплитуда спонтанной деполяризации; ПП – потенциал порога; ДПД₂₀, ДПД₅₀, ДПД₉₀ и ДПД₁₀₀ – длительность потенциала действия на уровне 20, 50, 90 и 100% реполяризации; ЧСС – частота генерации ПД; МДД – длительность медленной диастолической деполяризации; dV/dt_{max} – скорость фазы быстрой деполяризации; V_4 – скорость медленной диастолической деполяризации (фаза 4).

** – $p < 0.01$, * – $p < 0.05$ достоверность различий по сравнению с контролем.

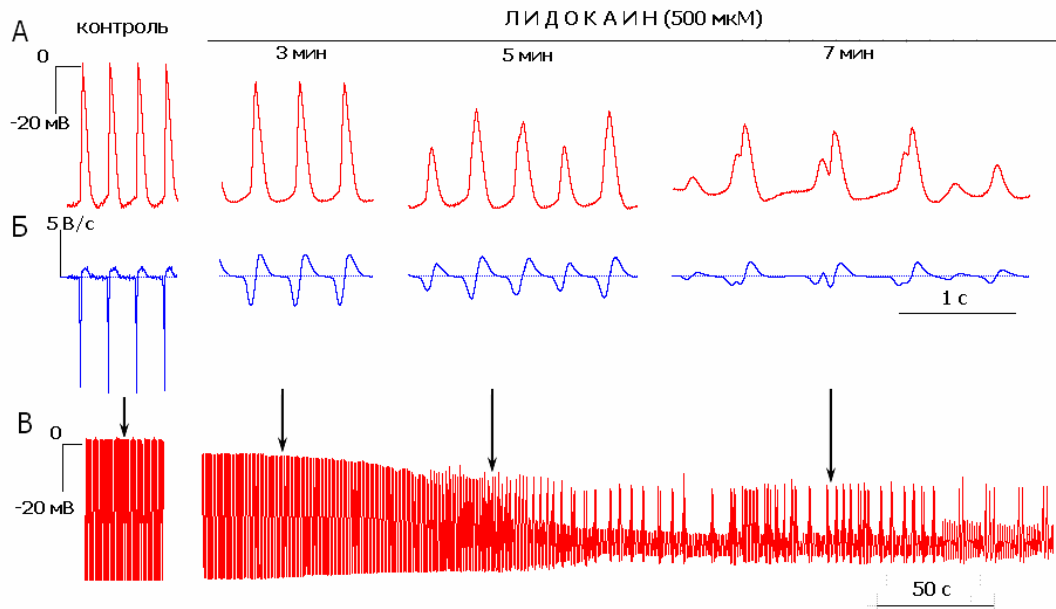


Рис. 3.2.2.3. Развитие эффектов лидокаина (500 мкМ) на потенциалы действия клеток, работающих в режиме скрытого водителя ритма СП узла мыши. А – изменение конфигурации ПД; Б – изменение первой производной ПД; В – запись ПД при сжатой временной шкале.

По результатам экспериментов построена кривая зависимости изменения скорости фазы быстрой деполяризации клеток, работающих в режиме скрытого водителя ритма, от концентрации лидокаина (рис. 3.2.2.2.). Анализ дозозависимой кривой показал, что пороговая концентрация лидокаина для клеток со средней $dV/dt_{\max}=16$ В/с составляет ~ 10 мкМ. Концентрация блокатора, при которой данный параметр снижается на 50%, равна ~ 20 мкМ.

Таким образом, у клеток, работающих в режиме скрытого водителя ритма, лидокаин дозозависимо замедлял скорость фазы быстрой деполяризации, что сопровождалось снижением амплитуды ПД, увеличением длительности $ДПД_{20}$ и замедлением частоты генерации ПД на 25–30%.

У обоих типов пейсмекерных клеток СП узла мыши скорость фазы быстрой деполяризации продемонстрировала высокую чувствительность к лидокаину. Снижение данного параметра соответствовало дозозависимой кривой. Эффекты лидокаина сильнее (в 1.7 раза) выражены у клеток с высокой dV/dt_{\max} (16 В/с), чем у клеток с $dV/dt_{\max} \sim 3$ В/с. Замедление dV/dt_{\max}

у клеток типа скрытого водителя ритма сопровождалось снижением амплитуды ПД и более существенным увеличением длительности ДПД₂₀ по сравнению с клетками типа истинного водителя ритма. На остальные параметры ПД (ДПД₉₀, длительность и скорость МДД, ЧСС) у обоих типов клеток водителя ритма лидокаин оказывал идентичные эффекты [Головко, Лебедева, 2013].

Проведенные нами эксперименты с ТТХ и лидокаином, продемонстрировали высокую чувствительность клеток водителя ритма СП узла мышцы к этим блокаторам. Эффекты ТТХ и лидокаина на скорость фазы быстрой деполяризации, характеризующей суммарный выходящий ток во время фазы 0, идентичны. Эти данные свидетельствуют о том, что входящий Na⁺-ток вносит заметный вклад в формирование фазы быстрой деполяризации ПД у клеток водителя ритма мышцы.

3. 2. 3. Эффекты лидокаина на морфологию ПД клеток СП узла кролика

Для оценки роли Na⁺-тока в формировании ПД клеток водителя ритма кролика использовали экспериментальный протокол, который ранее применяли для препаратов СП узла мышцы. Скорость фазы быстрой деполяризации у клеток СП узла кролика в контроле составила ~ 7 В/с, а частота генерации ПД ~ 100 имп/мин.

Лидокаин в концентрации 25 и 50 мкМ не оказывал влияния на параметры ПД клеток СП узла кролика со скоростью фазы быстрой деполяризации 7±1 В/с. Повышение концентрации лидокаина от 50 до 100 мкМ (n=4) вызывало снижение скорости фазы быстрой деполяризации от 7±1 до 5.7±0.6 В/с (на 20%) и не изменяло другие параметры ПД.

Лидокаин в концентрации 500 мкМ (n=5) приводил к смещению максимального диастолического потенциала E_{max} в сторону деполяризации (от -67±10 до -54±4 мВ), снижению амплитуды ПД на 14% и замедлению dV/dt_{max} от 6.9±1.3 до 3.0±1.7 В/с (на 57%). Длительность ПД на уровне 20 и 90% реполяризации увеличивалась на 30% и 51% соответственно. Скорость

фазы медленной диастолической деполяризации замедлялась на 21% за счет снижения амплитуды спонтанной деполяризации. В результате частота генерации ПД снижалась на 15% по сравнению с контролем (рис. 3.2.3.1.; табл. 3.2.3.1).

Повышение концентрации лидокаина от 500 до 1000 мкМ вызывало смещение E_{\max} в сторону деполяризации, постепенное снижение амплитуды ПД и dV/dt_{\max} (рис. 3.2.3.2.). Длительность ПД на уровне 20 и 90% реполяризации и скорость фазы медленной диастолической деполяризации изменялись аналогично, как было зарегистрировано при 500 мкМ. Частота генерации ПД замедлялась в среднем на 18% в первые минуты экспозиции лидокаина и в дальнейшем не изменялась. На 6–8 мин регистрировали прекращение генерации ПД за счет блокирования фазы быстрой деполяризации. При замене перфузирующего раствора с лидокаином на контрольный, генерирование импульсов возобновлялось на 5–6 мин экспозиции.

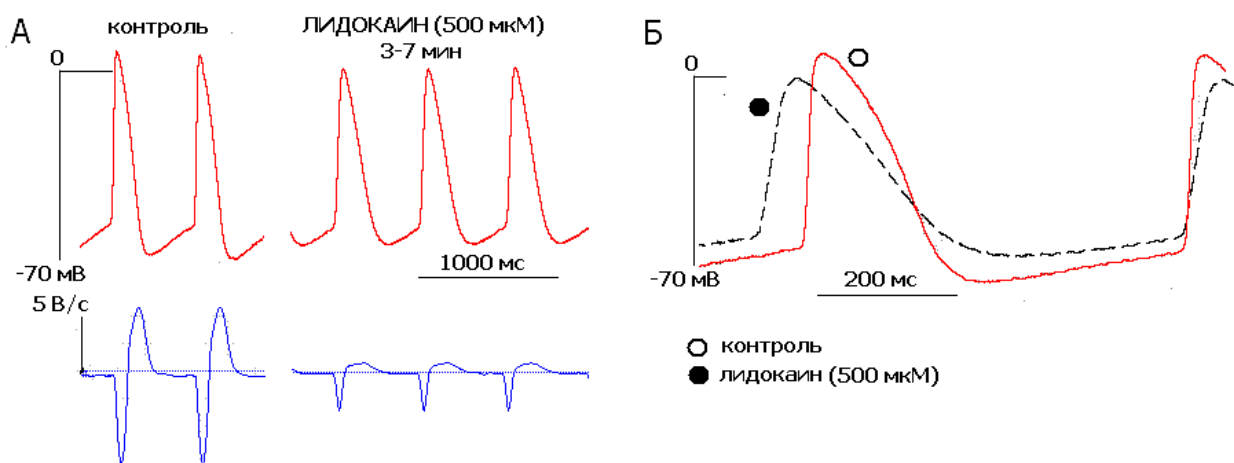


Рис. 3.2.3.1. Изменение конфигурации ПД клеток водителя ритма препарата СП узла кролика при экспозиции лидокаина (500 мкМ). А – потенциалы действия клеток и первая производная (dV/dt_{\max}) в нормальном растворе и при добавлении лидокаина. Б – запись ПД при развернутой временной шкале.

Влияние лидокаина на электрофизиологические параметры потенциалов действия клеток синусно-предсердного узла кролика

Параметры ПД	Контроль n=4	Лидокаин 100 мкМ n=4	Контроль n=5	Лидокаин 500 мкМ n=5
E_{max}, мВ	-72±8	-70±7	-67±10	-54±4*
ОВ, мВ	9±3	9±1	10±4	11±4
АПД, мВ	81±11	79±8	78±12	67±9*
СД, мВ	16±4	15±1	14±2	10±1*
ПП, мВ	-56±8	-55±7	-53±10	-50±3
ДПД₂₀, мс	111±17	125±15	91±24	118±12**
ДПД₅₀, мс	158±27	177±32	139±28	187±19**
ДПД₉₀, мс	210±34	241±50	196±39	297±62**
ДПД₁₀₀, мс	286±48	315±66	260±55	401±88**
ЧСС, мс	99±5	96±11	107±14	91±15*
МДД, мс	323±26	318±23	324±74	278±47
dV/dt_{max}, В/с	7±1	5.7±0.6*	6.9±1.3	3.0±1.7**
V₄, мВ/с	51±15	41±15	43±6	34±6*

Примечание. E_{max} – максимальный диастолический потенциал; ОВ – овершут; АПД – амплитуда ПД; СД – амплитуда спонтанной деполяризации; ПП – потенциал порога; ДПД₂₀, ДПД₅₀, ДПД₉₀ и ДПД₁₀₀ – длительность потенциала действия на уровне 20, 50, 90 и 100% реполяризации; ЧСС – частота генерации ПД; МДД – длительность медленной диастолической деполяризации; dV/dt_{max} – скорость фазы быстрой деполяризации; V₄ – скорость медленной диастолической деполяризации (фаза 4).

** – p<0.01, * – p<0.05 достоверность различий по сравнению с контролем.

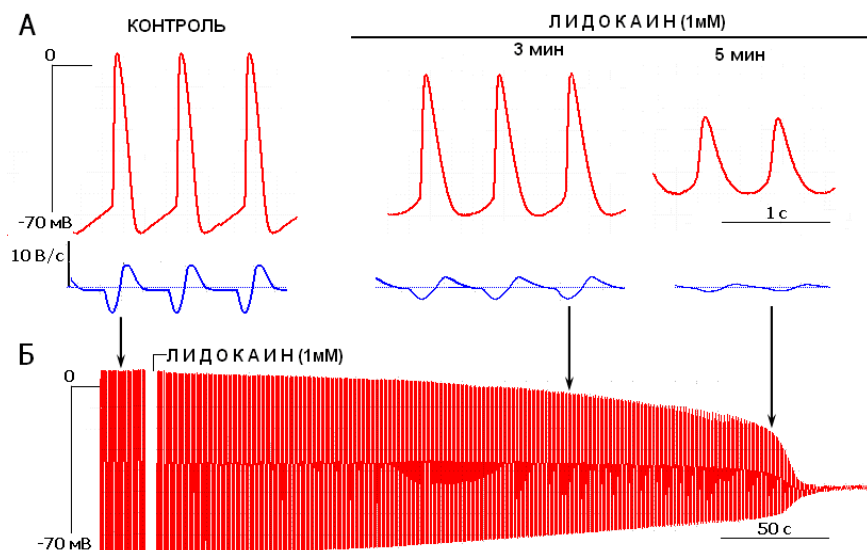


Рис. 3.2.3.2. Развитие эффектов лидокаина (1000 мкМ) на потенциалы действия клеток водителя ритма СП узла кролика. А – изменение конфигурации ПД и первой производной; Б – запись ПД при сжатой временной шкале.

По результатам экспериментов для клеток водителя ритма СП узла кролика со скоростью фазы быстрой деполяризации 7 ± 1 В/с была построена кривая зависимости изменения dV/dt_{\max} от концентрации лидокаина. Полученная кривая соотносилась с уравнением Хилла (рис. 3.2.2.2). Ее анализ показал, что пороговая концентрация лидокаина для dV/dt_{\max} составила ~ 100 мкМ, а концентрация блокатора, при которой скорость фазы быстрой деполяризации замедляется на 50% (EC_{50}) – 220 мкМ.

Сопоставление результатов влияния лидокаина на клетки водителя ритма мыши и кролика позволило выявить межвидовые особенности генерации ПД у этих животных.

Установлено, что пейсмекерные клетки СП узла кролика ($dV/dt_{\max} = 7$ В/с) устойчивее (~ 8 раз) к действию лидокаина, чем клетки типа истинного ($dV/dt_{\max} = 3$ В/с) и скрытого ($dV/dt_{\max} = 16$ В/с) водителя ритма СП узла мыши. Проведенный сравнительный анализ кривых действия лидокаина на скорость фазы быстрой деполяризации показал, что концентрация блокатора, при которой достигается 50% подавляющий эффект для dV/dt_{\max} у клеток кролика, составила 220 мкМ, у клеток типа истинного и скрытого водителя ритма мыши – 35 и 20 мкМ соответственно.

У обоих видов животных лидокаин (25–50 мкМ у мыши, 500 мкМ у кролика) замедлял скорость фазы медленной диастолической деполяризации в среднем на 20–30%. У пейсмекерных клеток СП узла мыши замедление V_4 происходило за счет увеличения длительности медленной диастолической деполяризации (в среднем на 30–40%), у клеток водителя ритма кролика ($dV/dt_{\max} = 7$ В/с) – за счет снижения амплитуды спонтанной деполяризации (на ~30%).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что у пейсмекерных клеток СП узла мыши и кролика существует Na^+ -ток, участвующий в формировании фазы быстрой деполяризации и фазы медленной диастолической деполяризации. Установлено, что dV/dt_{\max} пейсмекерных клеток СП узла кролика в среднем в 8 раз устойчивее к лидокаину, чем у клеток типа истинного и скрытого водителя ритма СП узла мыши. За счет удлинения фазы МДД лидокаин в 2 раза сильнее замедлял частоту генерации ПД у многоклеточных препаратов СП узла мыши по сравнению с кроликом.

3. 3. Влияние гипонатриевых растворов на параметры ПД клеток у мыши

Для оценки суммарного вклада натриевых токов в генерацию пейсмекерной активности исследованы эффекты гипонатриевых растворов на основные параметры ПД клеток водителя ритма СП узла мыши. В растворе Тироде ионы натрия замещали на трис на 25, 50 и 70% по сравнению с контролем. Время экспозиции гипонатриевого раствора составляло 15 мин.

Эффекты гипонатриевых растворов на параметры ПД клеток типа истинного водителя ритма

При замещении ионов натрия на трис на 25% (n=3) у клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма, зарегистрировано снижение скорости фазы быстрой деполяризации на 28%. Длительность медленной диастолической деполяризации увеличивалась на 57%, а ее

скорость замедлялась на 45% (табл. 3.3.1). В результате частота генерации ПД снижалась на 24% по сравнению с контролем.

Снижение внеклеточной концентрации Na^+ в солевом растворе в два раза (на 50%, $n=8$) приводило к снижению амплитуды ПД от 37 ± 5 до 29 ± 5 мВ (на 22%) и увеличению длительности ПД на уровне 90 и 100% реполяризации на 24% и 29% соответственно (табл. 3.3.1., рис. 3.3.1.). Скорость нарастания ПД в фазу 0 замедлялась на 42% (от 2.4 ± 0.7 до 1.4 ± 0.4 В/с). Длительность медленной диастолической деполяризации возрастала в два раза, а ее скорость снижалась на 51%. Это приводило к замедлению генерации ПД от 278 ± 32 до 171 ± 33 имп/мин (на 39%) по сравнению с контролем.

При замещении NaCl на трис в равновесном солевом растворе на 70% ($n=3$) регистрировали смещение максимального диастолического потенциала в сторону деполяризации от -53 ± 4 до -39 ± 10 мВ (на 26%), постепенное снижение амплитуды ПД и скорости фазы быстрой деполяризации. Медленная диастолическая деполяризация удлинялась в 4 раза, а ее скорость замедлялась на 91%. В результате частота генерации ПД снижалась на 63% по сравнению с контролем (рис 3.3.2.). На 7–10 мин экспозиции $[\text{Na}^+]_o$ 30% регистрировали блок спонтанной активности. Стоит отметить, что увеличение ДПД₉₀ и ДПД₁₀₀ при $[\text{Na}^+]_o$ 30% было аналогичным, как и при $[\text{Na}^+]_o$ 50%. Эффекты гипонатриевого раствора обратимы. Генерирование ПД восстанавливалось в контрольном растворе на 15–20 мин.

Влияние гипонатриевых растворов на электрофизиологические характеристики ПД клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма, синусно-предсердной области сердца у мыши

Параметры ПД	Контроль n=3	[Na ⁺] _o 75% n=3	Контроль n=8	[Na ⁺] _o 50% n=8	Контроль n=3	[Na ⁺] _o 30% n=3, 4 мин
E_{max}, мВ	-56±4	-43±8	-57±11	-53±12	-54±4	-39±10*
АПД, мВ	40±9	33±8	37±5	29±5**	40±7	14±6**
СД, мВ	7±3	5±1	6±2	6±3	8±4	3±1*
ПП, мВ	-49±6	-40±7	-52±9	-47±10	-47±5	-36±9
ДПД₂₀, мс	43±4	52±8	51±11	61±20	47±7	54±21
ДПД₅₀, мс	59±4	76±23	67±12	80±23	63±3	77±16
ДПД₉₀, мс	89±5	111±40	97±19	120±20*	92±3	110±27*
ДПД₁₀₀, мс	120±13	135±38	124±25	163±32*	122±7	157±25*
ЧСС, имп/мин	283±35	214±58*	278±32	171±33**	245±15	89±14**
МДД, мс	101±28	159±53*	95±23	208±76**	124±20	532±91**
dV/dt_{max}, В/с	3.2±0.9	2.3±0.5*	2.4±0.7	1.4±0.4*	2.5±0.5	0.5±0.06**
V₄, мВ/с	73±25	40±22*	70±33	34±19**	67±28	6±4**

Примечание. E_{max} – максимальный диастолический потенциал; ОВ – овершут; АПД – амплитуда ПД; СД – амплитуда спонтанной деполяризации; ПП – потенциал порога; ДПД₂₀, ДПД₅₀, ДПД₉₀ и ДПД₁₀₀ – длительность потенциала действия на уровне 20, 50, 90 и 100% реполяризации; ЧСС – частота генерации ПД; ДД – длительность медленной диастолической деполяризации; dV/dt_{max} – скорость фазы быстрой деполяризации; V₄ – скорость медленной диастолической деполяризации (фаза 4).

** – p<0.01, * – p<0.05 достоверность различий по сравнению с контролем.

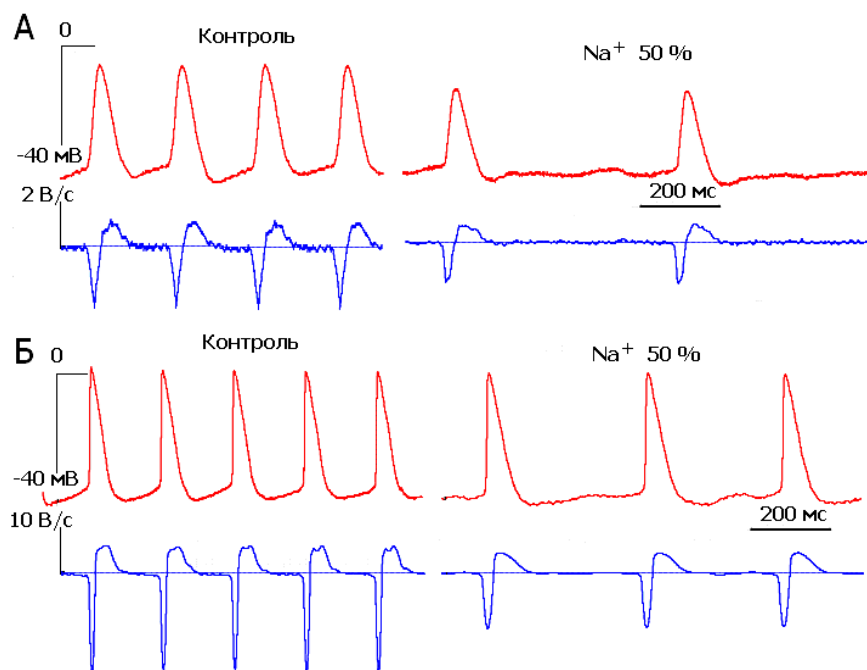


Рис. 3.3.1. Изменение конфигурации ПД и первой производной клеток водителя ритма СП узла мыши при экспозиции гипонатриевого раствора (50%). А – ПД клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма, в контроле и при экспозиции гипонатриевого раствора 4 мин (2.5 В/с и 1.7 В/с соответственно). Б – ПД клеток, работающих в режиме скрытого водителя ритма, в контроле и при экспозиции гипонатриевого раствора 2 мин (20 В/с и 3 В/с соответственно).

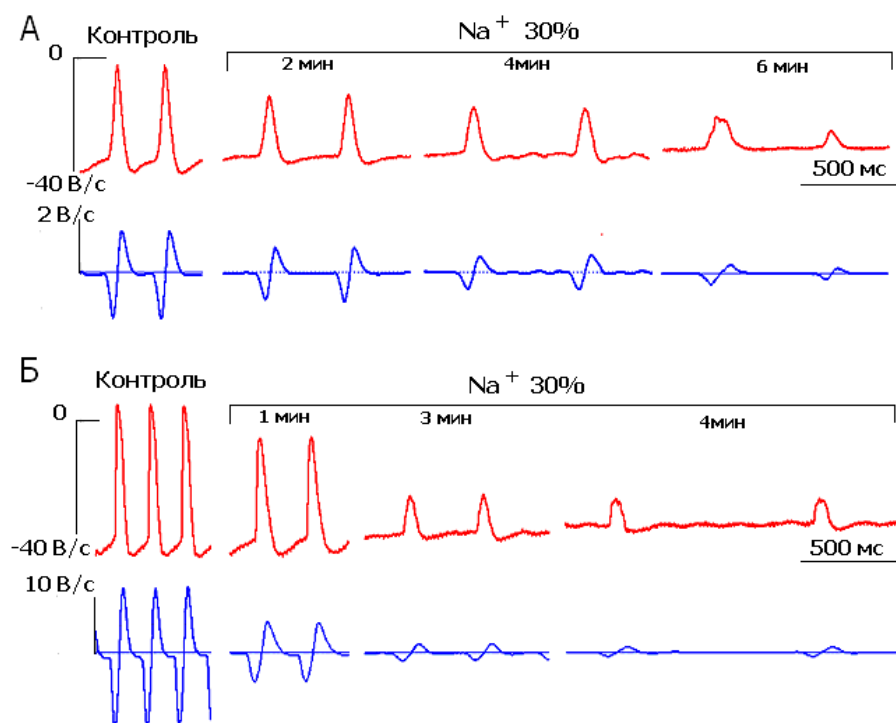


Рис. 3.3.2. Изменение конфигурации ПД и первой производной клеток водителя ритма СП узла мыши при экспозиции гипонатриевого раствора (30%). А – ПД клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма, в контроле и при экспозиции гипонатриевого раствора. Б – ПД клеток, работающих в режиме скрытого водителя ритма, в контроле и при экспозиции гипонатриевого раствора.

Эффекты гипонатриевых растворов на параметры ПД клеток типа скрытого водителя ритма

Снижение внеклеточного натрия на 25% (n=3) в нормальном растворе у клеток, работающих в режиме скрытого водителя ритма, приводило к замедлению скорости фазы быстрой деполяризации и скорости МДД на 33% и 44% соответственно (табл. 3.3.2). В результате частота генерации ПД снижалась на 32% по сравнению с контролем.

При замене внеклеточного Na^+ на трис на 50% (n=5) зарегистрировано снижение амплитуды ПД от 52 ± 7 до 35 ± 10 мВ (на 32%). Длительность ПД на уровне 20% (ДПД₂₀) и 100% (ДПД₁₀₀) реполяризации увеличивалась на 60%. Скорость нарастания переднего фронта ПД (dV/dt_{\max}) замедлялась от 17 ± 3.6 до 4.5 ± 4.0 В/с (на 73%). Медленная диастолическая деполяризация увеличивалась в два раза, а ее скорость снижалась на 53% (рис. 3.3.1., табл. 3.3.2.). Это приводило к замедлению частоты генерации ПД на 46% по сравнению с контролем.

Замещение NaCl на трис во внеклеточном растворе на 70% (n=3) вызывало увеличение ДПД₂₀ в два раза по сравнению с контролем. Остальные анализируемые параметры ПД (E_{\max} , амплитуда ПД, скорости фаз быстрой и медленной деполяризации, частота генерации ПД) у клеток типа скрытого водителя ритма изменялись аналогично, как у клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма (рис. 3.3.2.). Прекращение генерации ПД происходило на ~ 10 мин, а восстановление электрической активности – к 20 мин экспозиции в нормальном растворе.

По результатам экспериментов с помощью уравнения Хилла и линейного уравнения построены кривые зависимости скорости фазы быстрой деполяризации от градиента концентрации внеклеточного натрия (рис. 3.3.3) для клеток истинного и скрытого водителей ритма СП узла мыши.

**Электрофизиологические характеристики ПД клеток,
работающих в режиме скрытого водителя ритма, синусно-предсердной
области сердца мыши при действии гипонатриевого раствора**

Параметры ПД	Контроль n=3	[Na ⁺] _o 75% n=3	Контроль n=5	[Na ⁺] _o 50% n=5	Контроль n=3	[Na ⁺] _o 30% n=3 (2 мин)
E_{max}, мВ	-62±14	-54±8	-63±15	-47±7*	-57±8	-46±11*
АПД, мВ	53±9	52±14	52±7	35±10**	47±6	24±6**
СД, мВ	6±3	6±1	6±4	7±5	6±1	5±2
ПП, мВ	-56±14	-49±7	-57±11	-40±10	-51±8	-41±10
ДПД₂₀, мс	27±10	34±14	30±5	48±17**	23±5	45±8**
ДПД₅₀, мс	51±10	56±9	48±7	70±22**	39±5	60±9**
ДПД₉₀, мс	87±13	88±10	78±18	118±29*	61±4	91±2**
ДПД₁₀₀, мс	121±16	120±13	107±24	171±41**	87±8	118±3**
ЧСС, имп/мин	257±23	173±46**	312±42	169±19**	352±24	215±46**
МДД, мс	114±24	229±90*	88±15	187±5**	85±15	170±72**
dV/dt_{max}, В/с	27±15	18±10*	17.0±3.6	4.5±4.0**	17±3	1.9±1.4**
V₄, мВ/с	55±22	31±25*	53±15	25±14**	72±13	37±20**

Примечание. E_{max} – максимальный диастолический потенциал; ОВ – овершут; АПД – амплитуда ПД; СД – амплитуда спонтанной деполяризации; ПП – потенциал порога; ДПД₂₀, ДПД₅₀, ДПД₉₀ и ДПД₁₀₀ – длительность потенциала действия на уровне 20, 50, 90 и 100% реполяризации; ЧСС – частота генерации ПД; ДД – длительность медленной диастолической деполяризации; dV/dt_{max} – скорость фазы быстрой деполяризации; V₄ – скорость медленной диастолической деполяризации (фаза 4).

** – p<0.01, * – p<0.05 достоверность различий по сравнению с контролем.

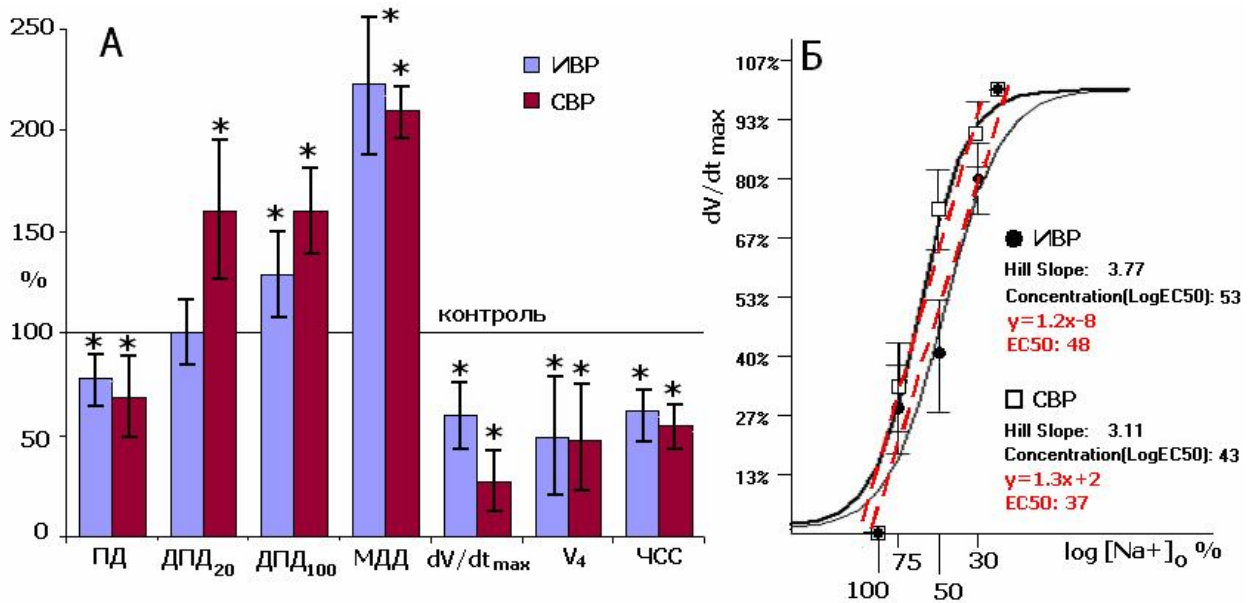


Рис. 3.3.3. Изменение электрофизиологических параметров ПД клеток водителя ритма СП узла мышцы при понижении трансарколеммального градиента Na^+ .

А. Изменение основных параметров ПД у клеток типа истинного и скрытого водителей ритма в присутствии гипонатриевго раствора (50 %). Уровень 100% соответствует контролю. * – $p < 0.05$ достоверность различий по сравнению с контролем.

Б. Снижение скорости фазы быстрой деполяризации ПД клеток, работающих в режиме истинного и скрытого водителей ритма, при варьировании внеклеточной концентрации Na^+ . Сплошные линии соответствуют значениям, вычисленным по уравнению Хилла, красные пунктирные линии соответствуют значениям, рассчитанным с помощью линейного уравнения. Значения приведены как $M \pm \sigma$.

Для клеток типа истинного водителя ритма значение $[\text{Na}^+]_o$ во внеклеточной среде, при которой dV/dt_{\max} снижается на 50% (EC_{50}), рассчитанное на основе уравнения Хилла, составило 66 мМ/л, с использованием линейного уравнения – 73 мМ/л. Для клеток типа скрытого водителя ритма EC_{50} , вычисленное на основе уравнения Хилла и линейного уравнения составило 80 и 88 мМ/л соответственно (рис. 3.3.3). Анализ кривых показал, что снижение скорости нарастания переднего фронта в фазу 0 (dV/dt_{\max}) происходило пропорционально снижению трансарколеммального градиента Na^+ .

Таким образом, клетки типа истинного и скрытого водителей ритма СП узла мышцы оказались чувствительны к снижению градиента внеклеточного натрия. Зарегистрировано, что скорость фазы быстрой деполяризации ПД у

клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма в 1.7 раза устойчивее к гипонатриевому раствору (50%), чем у клеток типа скрытого водителя ритма. Эти данные согласуются с результатами ингибирования dV/dt_{\max} блокаторами Na^+ -каналов – лидокаином и ТТХ, описанными в этой работе ранее. В присутствии гипонатриевого раствора фаза 4 изменялась одинаково у обоих типов пейсмекерных клеток. Стоит отметить, что у клеток с медленной dV/dt_{\max} не отмечено удлинение ДПД₂₀ и ДПД₅₀ при понижении трансарколеммального градиента Na^+ . Тогда как у клеток с высокой dV/dt_{\max} эти параметры удлинялись в 1.5–2 раза.

3. 4. Изменение морфологии ПД при ингибировании тока Na^+/K^+ -насоса

Для исследования вклада тока Na^+/K^+ -насоса (I_{NaK}) в формирование ПД пейсмекерных клеток проведена серия экспериментов со специфическим блокатором Na^+/K^+ -АТФазы – убаином. Убаин является сердечным гликозидом и широко используется в практической медицине. Для определения пороговой концентрации и концентрации, при которой происходит полное ингибирование генерации ПД, тестировали блокатор в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ.

3. 4. 1. Эффекты убаина на генерацию ПД клеток водителя ритма мышы

При добавлении 1 мкМ убаина в нормальный раствор у пяти из восьми многоклеточных препаратов СП узла мышы наблюдали увеличение длительности ПД на уровне 20% и 90% реполяризации на 25% и 17% соответственно. Скорость фазы быстрой деполяризации замедлялась от 2.6 до 2.0 В/с (на 23%). В результате этого частота генерации ПД снижалась на 10% по сравнению с контролем (рис. 3.4.1.1., табл. 3.4.1.1.). У трех препаратов СП узла мышы не было зарегистрировано достоверных изменений электрофизиологических параметров ПД.

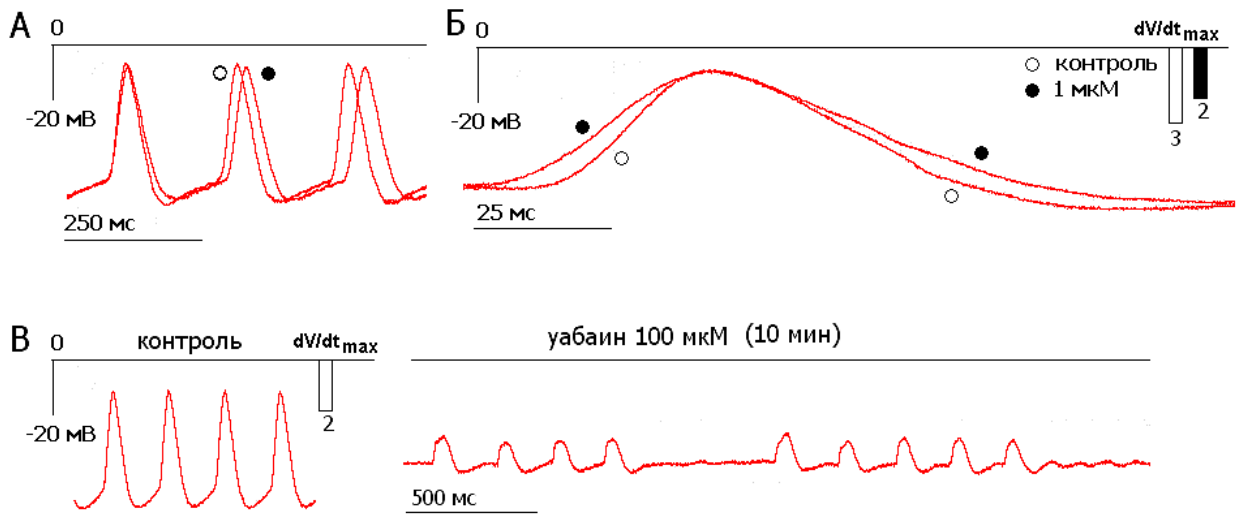


Рис. 3.4.1.1. Эффекты убаина на генерирование потенциалов действия клеток типа истинного водителя ритма СП узла сердца мыши. А и Б – эффекты убаина (1 мкМ) на конфигурацию ПД и скорость фазы быстрой деполяризации. В – ингибирование генерации ПД при экспозиции убаина (100 мкМ).

Таблица 3.4.1.1.

Влияние убаина на электрофизиологические характеристики ПД клеток истинного водителя ритма СП области сердца у мыши

Параметры ПД	Контроль n=5	Убаин 1 мкМ n=5	Контроль n=9	Убаин 10 мкМ n=9
E_{\max} , мВ	-54±19	-55±20	-58±10	-57±6
АПД, мВ	43±10	38±7	45±7	40±7
СД, мВ	8±4	6±2	7±3	6±2
ПП, мВ	-46±19	-48±18	-51±11	-51±7
ДПД ₂₀ , мс	45±7	56±11*	44±6	52±10*
ДПД ₅₀ , мс	60±7	73±15*	59±9	72±13*
ДПД ₉₀ , мс	90±7	105±19*	90±11	107±12**
ДПД ₁₀₀ , мс	120±7	138±19*	121±12	136±12*
ЧСС, имп/мин	284±19	256±22*	286±16	245±25**
МДД, мс	93±11	103±29	90±11	113±25**
dV/dt_{\max} , В/с	2.6±0.6	2.0±0.3*	3.2±0.7	2.1±0.7*
V_4 , мВ/с	88±30	66±32	77±33	56±12*

Примечание. E_{\max} – максимальный диастолический потенциал; ОВ – овершут; АПД – амплитуда ПД; СД – амплитуда спонтанной деполяризации; ПП – потенциал порога; ДПД₂₀, ДПД₅₀, ДПД₉₀ и ДПД₁₀₀ – длительность потенциала действия на уровне 20, 50, 90 и 100% реполяризации; ЧСС – частота генерации ПД; МДД – длительность медленной диастолической деполяризации; dV/dt_{\max} – скорость фазы быстрой деполяризации; V_4 – скорость медленной диастолической деполяризации (фаза 4).

** – $p < 0.01$, * – $p < 0.05$ достоверность различий по сравнению с контролем.

Повышение концентрации убаина от 1 до 10 мкМ (n=9) у клеток с $dV/dt_{\max}=3.3\pm 0.7$ В/с вызывало замедление частоты генерации ПД на 15% за счет увеличения длительности ПД (ДПД₂₀, ДПД₉₀) и длительности фазы медленной диастолической деполяризации на 20% и 25% соответственно. Также регистрировали снижение dV/dt_{\max} и V_4 на 34% и 27% соответственно (табл. 3.4.1.1., рис. 4.4.2). Ингибирование генерации ПД у препаратов СП узла мыши зарегистрировано при экспозиции убаина в концентрации 100 мкМ (рис. 3.4.1.1.В).

Таким образом, у клеток истинного водителя ритма мыши убаин (10 мкМ) вызывал замедление частоты генерации ПД на 14% за счет увеличения длительности фазы 4, а также замедляет скорость фазы быстрой деполяризации на 34%.

3.3.2. Эффекты убаина на параметры ПД клеток СП узла кролика

При добавлении в перфузирующий раствор убаина 1 мкМ у клеток, работающих в режиме истинного ($dV/dt_{\max}=4\pm 0.9$ В/с, n=3) и скрытого ($dV/dt_{\max}=23\pm 2$ В/с, n=4) водителей ритма СП узла кролика, зарегистрировано повышение скорости фазы быстрой деполяризации в среднем на 10–15% (рис. 3.3.2.1., табл. 3.3.2.1.). Другие параметры ПД достоверно не изменялись.

Убаин в концентрации 10 мкМ (n=5) на 1 мин экспозиции у клеток скрытого водителя ритма кролика ($dV/dt_{\max}=21.2\pm 4.6$ В/с) приводил к повышению величины максимального диастолического потенциала (E_{\max}) на 4–5 мВ (рис. 3.3.2.2). На 2–4 мин происходила деполяризация сарколеммы на 18% (от -69 ± 7 до -56 ± 7 мВ) и снижение амплитуды ПД на 33%. Скорость фазы быстрой деполяризации замедлялась на 41%. У четырех препаратов из пяти длительность фазы МДД укорачивалась на 26%, что приводило к увеличению частоты генерации ПД на 13%.

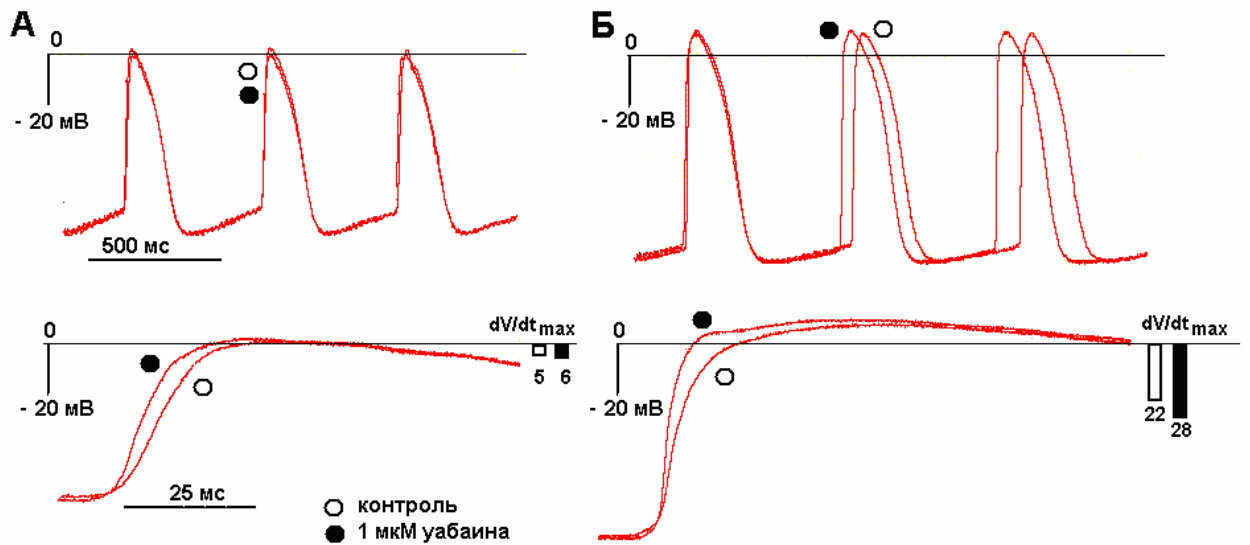


Рис. 3.3.2.1. Изменение конфигурации ПД клеток водителя ритма СП узла кролика при экспозиции уабаина (1 μ М). А – потенциалы действия клеток типа истинного водителя ритма в нормальном растворе и при добавлении уабаина. Б – потенциалы действия клеток типа скрытого водителя ритма в нормальном растворе и при добавлении уабаина.

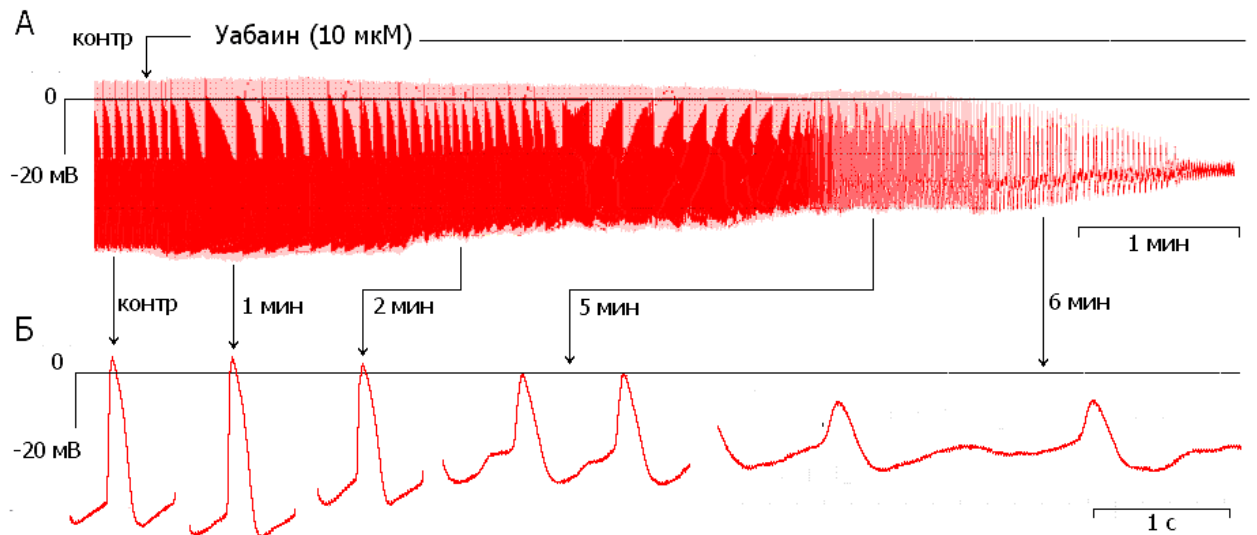


Рис. 3.3.2.2. Влияние уабаина (10 μ М) на генерацию потенциалов действия клеток типа скрытого водителя ритма СП узла кролика. А – развитие эффектов уабаина у клетки водителя ритма; Б – изменение конфигурации потенциалов действия в присутствии уабаина при растянутой временной шкале.

Влияние убаина на электрофизиологические характеристики ПД клеток скрытого водителя ритма СП области сердца кролика

Параметры ПД	Контроль n=4	Убаин 1 мкМ n=4	Контроль n=5	Убаин 10 мкМ n=5 (2–4 мин)	Убаин 10 мкМ n=5 (6–7 мин)
E_{max}, мВ	-76±9	-69±7	-69±7	-56±7*	-45±9#
ОВ, мВ	8±4	14±7	7±4	–	–
АПД, мВ	83±6	83±5	76±9	51±4**	40±8#
СД, мВ	8±2	8±2	8±2	6±2	10±4
ПП, мВ	-68±10	-60±8	-61±8	-50±8*	-35±10#
ДПД₂₀, мс	108±20	114±12	108±16	107±8	95±31
ДПД₅₀, мс	151±27	157±16	154±19	157±6	150±36
ДПД₉₀, мс	200±36	205±41	203±26	217±11	238±15#
ДПД₁₀₀, мс	200±36	205±41	203±26	217±11	238±15#
ЧСС, имп/мин	118±19	116±12	115±12	130±6*	93±16#
МДД, мс	256±35	256±35	256±35	188±32*	348±87#
dV/dt_{max}, В/с	23.5±1.7	27.0±1.4*	21.2±4.6	12.5±5.0**	3±3#
V₄, мВ/с	34±10	32±8	33±8	32±9	31±13

Примечание. E_{max} – максимальный диастолический потенциал; ОВ – овершут; АПД – амплитуда ПД; СД – амплитуда спонтанной деполяризации; ПП – потенциал порога; ДПД₂₀, ДПД₅₀, ДПД₉₀ и ДПД₁₀₀ – длительность потенциала действия на уровне 20, 50, 90 и 100% реполяризации; ЧСС – частота генерации ПД; МДД – длительность медленной диастолической деполяризации; dV/dt_{max} – скорость фазы быстрой деполяризации; V₄ – скорость медленной диастолической деполяризации (фаза 4).

** – p<0.01, * – p<0.05 достоверность различий по сравнению с контролем, # – p<0.05 достоверность различий по сравнению с 10 мкМ убаина (2-4 мин).

После пятой минуты регистрировали урежение генерации ПД в среднем на 28% по сравнению с 3 мин экспозиции убаина и на 19% по сравнению с контролем, появление аритмий и на 7–9 мин подавление спонтанной электрической активности (рис. 3.3.2.2., табл. 3.3.2.1.). Эффекты убаина обратимы после 1–2 часов реперфузии.

Таким образом, убаин (10 мкМ) вызывал у клеток кролика двухфазный эффект, при котором частота генерации ПД сначала возрастала на 13%, потом происходило ее замедление до полного подавления спонтанной электрической активности.

Полученные результаты продемонстрировали, что при ингибировании Na^+/K^+ -насоса убаином (10 мкМ) у клеток истинного водителя ритма мыши происходило замедление частоты генерации ПД на 14%. Эффекты убаина (10 мкМ) на генерацию ПД у кролика носили двухфазный характер: сначала фаза диастолической деполяризации укорачивалась, а затем происходило ее удлинение. На первой минуте экспозиции блокатора амплитуда ПД повышалась, далее регистрировали постепенное снижение и на 8 мин осцилляторную активность величиной около 10 мВ. Убаин (10 мкМ) замедлял скорость фазы быстрой деполяризации на 41% и 34% у кролика и мыши соответственно. Полное ингибирование генерации ПД зарегистрировано у кролика при 10 мкМ, а у мыши при 100 мкМ убаина.

3. 5. Изменение морфологии ПД при блоке Ca^{2+} -тока L-типа, I_{CaL}

С целью оценки роли медленного Ca^{2+} -тока L-типа в формировании ПД клеток водителя ритма мыши и кролика проведена серия экспериментов со специфическим блокатором Ca^{2+} -каналов – нифедипином. Концентрации нифедипина в опытах на СП узле у обоих видов животных варьировали в следующем порядке: 0.05, 0.1, 0.5, 1 и 2 мкМ/л.

3. 5. 1. Эффекты нифедипина на генерацию ПД клеток СП узла мыши

У клеток типа истинного водителя ритма мыши 0.05 мкМ нифедипина (n=5) не вызывало достоверных изменений в параметрах ПД. Повышение концентрации блокатора от 0.05 до 0.10 мкМ (n=6) приводило к снижению амплитуды ПД на 10% и увеличению длительности ПД на уровне 20% и 100% реполяризации на 19% и 10% соответственно. Скорость фазы быстрой деполяризации (dV/dt_{max}) снижалась на 16%. Фаза медленной диастолической деполяризации удлинялась на 25%, а ее скорость замедлялась на 30%. В результате частота генерации ПД снижалась на 15% (табл. 3.5.1.1; рис. 3.5.1.1.).

**Влияние нифедипина на электрофизиологические характеристики ПД
клеток водителя ритма синусно-предсердной области сердца мыши**

Параметры ПД	Клетки типа истинного водителя ритма		Клетки типа скрытого водителя ритма					
	Контр. n=6	Нфп 0.1 мкМ n=6	Контр. n=3	Нфп 0.05 мкМ n=3	Контр. n=4	Нфп 0.1 мкМ n=4	Контр. n=5	Нфп 0.5 мкМ n=5
E_{max}, мВ	-63±6	-64±6	-53±10	-50±8	-59±6	-57±14	-59±13	-56±13
АПД, мВ	50±5	44±3*	55±21	50±20	53±9	42±10*	54±7	35±14*
СД, мВ	9±3	8±3	7±5	7±4	5±1	5±2	4±2	3±1
ПП, мВ	-55±7	-56±7	-45±6	-43±4	-53±6	-51±12	-55±13	-56±13
ДПД₂₀, мс	43±6	51±3**	33±11	36±16	37±20	45±21	27±13	32±24
ДПД₅₀, мс	59±5	69±5**	62±5	66±10	59±20	68±16	50±16	60±20
ДПД₉₀, мс	91±6	104±12*	98±5	104±3	91±20	109±13	87±18	114±30*
ДПД₁₀₀, мс	119±7	132±18*	129±3	147±8**	119±20	141±13*	120±16	151±28*
ЧСС, имп/мин	289±27	247±28*	276±10	260±11*	294±18	272±14*	288±28	232±24**
МДД, мс	90±20	113±22*	89±7	85±15	86±24	81±17	90±10	110±15*
dV/dt_{max}, В/с	4.9±1.3	4.1±0.2*	31±8	20±8*	24±9	13.7±7.0*	27.9±10	14.0±5.0*
V₄, мВ/с	96±34	68±18*	86±30	84±39	64±12	67±20	46±17	29±14*

Примечание. Нфп – нифедипин; E_{max} – максимальный диастолический потенциал; ОВ – овершут; АПД – амплитуда ПД; СД – амплитуда спонтанной деполяризации; ПП – потенциал порога; ДПД₂₀, ДПД₅₀, ДПД₉₀ и ДПД₁₀₀ – длительность потенциала действия на уровне 20, 50, 90 и 100% реполяризации; ЧСС – частота генерации ПД; МДД – длительность медленной диастолической деполяризации; dV/dt_{max} – скорость фазы быстрой деполяризации; V₄ – скорость медленной диастолической деполяризации (фаза 4). ** – p<0.01, * – p<0.05 достоверность различий по сравнению с контролем.

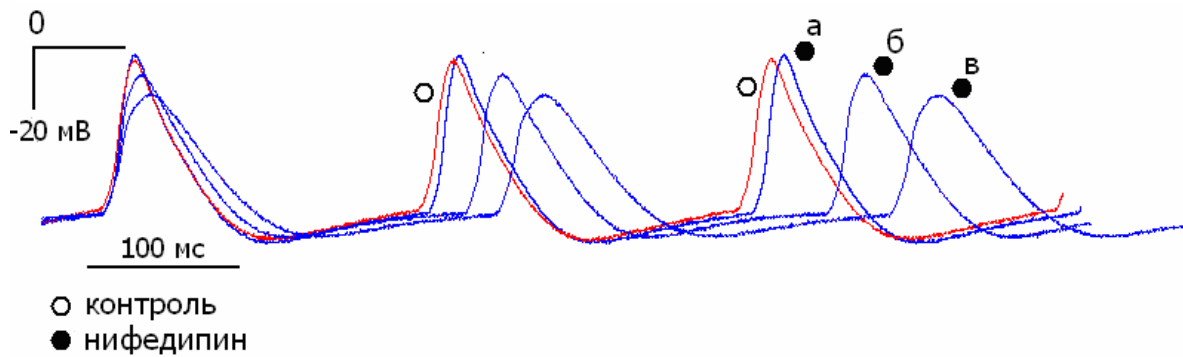


Рис. 3.5.1.1. Изменение конфигурации ПД клеток типа истинного водителя ритма СП узла мышцы в контроле и при экспозиции нифедипина. Буквами обозначены следующие концентрации нифедипина: а – 0.05 мкМ, 3 мин экспозиции (dV/dt_{\max} 5.2 и 5.2 В/с соответственно); б – 0.1 мкМ, 3 мин экспозиции (dV/dt_{\max} 5.2 и 4.7 В/с соответственно); в – 0.1 мкМ, 6 мин экспозиции (dV/dt_{\max} 5.2 и 4 В/с соответственно).

Нифедипин в концентрации 0.5 мкМ ($n=3$) у клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма ($dV/dt_{\max}=2$ В/с), на 4–5 мин экспозиции вызывал блок генерирования ПД. При этом отмечено постепенное снижение амплитуды ПД и скорости фазы быстрой деполяризации. Стоит отметить, что полной остановки электрической активности у многоклеточных препаратов СП области мышцы не происходило и регистрировались ПД с более высокой dV/dt_{\max} (выше 10 В/с).

У клеток, работающих в режиме скрытого водителя ритма ($dV/dt_{\max}=31\pm 8$ В/с), добавление в нормальный раствор нифедипина в концентрации 0.05 мкМ ($n=3$) приводило к замедлению скорости фазы быстрой деполяризации на 30% и увеличению длительности ПД на уровне 100% реполяризации на 14% (табл. 3.5.1.1.). В результате частота генерации ПД замедлялась на 7% по сравнению с контролем.

Повышение концентрации нифедипина от 0.05 до 0.10 мкМ ($n=4$) приводило к снижению амплитуды ПД (в среднем на 20%) и удлинению ДПД₁₀₀ (на 20%). Скорость фазы быстрой деполяризации замедлялась от 24 ± 10 до 13.7 ± 7.0 В/с (на 43%). В результате частота генерации ПД снижалась на 8% по сравнению с контролем (табл. 3.5.1.1.).

Нифедипин в концентрации 0.5 мкМ (n=5) вызывал снижение амплитуды ПД на 35% и удлинял ДПД₁₀₀ на 26%. Скорость фазы быстрой деполяризации замедлялась от 28±10 до 14±5 В/с (на 50%). Длительность медленной диастолической деполяризации увеличивалась на 22%, а ее скорость снижалась на 37%. В результате частота генерации ПД замедлялась на 20% по сравнению с контролем. Остановки электрической активности у этого типа клеток при данной концентрации нифедипина не зарегистрировано.

Блок генерации ПД у клеток с $dV/dt_{\max}=24\pm14$ В/с наступал при 1 мкМ нифедипина (рис. 3.5.1.2), а полное прекращение электрической активности многоклеточного препарата СП области мышцы зарегистрирована при 2 мкМ блокатора. Восстановление генерации ПД до стационарного уровня происходило через 2–6 часов в зависимости от концентрации нифедипина и времени экспозиции блокатора.

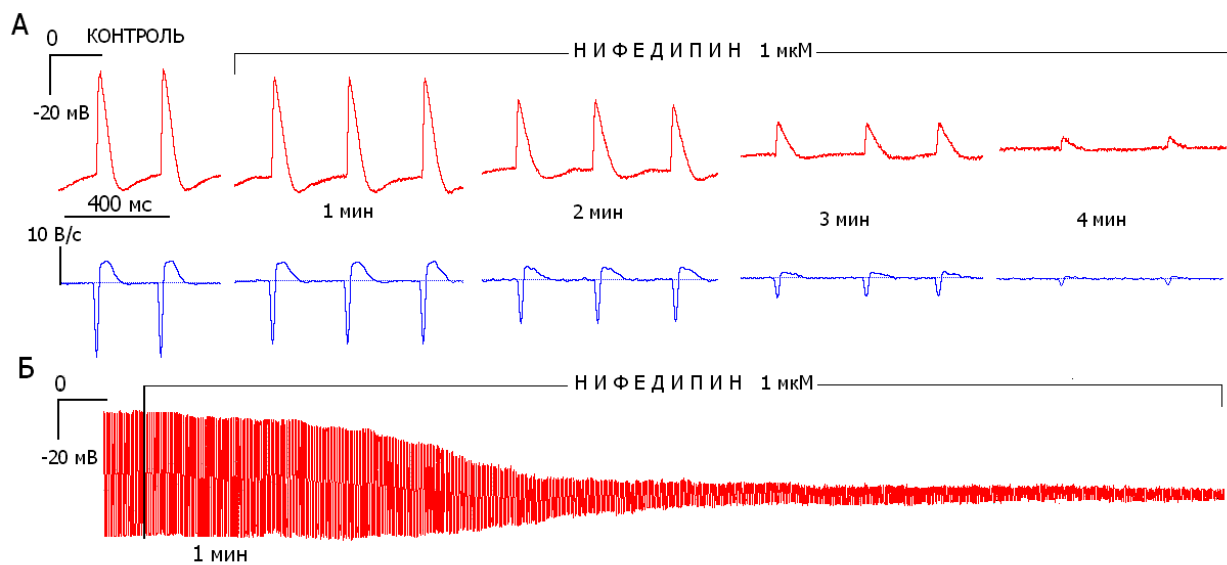


Рис. 3.5.1.2. Развитие эффектов нифедипина (1 мкМ) на потенциалы действия клеток типа скрытого водителя ритма СП узла мышцы. А – изменение конфигурации ПД и скорости фазы быстрой деполяризации (dV/dt_{\max}). Б – запись ПД при сжатой временной шкале.

По результатам проведенных экспериментов для клеток типа истинного и скрытого водителей ритма мышцы построены дозозависимые кривые (рис. 3.5.1.3), описывающие изменения скорости фазы быстрой деполяризации (dV/dt_{\max}) при экспозиции нифедипина. Полученные данные соответствуют уравнению Хилла.

Пороговая концентрация для клеток типа истинного водителя ритма равна 0.1 мкМ, а концентрация нифедипина, при которой скорость фазы быстрой деполяризации снижалась на 50% (EC_{50}) составила 0.2 мкМ. Пороговая концентрация нифедипина для dV/dt_{\max} у клеток, работающих в режиме скрытого водителя ритма, составила 0.03 мкМ, а эффективная концентрация (EC_{50}) – 0.13 мкМ. Стоит отметить, что блок генерации ПД у клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма, наступал при концентрации нифедипина 0.5 мкМ, тогда как клетки, работающие в режиме скрытого водителя ритма, продолжали генерировать ПД. Блок генерации ПД у клеток с высокой dV/dt_{\max} зарегистрирован при 1 мкМ блокатора.

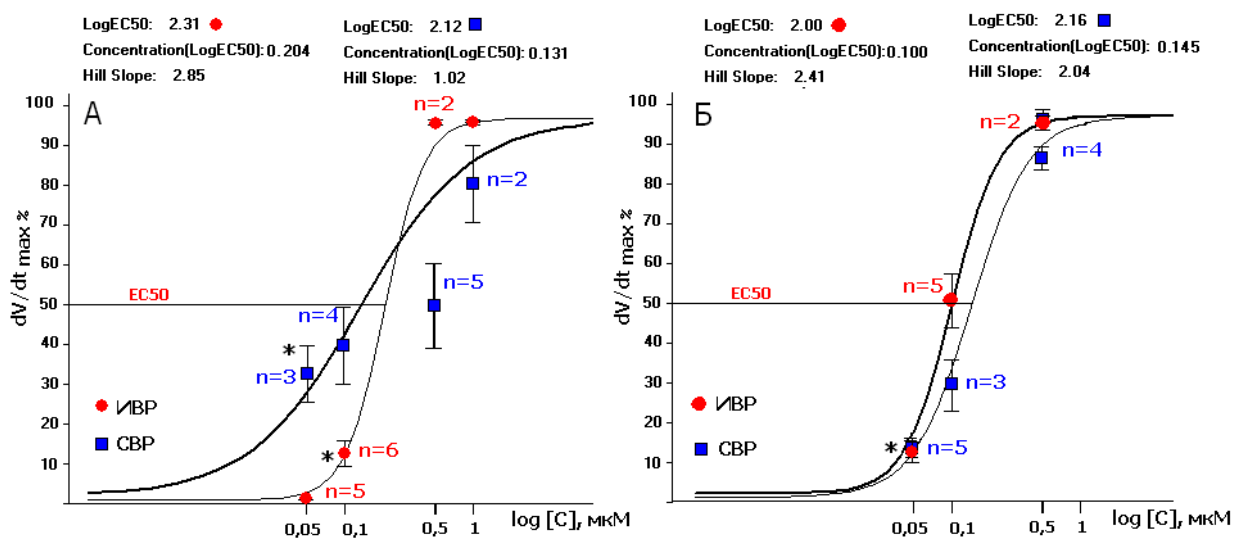


Рис. 3.5.1.3. Блокирование скорости фазы быстрой деполяризации (dV/dt_{\max}) потенциала действия клеток типа истинного и скрытого водителей ритма СП узла мышцы (А) и кролика (Б) в зависимости от концентрации нифедипина. Сплошные линии соответствуют значениям, вычисленным по уравнению Хилла. Значения приведены как $M \pm \sigma$; * – $p < 0.05$ достоверность различий по сравнению с контролем.

Таким образом, наиболее чувствительной к действию нифедипина у пейсмекерных клеток мыши является скорость фазы быстрой деполяризации. Зарегистрировано увеличение ДПД₁₀₀ и длительности фазы МДД. Ингибирование генерации ПД у клеток с медленной dV/dt_{\max} наступало при концентрации нифедипина 0.5 мкМ, у клеток с высокой dV/dt_{\max} – при 1 мкМ.

3. 5. 2. Эффекты нифедипина на параметры ПД клеток СП узла кролика

Анализ экспериментальных результатов выявил, что у клеток с $dV/dt_{\max} = 8.6 \pm 1.0$ В/с нифедипин 0.05 мкМ (n=5) вызывал снижение амплитуды ПД на 9% и замедление скорости фазы быстрой деполяризации на 14% по сравнению с контролем (табл. 3.5.2.1.).

Повышение концентрации нифедипина от 0.05 до 0.1 мкМ (n=5) у клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма ($dV/dt_{\max} = 5.6 \pm 1.8$ В/с), вызывало снижение амплитуды ПД от 71 ± 6 мВ до 53 ± 14 мВ (на 25%) и увеличение длительности ДПД₂₀ на 10%. Скорость фазы быстрой деполяризации замедлялась от 5.6 ± 1.8 до 2.8 ± 1.3 В/с (на 49%) по сравнению с контролем (рис. 3.5.2.1., табл. 3.5.2.1.).

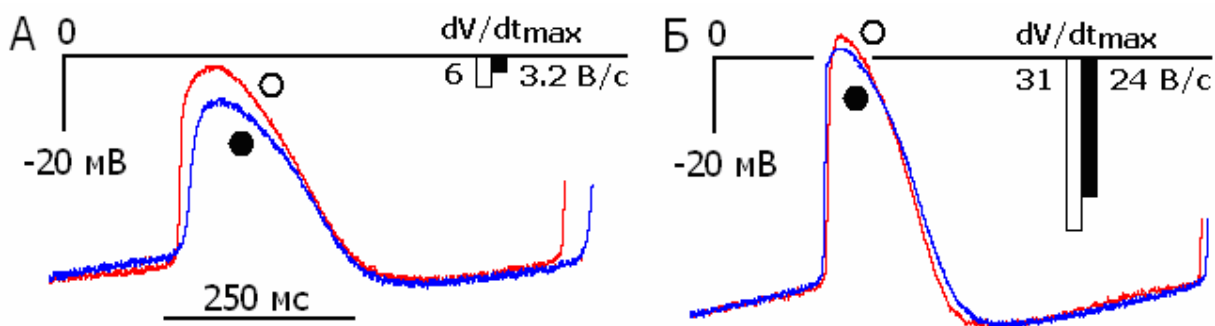


Рис. 3.5.2.1. Эффекты нифедипина (0.1 мкМ) на генерацию ПД клеток СП узла кролика. Запись ПД сделана на одном препарате. А – клетка истинного водителя ритма, 2 мин экспозиции нифедипина; Б – клетка скрытого водителя ритма, 10 мин экспозиции. Контроль – ○; нифедипин – ●.

Влияние нифедипина на электрофизиологические характеристики ПД клеток водителя ритма синусно-предсердной области сердца кролика

Параметры ПД	Клетки типа истинного водителя ритма		Клетки типа скрытого водителя ритма					
	Контр. n=5	Нфп 0.1 мкМ n=5	Контр. n=5	Ниф 0.05 мкМ n=5	Контр. n=3	Нфп 0.1 мкМ n=3	Контр. n=4	Нфп 0.5 мкМ n=4 (4 мин)
E_{max}, мВ	-61±6	-57±8	-74±3	-68±6	-71±3	-66±7	-68±11	-55±5*
ОВ, мВ	10±4	–	9±8	7±5	9±4	–	9±4	–
АПД, мВ	71±6	53±14**	82±5	75±5*	80±2	72±2*	77±11	47±2**
СД, мВ	11±3	10±3	13±5	12±4	11±3	11±2	13±4	10±2
ПП, мВ	-51±7	-47±5	-61±8	-56±5	-59±3	-56±8	-56±8	-45±6*
ДПД₂₀, мс	114±10	126±10*	107±18	119±30	104±17	108±14	83±31	82±23
ДПД₉₀, мс	236±23	260±30	212±25	224±24	201±32	213±31	191±15	209±37
ДПД₁₀₀, мс	297±44	333±44*	282±33	278±12	262±34	263±48	251±39	269±56
ЧСС, имп/мин	97±17	89±8	104±9	107±12	110±12	111±10	134±23	110±6*
МДД, мс	342±87	354±91	293±65	281±88	292±54	281±7	206±55	274±25*
dV/dt_{max}, В/с	5.6±1.8	2.8±1.3**	8.6±1.0	7.4±0.7*	24.5±6.5	15.0±5.0*	22.3±8.5	3.2±2.0**
V₄, мВ/с	34±14	29±5	45±16	45±22	39±8	38±7	60±20	39±10*

Примечание. Нфп – нифедипин; E_{max} – максимальный диастолический потенциал; ОВ – овершут; АПД – амплитуда ПД; СД – амплитуда спонтанной деполяризации; ПП – потенциал порога; ДПД₂₀, ДПД₅₀, ДПД₉₀ и ДПД₁₀₀ – длительность потенциала действия на уровне 20, 50, 90 и 100% реполяризации; ЧСС – частота генерации ПД; МДД – длительность медленной диастолической деполяризации; dV/dt_{max} – скорость фазы быстрой деполяризации; V₄ – скорость медленной диастолической деполяризации (фаза 4). ** – p<0.01, * – p<0.05 достоверность различий по сравнению с контролем

У клеток, работающих в режиме скрытого водителя ритма (dV/dt_{max} = 24.5±6.5 В/с), нифедипин (0.1 мкМ, n=3) приводил к снижению амплитуды ПД от 80±2 до 72±2 мВ (на 10%) и замедлению скорости фазы быстрой деполяризации от 24.5±6.5 до 15.0±5.0 (на 39%). Остальные параметры ПД достоверно не изменялись (рис. 3.5.2.1., табл. 3.5.2.1.).

Нифедипин в концентрации 0.5 мкМ (n=4) на 7–10 мин экспозиции приводил к подавлению электрической активности у клеток истинного и скрытого водителей ритма СП узла кролика (рис. 3.5.2.2).

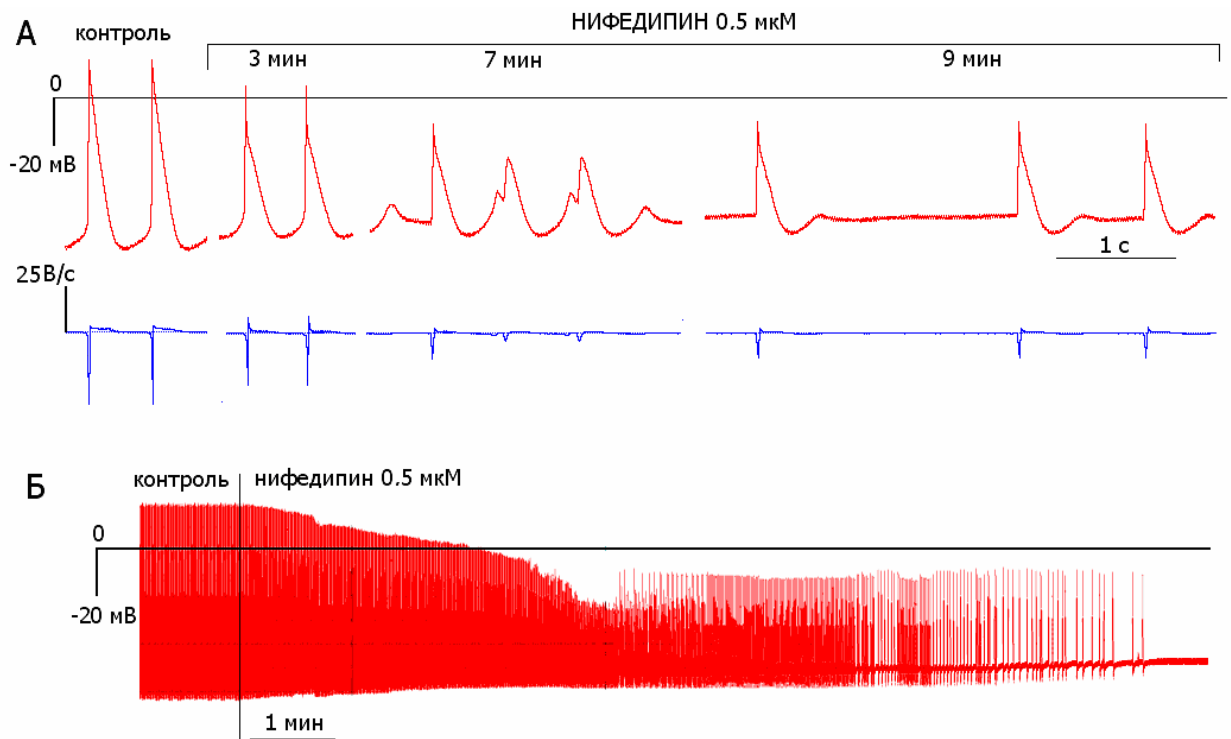


Рис. 3.5.2.2. Развитие эффектов нифедипина (0.5 мкМ) на генерацию ПД клеток типа скрытого водителя ритма СП узла кролика. А. – изменение конфигурации ПД и скорости фазы быстрой деполяризации (dV/dt_{\max}). Б – запись ПД при сжатой временной шкале.

При этом амплитуда ПД и скорость фазы быстрой деполяризации монотонно снижались. Длительность фазы медленной диастолической деполяризации увеличивалась на 33%, а ее скорость замедлялась на 35%. Частота генерации ПД снижалась на 18% по сравнению с контролем. Восстановление электрической активности происходило через несколько часов после удаления блокатора из нормального раствора.

Полученные данные о влиянии нифедипина (0.05–1 мкМ) на dV/dt_{\max} у клеток типа истинного и скрытого водителей ритма кролика соответствовали кривой, заданной уравнением Хилла (рис. 3.5.1.3. Б). Пороговая концентрация нифедипина для dV/dt_{\max} у клеток, работающих в режиме истинного и скрытого водителей ритма, составила ~ 0.05 мкМ. Эффективная концентрация (EC_{50}) для клеток типа истинного водителя ритма равнялась 0.1 мкМ, для клеток типа скрытого водителя ритма – 0.15 мкМ. Прекращение

спонтанной активности у препаратов СП области кролика происходило при 0.5 мкМ нифедипина.

Таким образом, у клеток СП узла кролика наиболее подвержены действию нифедипина амплитуда ПД и скорость фазы быстрой деполяризации ПД. При этом клетки типа истинного водителя ритма чувствительнее (в 1.4 раза) к блоку Ca^{2+} -каналов, чем клетки типа скрытого водителя ритма. Кроме того, нифедипин (0.5 мкМ) замедлял скорость фазы медленной диастолической деполяризации, что свидетельствует о вкладе Ca^{2+} -тока L-типа в формирование пейсмекерного потенциала.

Проведенные эксперименты с нифедипином, блокатором медленного Ca^{2+} -тока L-типа, показали, что у обоих видов исследуемых животных происходило снижение скорости фазы быстрой деполяризации. При этом клетки, работающие в режиме истинного водителя ритма, СП узла кролика оказалась в два раза чувствительнее к действию нифедипина, чем клетки СП узла мыши (EC_{50} составила 0.1 и 0.2 мкМ соответственно). Нифедипин (0.5 мкМ) замедлял скорость фазы медленной диастолической деполяризации на ~ 35% у препаратов СП узла кролика и мыши. Блок электрической активности у многоклеточных препаратов СП области кролика зарегистрирован при 0.5 мкМ, у мыши – при 2 мкМ.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение функционального вклада ионных токов в процесс генерации ПД клеток, формирующих ритм ведущего центра автоматизма сердца, остается одной из основных задач электрофизиологии. Несмотря на многолетние исследования, точные молекулярные механизмы, лежащие в основе генерации спонтанных импульсов, остаются до конца не выясненными [Dobrzynski et al., 2007; DiFrancesco, 2010; Verkerk, Wilders, 2013].

Вопрос об относительной роли отдельных ионных токов, в том числе протекающих с участием ионов натрия, в формировании автоматизма остается предметом дискуссий. Ионы натрия поступают в клетку с током, активируемым гиперполяризацией (I_f) [DiFrancesco, 1993; Бокерия и др., 2009; Monfredi et al., 2010; Cummins et al., 2013], входящим Na^+ -током [Zhang et al., 2000; Veldkamp et al., 2003; Lei et al., 2004] и током Na^+ - Ca^{2+} -обменного механизма [Maltsev, Lakatta, 2009; Severi et al., 2012]. Гомеостаз натрия в клетках осуществляет, главным образом, Na^+/K^+ -АТФаза. Стоит отметить, что вклад ионных токов в процесс формирования ПД может меняться в пределах СП области, поскольку синусно-предсердный узел является анатомически и электрофизиологически гетерогенной структурой. На способность клеток генерировать спонтанные импульсы оказывает влияние соединительная и окружающая предсердие ткань [Baruscotti, Robinson, 2007]. В связи с этим исследования, направленные на изучение функционального вклада натриевых токов на многоклеточных препаратах СП области в условиях, близких к физиологическим, представляют как теоретическое, так и практическое значение.

4. 1. Механизмы формирования автоматизма в СП узле мыши

Для изучения физиологических функций генов, а также сердечных заболеваний, в том числе и дисфункции СП узла в последние десятилетие активно используются модели генетически-модифицированных мышей [Lei

et al., 2005; Liu et al., 2007; Pott et al., 2007]. Чтобы оценить фенотипические последствия таких генетических манипуляций важно понимать механизмы генерации спонтанных импульсов у клеток водителя ритма СП узла мышцы. Большинство работ выполнено на изолированных клетках [Mangoni, Nargeot, 2001, Cho, et al., 2003; Lei et al., 2004] и данные о биофизических свойствах мембран пейсмекерных клеток этих животных по-прежнему немногочисленны и противоречивы.

Цель данного исследования заключалась в изучении функциональной роли токов с участием ионов натрия в генерации автоматизма. Работа проводилась на полосках СП области мышцы, включающих СП узел. Метод микроэлектродной техники в сочетании с ингибиторным анализом позволил оценить роль ионных токов в формировании различных фаз на основе изменения конфигурации ПД.

4. 1. 1. Роль Na^+ -тока в генерации ПД клеток водителя ритма

Участие Na^+ -тока в формировании фазы быстрой деполяризации.

Полученные результаты демонстрируют, что потенциал-зависимые Na^+ -каналы играют важную роль в генерации автоматизма клеток, работающих в режиме истинного и скрытого водителей ритма СП области мышцы. Наши данные свидетельствуют, что в области артерии СП узла клетки водителя ритма, характеризующиеся низкой ($dV/dt_{max}=3$ В/с) величиной первой производной нарастания ПД в фазу 0, чувствительны к блокаторам Na^+ -каналов. Добавление в перфузирующий раствор ТТХ (25 мкМ) и лидокаина (25 мкМ) снижало dV/dt_{max} почти в два раза по сравнению с контролем. Аналогичный эффект нами зарегистрирован при снижении внеклеточной концентрации ионов натрия.

Ранее косвенные свидетельства о вкладе Na^+ -тока были получены в других лабораториях. Verkerk и соавт. у изолированных клеток СП узла человека зарегистрировали входящий ток, переносимый Na^+ [Verkerk et al., 2009]. При снижении внеклеточной концентрации Na^+ получено пропорциональное снижение скорости нарастания ПД в фазу 0 у клеток СП

узла кролика [Головко, 2009]. Na^+ -ток зарегистрирован в клетках водителя ритма у новорожденных кроликов [Baruscotti et al., 1996, Baruscotti et al., 2007] и собак [Protas et al., 2010]. В области СП узла мыши экспрессируются две изоформы потенциалзависимых Na^+ -каналов – $\text{Na}_v1.1$ и $\text{Na}_v1.5$ [Maier et al., 2003; Lei et al., 2004; Lei et al., 2008], а при добавлении ТТХ (100 нМ, 30 мкМ) в контрольный раствор у клеток со скоростью фазы быстрой деполяризации ~ 50 В/с зарегистрировано замедление нарастания переднего фронта потенциала действия в фазу 0 [Lei et al., 2004].

С помощью ингибиторного анализа нами проведена оценка вклада Na^+ -тока в генерацию автоматизма у клеток СП узла мыши с dV/dt_{\max} от 1.5 до 50 В/с. Полученные экспериментальные результаты впервые демонстрируют замедление скорости фазы быстрой деполяризации в присутствии ТТХ, лидокаина и гипонатриевого раствора у клеток с самой медленной dV/dt_{\max} (~ 3 В/с).

Анализ изменения морфологии ПД в присутствии гипонатриевых растворов показал, что замедление этого параметра происходило пропорционально снижению трансарколеммального градиента Na^+ . Чувствительность dV/dt_{\max} к гипонатриевым растворам у клеток типа истинного водителя ритма была продемонстрирована ранее на многоклеточных препаратах СП области кролика [Головко, 2009].

Использование лидокаина в качестве блокатора потенциал-зависимых Na^+ -каналов позволило проанализировать эффекты ингибирования в широком диапазоне концентраций (от 12 до 1000 мкМ). Благодаря этому были получены более полные данные об изменении фазы быстрой деполяризации в присутствии блокатора Na^+ -каналов. Нами установлено, что фаза 0 у клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма, в ~ 1.7 раза устойчивее к ингибированию Na^+ -каналов лидокаином по сравнению с клетками, работающими в режиме скрытого водителя ритма (концентрация EC_{50} составила 35 и 20 мкМ, соответственно). Полученные различия в чувствительности к лидокаину у клеток, работающих в режиме истинного и

скрытого водителя ритма, согласуются с экспрессией изоформ субъединиц каналов $Na_v1.1$ и $Na_v1.5$ в пределах СП узла мыши [Lei et al., 2004].

У клеток, предположительно работающих в режиме скрытого водителя ритма, изолированных у мышей с нокаутом гена *SCN5A* (ген кодирует порообразующую субъединицу сердечной изоформы Na^+ -канала $Na_v1.5$), частота спонтанных сокращений снижалась на 14%, а в препаратах СП узла мыши – на 24%, по сравнению с животными дикого типа [Lei et al., 2005]. Мы предполагаем, что в наших экспериментах лидокаин (25, 50 мкМ) снижал частоту генерации ПД на 20-30%, поскольку ингибировал обе изоформы Na^+ -каналов ($Na_v1.5$ и $Na_v1.1$), экспрессирующиеся в СП узле мыши [Maier et al., 2003; Lei et al., 2004]. Стоит отметить, что данные, полученные экспериментально или рассчитанные с помощью математического моделирования о мутациях генов, кодирующих каналы нейронального типа $Na_v1.1$, в настоящее время отсутствуют.

В математической модели генерации потенциалов действия клеток СП узла кролика [Zhang et al., 2000] Na^+ -ток присутствует только у клеток, работающих в режиме скрытого водителя ритма с $dV/dt_{max} = 60$ В/с. Тогда как наши эксперименты убедительно демонстрируют, что Na^+ -ток участвует в генерации ПД у клеток с самой медленной dV/dt_{max} , задающих ритм всего сердца. По нашим оценкам вклад Na^+ -тока в формирование фазы быстрой деполяризации у клеток типа истинного и скрытого водителя ритма СП узла мыши составляет 30–35% и 50–55% соответственно.

Участие Na^+ -тока в формировании фазы медленной диастолической деполяризации. На основе ранее проведенных исследований [Lei et al., 2004, 2005; Nikmaram et al., 2008] и математического моделирования [Kharche et al., 2011] было сделано предположение, что Na^+ -ток может участвовать в заключительном этапе диастолической деполяризации, способствуя повышению скорости пейсмекерного потенциала в клетках СП узла мыши. Для проверки этого утверждения мы провели подробный анализ изменения фазы 4 в присутствии блокаторов Na^+ -каналов и гипонатриевых растворов.

С помощью фармакологического анализа было установлено, что ингибирование Na^+ -каналов лидокаином и ТТХ в клетках СП узла мыши приводит к увеличению длительности фазы медленной диастолической деполяризации и замедлению ее скорости (табл. 4.1.1.1.). Аналогичный эффект зарегистрирован ранее на морской свинке [Bosnjak et al., 1986]. Однако необходимо отметить, что эффекты ТТХ (25 мкМ) на пейсмекерный потенциал оказались выражены в два раза сильнее, чем лидокаина (50 мкМ). Можно предположить следующий механизм, лежащий в основе этого расхождения. Известно, что ТТХ не проникает вглубь поры Na^+ -канала (рис. 2.3.1.), а чувствительность к блокатору варьирует в зависимости от изоформы Na^+ -каналов [Satin et al., 1992; Lei et al., 2008; Карпушев и др., 2013]. Так высокое сродство к ТТХ у сердечной изоформы $\text{Na}_v1.5$ связано с заменой аминокислоты Туг на Cys в положении 374, а также с электростатическим притяжением между положительно заряженными гуанидиновыми группами токсина и отрицательно заряженными кислотными группами в месте связывания поры Na^+ -канала [Satin et al., 1992]. В отличие от ТТХ лидокаин проникает внутрь поры Na^+ -канала и связывается с фенилаланином (Phe 1759), перекрывая просвет поры канала, а полная непроницаемость достигается путем электростатического барьера [McNulty et al., 2007]. При замене этой аминокислоты сродство к местным анестетикам снижается более чем в десять раз [McNulty et al., 2007; Hanck et al., 2009; Sheets et al., 2010]. Таким образом, можно предположить, что различия в эффектах ТТХ и лидокаина обусловлены химическим строением молекул ингибиторов и степенью специфичности действия на Na^+ -каналы (рис. 2.3.1.).

Как и ожидалось, эффекты снижения внеклеточной концентрации Na^+ на пейсмекерный потенциал оказались более выражены по сравнению с действием селективных блокаторов Na^+ -каналов (табл. 4.1.1.1.). Поскольку при использовании гипонатриевых растворов общий ток уменьшается

настолько, насколько он обусловлен замещенными ионами [Головко, 2009], то в этом случае подавляются все токи, протекающие с участием Na^+ .

Используя полученные результаты и имеющиеся литературные данные (табл. 4.1.1.1.), мы оценили вклад токов, протекающих с участием ионов натрия, в формирование фазы медленной диастолической деполяризации. Согласно нашим расчетам у клеток типа истинного водителя ритма СП узла мыши, вклад тока активируемого гиперполяризацией (I_f) в общую сумму входящих Na^+ -токов, участвующих в генерировании фазы МДД, составляет ~45–50%. Ингибирование фазы 4 лидокаином и ТТХ свидетельствует об участии в этом процессе входящего Na^+ -тока. На его долю приходится ~25–30%. Оставшиеся 20–30%, скорей всего, генерируются смешанными токами Na^+/K^+ -насоса и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма.

Таблица 4.1.1.1.

Эффекты ингибирования токов, участвующих в формировании фазы 4, у клеток истинного водителя ритма СП узла

Блокатор	Объект исследования	Ионный ток	МДД	V_4	ОДП Д	Авторы
ТТХ 25 мкМ	Препарат СП узла мыши	I_{Na}	+72%	-55%	+45%	Головко, Лебедева, 2013
ТТХ 30 мкМ	Модель СП узла мыши	I_{Na}	+73%	-29%	+38%	Kharche et al., 2011
Лидокаин 50 мкМ	Препарат СП узла мыши	I_{Na}	+42%	-20%	+30%	Головко, Лебедева, 2013
Лидокаин 400 мкМ	Препарат СП узла морской свинки	I_{Na}	+21%	-37%	+35%	Bosnjak et al., 1986
Ивабрадин 3 мкМ	Препарат СП узла мыши	I_f	+61%	-46%	+24%	Golovko, Gonotkov, 2014
Убаин 10 мкМ	Препарат СП узла мыши	I_{NaK}	+25%	-27%	+14%	Лебедева, 2014
Na^+ 50%	Препарат СП узла мыши	$I_f, I_{\text{NaK}}, I_{\text{Na}}, I_{\text{NaCa}}$	+123%	-51%	+65%	Lebedeva, Golovko, 2011

Примечание: МДД – длительность медленной диастолической деполяризации; V_4 – скорость фазы медленной диастолической деполяризации; ОДПД – общая длительность потенциала действия.

Таким образом, полученные нами экспериментальные результаты, позволяют сделать вывод, что входящий Na^+ -ток участвует в формировании фазы быстрой деполяризации и фазы медленной диастолической

деполяризации у клеток типа истинного водителя ритма СП узла мышцы. Снижение концентрации ионов натрия в физиологическом растворе приводит к пропорциональному замедлению максимальной скорости деполяризации ПД в фазу 0 у клеток водителя ритма мышцы. Вклад Na^+ -тока в фазу 0 составляет 30–35%, а в фазу 4 – 10–15%. Это позволяет заключить, что потенциал-управляемые Na^+ -каналы играют важную роль в контроле автоматизма клеток с самой низкой dV/dt_{\max} , задающих ритм всего сердца.

4. 1. 2. Вклад Ca^{2+} -тока L-типа в морфологию ПД

Проведенное исследование позволяет заключить, что натриевый ток присутствует у клеток с самой медленной скоростью фазы быстрой деполяризации, являющихся истинными водителями ритма СП области мышцы. В то же время в современной литературе преобладает мнение, что основную роль у клеток центральной области СП узла в генерации автоматизма играет Ca^{2+} -ток, а Na^+ -ток инактивирован [Kodama, et al. 1997; Mangoni, Nargeot, 2008]. В частности этот вывод основывался на исследовании, проведенном Kodama и соав. [Kodama, et al. 1997]. Эксперименты, выполненные на небольших фрагментах ткани, взятых из разных областей СП узла кролика, показали, что нифедипин (2 мкМ) полностью подавляет электрическую активность клеток из центра СП узла ($dV/dt_{\max} < 10$ В/с), но не меняет параметры ПД клеток периферии ($dV/dt_{\max} > 40$ В/с). Добавление ТТХ (20 мкМ) напротив не влияет на параметры ПД клеток центральной области, но снижает dV/dt_{\max} (от 100 В/с до 5 В/с) и замедляет частоту генерации ПД в два раза у клеток, взятых с периферии СП узла.

Поэтому для наиболее точной оценки вклада Na^+ -тока в формирование ПД у разных типов пейсмекерных клеток, нами был исследован вклад Ca^{2+} -тока L-типа в клетках СП узла мышцы по аналогии с работой Kodama и соав. [Kodama, et al. 1997]. Кроме того, в доступной литературе данные о влиянии нифедипина на морфологию ПД клеток СП узла мышцы и функциональной роли Ca^{2+} -тока L-типа фрагментарны. Известно, что у мышей с нокаутом гена отвечающего за экспрессию $\text{Ca}_v1.3$ каналов, выражена брадикардия

[Mangoni et al., 2003], а нарушение экспрессии $Ca_v1.2$ каналов у эмбрионов мыши приводит к летальному исходу [Mangoni, Nargeot, 2008].

Участие Ca^{2+} -тока в формировании фазы быстрой деполяризации. В настоящем исследовании установлено, что при ингибировании Ca^{2+} -тока L-типа нифедипином наиболее сильно изменяются такие параметры ПД как амплитуда ПД и скорость фазы быстрой деполяризации. Это согласуется с расчетными данными, полученными с помощью математического моделирования ПД у клеток СП узла сердца мыши с $dV/dt_{max}=10$ В/с [Kharche et al., 2011].

Построены кривые зависимости изменения скорости фазы быстрой деполяризации от концентрации нифедипина для клеток с разной скоростью нарастания переднего фронта ПД (рис. 3.5.1.3.). На основании их анализа впервые установлено, что пороговая концентрация нифедипина у клеток типа истинного водителя ритма в три раза выше, чем у клеток скрытого водителя ритма (0.1 мкМ и 0.03 мкМ соответственно), а эффективная концентрация (EC_{50}) – в 1.5 раза (0.2 мкМ и 0.13 мкМ соответственно). При этом прекращение электрической активности у клеток типа истинного водителя ритма зарегистрировано при концентрации нифедипина 0.5 мкМ, тогда как клетки типа скрытого водителя ритма продолжали генерировать ПД. Прекращение генерирования спонтанных импульсов у этого типа клеток зафиксировано при 1 мкМ. Это согласуется с общепринятым представлениями о роли тока I_{CaL} в пейсмекерной активности в центральной области СП узла кролика [Kodama, et al. 1997]. Сохранение функциональной активности у клеток скрытого водителя ритма СП узла мыши при действии нифедипина (0.5 мкМ), вероятнее всего, происходит за счет ГТХ-устойчивого компонента быстрого Na^+ -тока, протекающего через Na^+ -каналы, сформированные $Na_v1.5$ изоформами, экспрессируемыми на периферии СП узла [Maier et al., 2003; Lei et al., 2004; Baruscotti, Robinson, 2007].

Участие Ca^{2+} -тока в формировании фазы медленной диастолической деполяризации. Известно, что Ca^{2+} -ток L-типа участвует в формировании фазы медленной диастолической деполяризации [Baruscotti, Robinson, 2007; Dobrzynski et al., 2007; Mangoni Nargeot, 2008], однако в настоящее время нет единого мнения об относительной важности I_{CaL} в этом процессе [Mangoni et al., 2006]. Ток, активируемый гиперполяризацией (I_f), по мнению некоторых авторов, является основным током, отвечающим за пейсмекерный потенциал [DiFrancesco, 1993; Bucchi et al., 2002; DiFrancesco, 2010; Monfredi et al., 2010; Cummins et al., 2013]. Результаты, полученные в ходе наших экспериментов, позволили сравнить эффекты нифедипина и ивабрадина, специфического блокатора тока I_f , исследованного ранее [Гонотков, Головко, 2011; Golovko, Gonotkov, 2014].

Полученные нами экспериментальные результаты показывают, что у клеток СП узла мыши, работающих в режиме истинного и скрытого водителей ритма, в присутствии нифедипина происходило удлинение фазы 4 на 25%, снижение её скорости на 30–35%, что приводило к замедлению частоты генерации на 10-15%. Ранее проведенные исследования с ивабрадином (3 мкМ) продемонстрировали, что у клеток типа истинного водителя ритма сердца мыши длительность МДД возрастала на 61%, V_4 замедлялась на 56%, а частота генерации снижалась на ~25% [Gonotkov, Golovko, 2014]. Это дает основание заключить, что в пейсмекерных клетках СП узла мыши Ca^{2+} -ток L-типа участвует в формировании фазы медленной диастолической деполяризации, но его вклад в ~2 раза меньше, чем у тока I_f . Вклад тока I_{CaL} в частоту генерации ПД по наши оценкам составляет 10-15%.

4. 1. 3. Оценка вклада Na^+ -тока и Ca^{2+} -тока L-типа в формировании фаз ПД

На основании ингибиторного анализа нами была проведена оценка вклада Na^+ -тока и Ca^{2+} -тока L-типа в процесс формирования автоматизма у клеток СП узла мыши с разной скоростью нарастания переднего фронта ПД. Полученные на СП узле мыши результаты подтверждают ранее проведенные

исследования на кролике [Kodama, et al. 1997; Zhang et al., 2000], свидетельствующие о различном вкладе Na^+ - и Ca^{2+} -токов в формировании ПД у клеток, работающих в режиме истинного и скрытого водителей ритма.

По результатам проведенного исследования наиболее чувствительным параметром к ингибированию входящего Na^+ -тока и медленного Ca^{2+} -тока L-типа является скорость фазы быстрой деполяризации. Основываясь на анализе построенных нами дозозависимых кривых и литературных данных об экспрессии ионных каналов в пределах СП узла мышцы [Maier et al., 2003; Lei et al., 2004], нами был рассчитан вклад этих токов в формирование фазы 0. По нашим расчетам у клеток типа истинного водителя ритма СП узла мышцы вклад Ca^{2+} -тока в этот процесс составляет 65–70%, а вклад Na^+ -тока – 30–35%. У клеток, работающих в режиме скрытого водителя ритма, роль этих токов в формировании dV/dt_{\max} примерно одинакова. Вероятно, участие наряду с Ca^{2+} -током L-типа, тока I_{Na} повышает надежность генерирования ПД у клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма сердца млекопитающих.

У обоих типов пейсмекерных клеток при ингибировании I_{CaL} и I_{Na} зарегистрировано увеличение длительности пейсмекерного потенциала и замедление его скорости, что в результате приводило к снижению частоты генерации ПД. По нашим расчетам вклад медленного Ca^{2+} -тока L-типа и Na^+ -тока в формировании фазы медленной диастолической деполяризации не превышает 10–15% (рис. 4.4.2).

4. 2. Механизмы формирования автоматизма в СП узле кролика

К настоящему времени электрофизиология клеток СП узла кролика исследована достаточно подробно [Denyer, Brown, 1990; Baruscotti et al., 1996; Kodama et al., 1997; Maltsev et al., 2004; DiFrancesco, 2010]. Последнее время все чаще в качестве объекта исследования стали использовать мышей благодаря тому, что у этих животных можно вызвать различные генетические мутации. Трансгенные мыши дают уникальную возможность для изучения физиологических свойств ионных каналов, токов и их вклада в

генерирование ПД. В тоже время использование разных методических подходов затрудняет сравнение полученных результатов и до сих пор остается актуальным вопрос насколько близки механизмы формирования автоматизма у кролика и мыши – наиболее часто используемых экспериментальных животных.

Для решения этой задачи нами были проведены эксперименты по изучению роли ионных токов в формировании морфологии ПД у клеток водителя ритма сердца кролика с использованием того же методического подхода и в тех же физиологических условиях, как ранее для мыши. Это позволило дополнить имеющиеся данные об электрофизиологии клеток СП узла кролика, а также выявить видовые особенности в генерировании спонтанных импульсов у этих животных.

4. 2. 1. Роль Na^+ -тока в генерации ПД клеток водителя ритма

Результаты исследования демонстрируют, что в клетках СП узла кролика с $dV/dt_{\max} \approx 7$ В/с суммарный направленный через сарколемму внутрь клеток ток, формирующий фазу быстрой деполяризации, чувствителен к лидокаину, блокатору потенциал-управляемых Na^+ -каналов.

Ранее предполагалось, что у клеток центральной области СП узла, имеющих медленную скорость фазы быстрой деполяризации ($dV/dt_{\max} < 10$ В/с), Na^+ -ток инактивирован, поскольку ТТХ (20-30 мкМ) не оказывает влияния на параметры ПД клеток в СП узле кролика [Kodama, et al. 1997; Zhang et al., 2000]. Однако более поздние работы продемонстрировали возможное присутствие Na^+ -тока в клетках, работающих в режиме истинного водителя ритма, и его участие в формировании фазы быстрой деполяризации [Tellez et al., 2006; Zhang et al., 2007; Головкин, 2009].

Для проверки предположения о вкладе Na^+ -тока в генерации спонтанных импульсов у клеток СП области кролика мы проанализировали эффекты лидокаина. Снижение амплитуды ПД, увеличение длительности пика ПД (DPD_{20}) и замедление скорости фазы переднего фронта ПД у клеток с $dV/dt_{\max} \approx 7$ В/с в присутствии лидокаина свидетельствуют об участии Na^+ -

тока в формировании фазы быстрой деполяризации. Установлено, что зависимость величины dV/dt_{\max} от концентрации лидокаина подчиняется уравнению Хилла. При этом пороговая концентрация блокатора составила 100 мкМ, а эффективная концентрация (EC_{50}) – 220 мкМ. Прекращение генерации спонтанных импульсов у препаратов СП области кролика зарегистрировано при 1 мМ лидокаина.

Полученные результаты согласуются с литературными данными. Нечувствительность электрофизиологических параметров ПД клеток СП узла кролика к низким концентрациям лидокаина (10 мкг/мл или 40 мкМ) была показана в работе Satoh и соавт. [Satoh, Hashimoto, 1984]. Gold и соавт. [Gold et al., 1998] продемонстрировали, что лидокаина в концентрации 1 мМ достаточно, чтобы полностью ингибировать Na^+ -каналы в изолированных синномозговых ганглиях у взрослых крыс. Прекращение электрической активности у препаратов СП области кролика при 1 мкМ лидокаина подтверждает важность функционирования Na^+ -каналов для нормальной генерации электрических импульсов у клеток с $dV/dt_{\max} \approx 7$ В/с.

Существуют данные, что лидокаин способен блокировать ток, активируемый гиперполяризацией (I_f). В исследованиях на изолированных клетках СП узла кролика показано, что при 75 мкМ лидокаина ток I_f блокировался на 70% [Rocchetti et al., 1999]. В то же время известно, что у клеток СП узла кролика специфические блокаторы тока I_f ивабрадин (3 мкМ, блокирует ток I_f на 87 %) и Cs^+ (2 мМ) приводили к снижению частоты генерации ПД на 16% [Bucchi et al., 2002] и 30% [Denyer, Brown, 1990] соответственно за счет увеличения длительности фазы 4.

Нами зафиксировано, что у клеток водителя ритма кролика в диапазоне исследуемых концентраций лидокаина от 50 до 1000 мкМ не происходило достоверного увеличения длительности фазы МДД. Однако зарегистрировано замедление V_4 (на 20%) за счет снижения амплитуды спонтанной деполяризации. Пороговая концентрация лидокаина для V_4 была выше 100 мкМ. Поэтому у нас нет оснований полагать, что изменения в фазе

4 в присутствии лидокаина у ПД клеток СП узла кролика связаны с ингибированием тока I_f . Мы предполагаем, что зарегистрированное нами замедление скорости фазы медленной диастолической деполяризации вызвано ингибированием потенциал-управляемых Na^+ -каналов.

4. 2. 2. Вклад Ca^{2+} -тока L-типа в морфологию ПД

В нашей работе продемонстрировано, что фаза быстрой деполяризации у клеток СП узла кролика чувствительна к блокатору Na^+ -каналов – лидокаину. В тоже время, как упоминалось выше, в литературе существует мнение, что основным током, отвечающим за фазу быстрой деполяризации у клеток истинного водителя ритма, является Ca^{2+} -ток L-типа. Для того чтобы определить долю Na^+ -тока в автоматизме клеток кролика проведены эксперименты по выявлению вклада Ca^{2+} -тока L-типа в генерирование ПД.

Анализ полученных результатов выявил, что нифедипин, селективный блокатора Ca^{2+} -тока L-типа, оказывал наиболее сильное ингибирующее действие на амплитуду ПД и скорость фазы быстрой деполяризации. Это частично согласуется с ранее полученными данными [Kodama, et al. 1997]. Однако в отличие от предыдущего исследования, нами зарегистрирована более высокая чувствительность многоклеточных препаратов СП узла кролика к нифедипину. Эффективная концентрация блокатора (EC_{50}) для величины dV/dt_{\max} у клеток типа истинного водителя ритма составила 0.1 мкМ, для клеток скрытого водителя ритма – 0.14 мкМ. Прекращение электрической активности зафиксировано уже при 0.5 мкМ нифедипина. Это может свидетельствовать о том, что функционирование тока $I_{\text{Ca,L}}$ у клеток, работающих в режиме скрытого водителя ритма, является важным условием для генерирования спонтанных импульсов так же, как у клеток типа истинного водителя ритма. К схожему выводу пришли авторы и другой работы [Kurata et al. 2008].

В данном исследовании зарегистрировано, что в присутствии нифедипина (0.5 мкМ) происходило увеличение длительности фазы медленной диастолической деполяризации и замедление ее скорости на 30–

35% по сравнению с контролем. Это свидетельствует о вкладе Ca^{2+} -тока L-типа в формирование фазы 4 и согласуется с результатами, ранее полученными в других лабораториях на изолированных клетках СП узла кролика [Verheijck et al., 1999; Bogdanov et al., 2006]. По нашим расчетам вклад Ca^{2+} -тока L-типа в генерацию автоматизма клеток водителя ритма кролика составляет ~14%.

4. 3. Видовые особенности генерации автоматизма у мыши и кролика

Стандартный протокол экспериментов позволил сравнить эффекты блокаторов ионных каналов на электрофизиологические параметры ПД клеток СП узла двух видов животных – мыши и кролика. Это впервые позволило установить видовые особенности генерирования спонтанных импульсов клетками водителя ритма у этих видов животных.

4. 3. 1. Сопоставление эффектов блокаторов Na^+ – и Ca^{2+} – каналов у клеток СП узла мыши и кролика

Эффекты лидокаина. Сопоставление полученных результатов выявило, что клетки водителя ритма мыши примерно в восемь раз чувствительнее к действию лидокаина, чем клетки кролика. Эффективная концентрация лидокаина EC_{50} составила 35 и 20 мкМ для клеток, работающих в режиме истинного и скрытого водителей ритма СП узла мыши соответственно, и 220 мкМ для клеток кролика ($dV/dt_{\text{max}} \sim 7$ В/с). Стоит отметить, что прекращение спонтанной активности у препаратов СП узла мыши и кролика наступало за счет блокирования фазы 0 при 1 мМ лидокаина. Известно, что эта концентрация лидокаина полностью блокирует Na^+ -ток и генерацию ПД [Gold et al., 1998]. Используемый нами методический подход не позволяет со всей определенностью объяснить механизм, лежащий в основе этих различий. Однако если предположить, что изменение скорости фазы быстрой деполяризации (dV/dt_{max}) пропорционально количеству свободных Na^+ -каналов и согласуется с уравнением Хилла, то действие фармакологического блокатора можно

охарактеризовать константной диссоциации (соответствует концентрации блокатора, при которой достигается 50% подавляющий эффект EC_{50}) и числом молекул блокатора, взаимодействующим с ионным каналом [Gendviliené et al., 1985]. Это позволяет предположить, что полученные эффекты лидокаина связаны с различным количеством Na^+ -каналов, сформированных с участием субъединиц $Na_v1.1$ и $Na_v1.5$ в пределах СП узла у мыши и кролика. Однако ключом к полному пониманию полученного нами эффекта, может явиться расшифровка процессов быстрой и медленной инактивации одиночных ионных каналов, сформированных с участием субъединиц каналов $Na_v1.1$ и $Na_v1.5$ у мыши и кролика.

Лидокаин (50 мкМ для мыши, 500 мкМ для кролика) снижал скорость пейсмекерного потенциала (V_4) у препаратов СП узла мыши и кролика на 20-30%. При этом в клетках СП узла мыши замедление V_4 происходило за счет увеличения длительности фазы 4 (табл. 3.2.2.1; табл. 3.2.2.2.), а в клетках СП узла кролика – за счет снижения амплитуды спонтанной деполяризации (рис. 3.2.3.1).

Полученные результаты и данные литературы позволяют заключить, что изоформы, формирующие поры $Na_v1.5$ и $Na_v1.1$ потенциал-управляемых Na^+ -каналов пейсмекерных клеток мыши и кролика, имея сходство в строении на атомно-молекулярном уровне, различаются по чувствительности к лидокаину.

Эффекты нифедипина. Исследование концентрационной зависимости нифедипина позволило установить, что скорость фазы быстрой деполяризации у клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма, СП узла кролика в два раза чувствительнее к действию нифедипина, чем у клеток мыши (EC_{50} равна 0.1 и 0.2 мкМ для клеток кролика и мыши соответственно). Прекращение электрической активности у препаратов СП узла мыши происходило при 2 мкМ нифедипина, у препаратов кролика – при 0.5 мкМ. Это подтверждает ранее высказанное предположение, что Ca^{2+} -ток L-типа играет более значительную роль в формировании фазы 0 потенциала

действия в клетках водителя ритма кролика, чем мыши [Mangoni et al., 2006; Baruscotti, Robinson, 2007].

Нами установлено, что при экспозиции нифедипина длительность фазы 4 и V_4 у обоих видов животных снижалась на ~30%. Однако ингибирование фазы медленной диастолической деполяризации у клеток СП узла мыши начинается при более низкой концентрации нифедипина, чем у кролика (0.1 и 0.5 мкМ соответственно). Это позволяет предположить, что вклад $I_{Ca,L}$ в формирование фазы медленной диастолической деполяризации у мыши выше, чем у кролика. В то время как фаза быстрой деполяризации у клеток СП узла кролика наоборот, более чувствительна к ингибированию Ca^{2+} -каналов.

Таким образом, при сопоставимой скорости нарастания переднего фронта ПД эффективная концентрация лидокаина, ингибирующая скорость фазы быстрой деполяризации на 50%, у клеток водителя ритма мыши составила ~28 мкМ, что в восемь раз ниже, чем у кролика, а эффективная концентрация нифедипина напротив оказалась в два раза выше у клеток мыши по сравнению с кроликом, и составляла 0.2 мкМ.

4. 3. 2. Роль тока Na^+/K^+ -насоса в генерации ПД у мыши и кролика

Основной путь удаления ионов натрия из клетки осуществляется работой Na^+/K^+ -АТФазы. В результате ее функционирования против градиента концентрации происходит удаление 3 Na^+ и поступление в клетку 2 K^+ и генерируется общий направленный наружу гиперполяризующий ток, I_{NaK} [Sakai et al., 1996; Pieske, Houser, 2003; Болдырев и др, 2006].

В доступной литературе отсутствуют работы по влиянию убаина на трансмембранные ПД или вкладу тока I_{NaK} в генерирование пейсмекерной активности клеток сердца мыши. Экспериментальные результаты по влиянию убаина на параметры потенциалов действия СП узла мыши получены нами впервые. На основе анализа 14 электрофизиологических параметров ПД установлено, что наиболее чувствительными к действию убаина оказались фаза медленной диастолической деполяризация (V_4

замедлялась на 27%) и фаза быстрой деполяризации (dV/dt_{\max} замедлялась на 34%). При экспозиции убаина (10 мкМ) у клеток типа истинного водителя ритма мышцы за счет удлинения фазы 4 происходило снижение частоты генерации спонтанных сокращений на 14% (рис. 4.2.2., Г).

У препаратов СП узла кролика, в отличие от мышцы, при добавлении в солевой раствор 10 мкМ убаина регистрировали прекращение спонтанной электрической активности. При этом наблюдали гиперполяризацию, затем деполяризацию мембраны (от -68 ± 7 до -56 ± 7) и укорочение фазы диастолической деполяризации. На 7–10 мин регистрировали нарушение формирования фазы 4, снижение частоты генерации ПД, появление аритмий и прекращение электрической активности. Интересно, что при низкой концентрации убаин (1 мкМ) вызывал повышение dV/dt_{\max} на 10-15% у клеток водителя ритма СП узла кролика.

Полученные результаты частично согласуются с ранее проведенным исследованием [Steinbeck et al., 1980] (рис. 4.2.1. А), которое также продемонстрировало укорочение фазы 4 при экспозиции убаина.

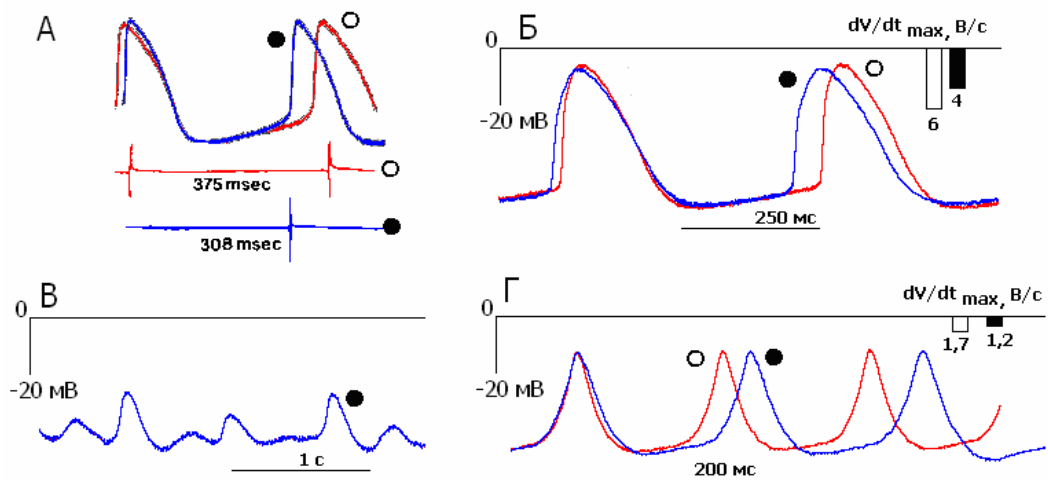


Рис. 4.2.2. Эффекты убаина на генерацию ПД клеток СП узла кролика и мышцы. ○ – контроль; ● – убаин. А. Запись трансмембранных ПД пейсмекерной клетки СП узла кролика вместе с однополярной электрограммой записанной от *crista terminalis* в контроле и при действии убаина (0.5 мкМ, 43 мин экспозиции, 37 °С, вертикальная черта 50 мВ) [Steinbeck et al., 1980]. Б. Трансмембранные ПД клеток СП узла кролика в контроле и при действии убаина (10 мкМ, 2 мин экспозиции, 31 °С). В. Эффекты убаина (10 мкМ) на ПД клетки СП узла кролика, 7 мин экспозиции (31 °С). Г. – Трансмембранные ПД клеток типа истинного водителя ритма СП узла мыши в контроле и при экспозиции убаина, 6 мин (10 мкМ, 31 °С).

Однако данных об изменении других электрофизиологических параметров ПД авторы работы не предоставили.

По всей видимости, зарегистрированные нами эффекты убаина на трансмембранные потенциалы действия клеток водителя ритма кролика, связаны с основным клиническим действием сердечных гликозидов. Известно, что в терапевтических дозах сердечные гликозиды за счет ингибирования чувствительной $\alpha 2$ изоформы Na^+/K^+ -АТФазы вызывают положительное инотропное действие [Dostanic et al., 2003]. Уменьшение внутриклеточного K^+ и повышение Na^+ в кардиомиоцитах понижает трансмембранный Na^+ - Ca^{2+} -обмен. В результате снижается интенсивность выведения Ca^{2+} , что способствует увеличению его содержания в саркоплазме и накоплению в саркоплазматическом ретикулуме. В свою очередь это стимулирует поступление извне дополнительного Ca^{2+} в кардиомиоциты через кальциевые L-каналы [Dostanic et al., 2003]. В результате происходит увеличение силы и скорости сокращения миокарда, систола развивается мощная за более короткий промежуток времени [Dostanic et al., 2003; Болдырев и др, 2006].

Интересно, что в клетках СП узла мыши убаин (1–100 мкМ) не вызывал увеличения скорости фазы быстрой деполяризации и укорочение фазы МДД (рис. 4.2.1). При экспозиции убаина у многоклеточных препаратов СП узла мыши происходило снижение частоты генерации спонтанных сокращений.

В нашей работе установлено, что прекращение генерации спонтанной активности у клеток СП узла мыши наступало при 100 мкМ убаина, у кролика – при 10 мкМ. Полученные результаты согласуются с данными об экспрессии α -субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы и особенностями их структуры. Известно, что $\alpha 1$ субъединица Na^+/K^+ -насоса у грызунов имеет меньшее сродство к убаину, чем у других животных (собака, свинья, человек) [Blanco, Mercer, 1998]. У мышей в $\alpha 1$ изоформе Na^+/K^+ -АТФазы глутамин (Gln 111), определяющий чувствительность фермента к убаину, заменен на

лейцин (Leu 111), что приводит к значительному уменьшению сродства к убаину [Болдырев, 2008; Laursen et al., 2013]. Однако физиологическое значение низкой чувствительности к сердечным гликозидам у грызунов остается предметом дискуссий [Blanco, Mercer, 1998].

Таким образом, блокатор тока Na^+/K^+ -насоса убаин (10 мкМ) вызывал замедление частоты генерации ПД на 14% у клеток СП узла мыши и полностью подавляет спонтанную электрическую активность клеток СП узла кролика.

Ингибиторный анализ показал, что клетки водителя ритма мыши и кролика при сопоставимых значениях dV/dt_{\max} имеют разную чувствительность к селективным блокаторам Na^+ -тока, медленного Ca^{2+} -тока L-типа и тока Na^+/K^+ -насоса. Это позволяет заключить, что вклад этих токов в формировании автоматизма у мыши и кролика имеет видовые особенности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью микроэлектродной техники, использования специфических блокаторов ионных каналов и растворов с пониженным содержанием ионов натрия на многоклеточных препаратах СП узла у мыши и кролика оценена функциональная роль Na^+ -тока, тока Na^+/K^+ -насоса и дополнительно Ca^{2+} -тока L-типа в формировании трансмембранных ПД клеток водителя ритма (рис. 4.4.2.).

На основании полученных результатов мы полагаем, что у пейсмекерных клеток СП узла мыши входящий Na^+ -ток участвует в формировании фазы быстрой деполяризации и фазы медленной диастолической деполяризации. Вклад Na^+ -тока в фазу 0 составляет 30–35% у клеток типа истинного водителя ритма и 50–55% у клеток типа скрытого водителя ритма. Участие Na^+ -тока в формирование фазы 4 оценивается нами в ~ 10–15%.

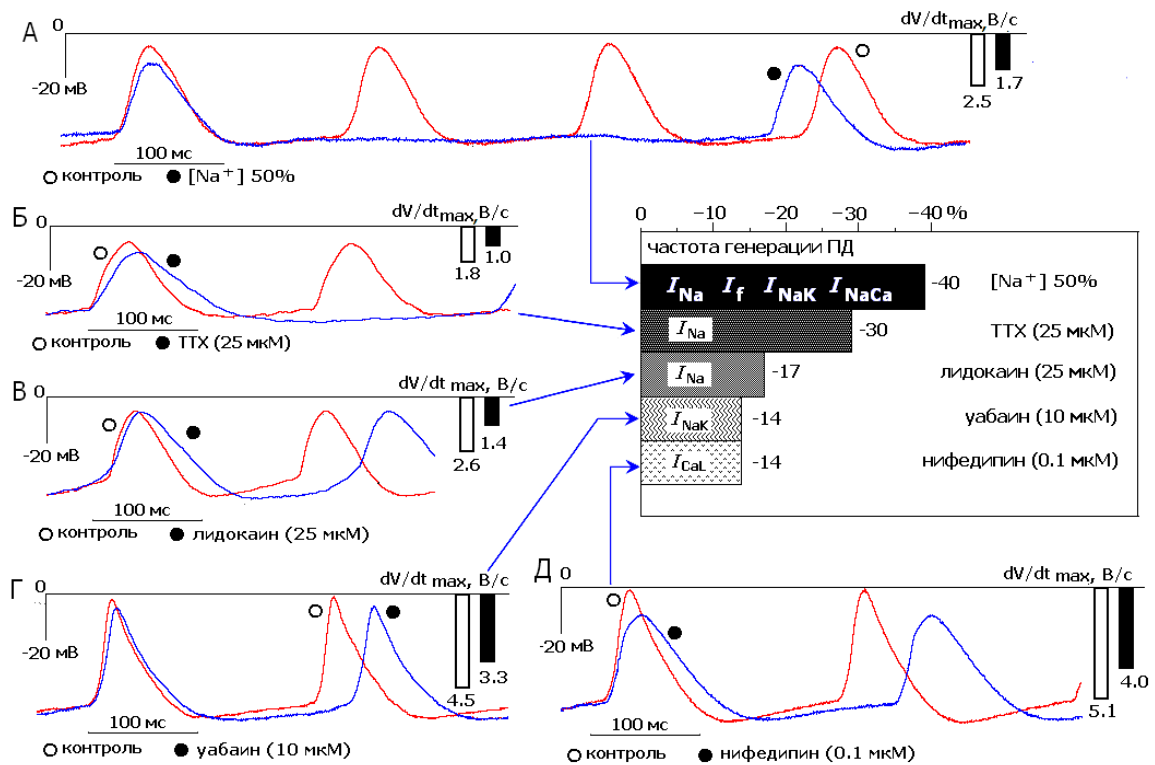


Рис. 4.4.2. Изменение конфигурации ПД и частоты генерации спонтанных импульсов у клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма, СП узла мыши в присутствии гипонатриевого раствора (А) и селективных блокаторов Na^+ -тока (Б, В), тока Na^+/K^+ -насоса (Г) и медленного Ca^{2+} -тока L-типа (Д).

Вклад тока Na^+/K^+ -насоса и Ca^{2+} -тока L-типа в частоту генерации ПД клеток СП узла мыши составляет ~14%. Суммарный вклад токов с участием ионов натрия в генерацию автоматизма клеток СП узла мыши приблизительно равен 40%.

Полученные данные свидетельствуют о различиях в эффектах блокаторов ионных каналов у клеток водителя ритма СП узла у мыши и кролика. Установлено, что Na^+ -каналы в СП узле кролика в восемь раз устойчивее к ингибированию лидокаином, чем у клеток водителя ритма СП узла мыши. В то же время пейсмекерные клетки СП узла кролика продемонстрировали высокую чувствительность к ингибированию тока Na^+/K^+ -насоса (~ 10 раз) и к ингибированию Ca^{2+} -тока L-типа (~ 4 раза), чем было получено на клетках СП узла у мыши.

ВЫВОДЫ

1. У клеток истинного и скрытого водителя ритма синусно-предсердного узла мыши тетродотоксин и лидокаин увеличивают длительность пика потенциала действия и диастолической деполяризации и приводят к замедлению максимальной скорости фазы быстрой деполяризации. Эффективная концентрация лидокаина, ингибирующая скорость фазы быстрой деполяризации на 50%, у клеток водителя ритма мыши составила ~28 мкМ, что в восемь раз ниже, чем у кролика.

2. При сопоставимой скорости нарастания переднего фронта потенциала действия эффективная концентрация нифедипина, подавляющая скорость нарастания потенциала действия на 50%, у клеток истинного водителя ритма мыши составляла 0.2 мкМ, что в два раза выше, чем у кролика.

3. Снижение концентрации ионов натрия в физиологическом растворе приводит к пропорциональному замедлению максимальной скорости деполяризации потенциалов действия в фазу 0 у клеток водителя ритма мыши.

4. Блокатор тока Na^+/K^+ -насоса убаин (10 мкМ) вызывает замедление частоты генерации потенциалов действия на 14% у клеток синусно-предсердного узла мыши и полностью подавляет спонтанную электрическую активность клеток синусно-предсердного узла кролика.

5. Ингибиторные эффекты блокаторов Na^+ -каналов и гипонатриевых растворов свидетельствуют о том, что в клетках синусно-предсердного узла мыши с самой медленной скоростью нарастания переднего фронта потенциала действия (3 В/с) присутствует Na^+ -ток, который вместе с Ca^{2+} -током L-типа участвует в формировании фазы 0 и фазы диастолической деполяризации. Вклад Na^+ -тока в фазу 0 составляет 30–35%, а в фазу медленной диастолической деполяризации – 10–15%.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

$[Na^+]_o$ – внеклеточная концентрация ионов натрия

dV/dt_{max} – максимальная скорость нарастания ПД в фазу 0

EC_{50} – концентрация блокатора, при которой параметр снижается на 50%

E_{max} – максимальный диастолический потенциал

V_4 – скорость фазы медленной диастолической деполяризации

АПД – амплитуда ПД

ДПД₂₀, ДПД₅₀, ДПД₉₀ и ДПД₁₀₀ – длительность потенциала действия на уровне 20%, 50%, 90% и 100% реполяризации

ИВР – истинный водитель ритма

МДД – длительность медленной диастолической деполяризации, фаза 4, пейсмекерный потенциал

ОВ – овершут

ПД – потенциал действия

ПП – потенциал порога

СВР – скрытый водитель ритма

СД – амплитуда спонтанной деполяризации

СП узел – синусно-предсердный узел

ТТХ – тетродотоксин

ЧСС – частота генерации ПД

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамочкин Д. В., Сухова Г. С., Розенштраух Л. В. Механизмы функционирования и регуляции синоатриального узла млекопитающих // Ус. физиол. наук. 2009. Т. 40. №4. С. 20-40.
2. Бокерия Л. А., Бокерия О. Л., Меликулов А. Х., Сергеев А. В., Горячев В. А., Маглакелидзе Д. А., Ле Т. Г. Гены, стволовые клетки и биологические пейсмейкеры // Анналы аритмологии. 2009. № 4. С. 68-78.
3. Болдырев А. А. Na⁺/K-АТФаза – свойства и биологическая роль // Соросовский образовательный журнал. 1998. №4. С. 2-9.
4. Болдырев А. А. Роль Na/K-насоса в возбудимых тканях (обзор) // Journal of Siberian Federal University. Biology 3. 2008. V. 1. P. 206-225.
5. Вислобоков А. И., Борисова В.А., Прошева В. И., Шабанов П. Д. Фармакология ионных каналов. СПб.: Информ-Навигатор. 2012. 528 с.
6. Головкин В. А. Вклад медленного натриевого тока в механизм деполяризации сарколеммы клеток истинного водителя ритма // Росс. физиол. ж. им. И.М.Сеченова. 2009. Т. 95. №4. С. 387-397.
7. Головкин В. А. Механизмы действия внеклеточного калия на генерацию пейсмейкерных потенциалов действия клеток синусно-предсердного клапана кролика // Росс. физиол. ж. им. И.М.Сеченова. 2012. Т. 98. №2. С. 258-268.
8. Головкин В. А. Влияние ионов и температуры на генерацию ритма сердца позвоночных. Ленинград: Наука. 1989. 152 с.
9. Гонотков М. А., Головкин В. А. Отрицательный хронотропный эффект ионов цезия на генерацию трансмембранных потенциалов клеток синусно-предсердного узла у мыши // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2011. Т. 152. № 8. С. 128-131.
10. Головкин В. А., Лебедева Е. А. Участие чувствительного к лидокаину и тетродотоксину тока в генерировании фазы быстрой деполяризации потенциалов действия с низкой dV/dt_{макс} у клеток

синаурикулярного узла мыши // Фізіологічний журн., Киев, Т. 59, №5, 2013, С. 31-40.

11. Гофман Б., Крейнфилд П. Электрофизиология сердца– под ред. Е. Б. Бабского. Москва. 1962. 390 с.

12. Журавлев В.Л., Сафонова Т.А. Физиология сердечно сосудистой системы. СПб.: Изд-во С.–Петербур. ун-та, 2011. – 144 с.

13. Камкин А. Г., Киселева И. С. Физиология и молекулярная биология мембран клеток. М: Академия. 2008. 592 с.

14. Камкин А. Г., Киселева И. С. Атлас по физиологии. В двух томах. Том 1: учеб. пособие. 2010. 408 с.

15. Карпушев А. В., Ревитцер А. В., Рябинкина И. В., Тыщук Е. В. Методика пэгч-кламп в электрофизиологических исследованиях кардиомиоцитов и характеристика ионных каналов миоцитов сердца млекопитающих // Бюллетень Федерального Центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова. 2013. № 1 (18). С. 28-38.

16. Кожечкин С. Н. Микроэлектроды // Приборы и методы для микроэлектродного исследования клеток. Пущино: Научный центр биологических исследований АН СССР. 1975. С. 62-82.

17. Красте И. В. Общая блок-сема установки и методы исследования клеток микроэлектродной техникой // Приборы и методы для микроэлектродного исследования клеток. Пущино: Научный центр биологических исследований АН СССР. 1975. С. 42-62.

18. Кривой И. И. Регуляторная функция $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы // Биофизика. 2012. Т. 57. Вып. 5. С. 771–788.

19. Крыжановский С. А., Вититнова М. Б. Контроль частоты сердечных сокращений – блокаторы f-каналов // Физиология человека. 2009. Т. 35. №2. С. 112-123.

20. Лопатина Е. В., Крылов Б. В., Цырлин В. А. Физиологическая роль сигнальной функции Na⁺K⁺-АТФазы // «Трансляционная медицина»

Сб. науч. тр. (ред. член-корр. РАН, проф. Е. В. Шляхто). – СПб., 2010. С. 312-325.

21. Максимов А. П., Мумладзе Р. К. Предварительные усилители микроэлектродных отведений биопотенциалов // Приборы и методы для микроэлектродного исследования клеток. Пущино: Научный центр биологических исследований АН СССР. 1975. С. 103-115.

22. Полякова Е. Б., Школьникова М. А., Калинин Л. А. Механизмы формирования, классификация, клиническое течение и прогноз «идиопатических» нарушений функций синусового узла в детском возрасте // Вестник аритмологии. 2008. №52. С. 5-13.

23. Резник А. В., Федоров В. В., Розенштраух Л. В. Ионные каналы и токи в кардиомиоцитах // Кардиология. 2006. Т. 46 (2). С. 4-18.

24. Сутягин П. В. Морфологический анализ взаимоотношений миоцитов в синусно-предсердном узле крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2009. Т. 148 (11). С. 589-592.

25. Adachi T., Shibata S., Okamoto Y., Sato S., Fujisawa S., Ohba T., Ono K. The mechanism of increased postnatal heart rate and sinoatrial node pacemaker activity in mice // J Physiol Sci. 2013. V. 63 (2). P. 133-146.

26. Baruscotti M., DiFrancesco D. Pacemaker channels // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2004. V. 1015. P. 111-121.

27. Baruscotti M., DiFrancesco D., Robinson R. B. A TTX-sensitive inward sodium current contributes to spontaneous activity in newborn rabbit sinoatrial node cells // J Physiol. 1996. V. 492. P. 21-30.

28. Baruscotti M., DiFrancesco D., Robinson R. B. Na⁽⁺⁾ current contribution to the diastolic depolarization in newborn rabbit SA node cells // Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000. V. 279. P. 2303-2309.

29. Baruscotti M., DiFrancesco D., Robinson R. B. Single-channel properties of the sinoatrial node Na⁽⁺⁾ current in the newborn rabbit // Pflugers Arch. 2001. V. 442. P. 192-196.

30. Baruscotti M., Robinson R. B. Electrophysiology and pacemaker function of the developing sinoatrial node // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007. V. 293. P. 2613-2623.
31. Berecki G., Wilders R., de Jonge B., van Ginneken A. C., Verkerk A. O. Re-evaluation of the action potential upstroke velocity as a measure of the Na⁺ current in cardiac myocytes at physiological conditions // *PLoS One*. 2010. V. 5 (12). e15772. doi: 10.1371/journal.pone.0015772. P. 1-11.
32. Bers D. M., Despa S. Na⁺ transport in cardiac myocytes; Implications for excitation-contraction coupling // *IUBMB Life*. 2009. V. 61. P. 215-221.
33. Blanco G., Mercer R. W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function // *Am J Physiol*. 1998. V. 275 (5). P. 633-650.
34. Blaustein M. P., Lederer W. J. Sodium/calcium exchange: its physiological implications // *Physiol Rev*. 1999. V. 79. P. 763-854.
35. Bleeker W. K., Mackaay A. J., Masson-Pévet M., Bouman L. N., Becker A. E. Functional and Morphological Organization of the Rabbit Sinus Node // *Circ Res*. 1980. V. 46 (1). P. 11-22.
36. Bogdanov K. Y., Maltsev V. A., Vinogradova T. M., Lyashkov A. E., Spurgeon H. A., Stern M. D., Lakatta E. G. Membrane potential fluctuations resulting from submembrane Ca²⁺ releases in rabbit sinoatrial nodal cells impart an exponential phase to the late diastolic depolarization that controls their chronotropic state // *Circ Res*. 2006. V. 99 (9). P. 979-987.
37. Bosnjak Z. J., Stowe D. F., Kampine J. P. Comparison of lidocaine and bupivacaine depression of sinoatrial nodal activity during hypoxia and acidosis in adult and neonatal guinea pigs // *Anesth Analg*. 1986. V. 65. P. 911-917.
38. Boyett M. R., Honjo H., Kodama I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure // *Cardiovasc. Res*. 2000. V. 47. P. 658-687.
39. Boyett M. R., Honjo H., Yamamoto M., Nikmaram M. R., Niwa R., Kodama I. Downward gradient in action potential duration along conduction path in and around the sinoatrial node // *Am J Physiol*. 1999. V. 276. P. 686-698.

40. Brahmajothi M. V, Morales M. J, Campbell D. L, Steenbergen C., Strauss H. C. Expression and distribution of voltage-gated ion channels in ferret sinoatrial node // *Physiol Genomics*. 2010. V. 42A. P.131-140.
41. Bräu M. E, Vogel W., Hempelmann G. Fundamental properties of local anesthetics: half-maximal blocking concentrations for tonic block of Na⁺ and K⁺ channels in peripheral nerve // *Anesth Analg*. 1998. V. 87. P. 885-889.
42. Brown H. F., Clark A., Noble S. J. Identification of the pace-maker current in frog atrium // *J Physiol*. 1976. V. 258. P. 521-545.
43. Brown H. F., DiFrancesco D., Noble S. J. How does adrenaline accelerate the heart? // *Nature*. 1979. V. 280. P. 235-236.
44. Bucchi A., Baruscotti M., DiFrancesco D. Current-dependent block of rabbit sino-atrial node I_f channels by ivabradine // *J.Gen. Physiol*. 2002. V. 120. P. 1–13.
45. Butters T. D., Aslanidi O. V., Inada S., Boyett M. R., Hancox J. C., Lei M., Zhang H. Mechanistic links between Na⁺ channel (SCN5A) mutations and impaired cardiac pacemaking in sick sinus syndrome // *Circ Res*. 2010. V.107. P. 126-137.
46. Cha C. Y., Himeno Y., Shimayoshi T., Amano A., Noma A. A Novel Method to Quantify Contribution of Channels and Transporters to Membrane Potential Dynamics // *J. Biophysical*. 2009. V. 97. P. 3086–3094.
47. Chandler N. J., Greener I. D., Tellez J. O., Inada S., Musa H., Molenaar P., DiFrancesco D., Baruscotti M., Longhi R., Anderson R. H., Billeter R., Sharma V., Sigg D. C., Boyett M. R., Dobrzynski H. Molecular architecture of the human sinus node insights into the function of the cardiac pacemaker // *Circulation*. 2009. V. 119 (12). P.1562-1575.
48. Cho H. S, Takano M., Noma A. The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node // *J. Physiol*. 2003. V. 550. P. 169-180.

49. Choi H. S., Wang D. Y., Noble D., Lee C. O. Effect of isoprenaline, carbachol, Cs⁺ on Na⁺ activity and pacemaker potential in rabbit SA node cells // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 1999. V. 276. P. 205-214.
50. Cooper P. J., Kohl P. Influence of Diastolic Mechanics on Cardiac Electrophysiology: Effects on Sino-Atrial Node Function // *APICE*. 2003. V. 18. P. 309-405.
51. Cummins M. A., Devenyi R. A., Sobie E. A. Yoga for the sinoatrial node: Sarcoplasmic reticulum calcium release confers flexibility // *J Mol Cell Cardiol.* 2013. V. 60. P. 161-163.
52. Czosek R. J., Haaning A., Ware S. M. A mouse model of conduction system patterning abnormalities in heterotaxy syndrome // *Pediatr Res.* 2010. V. 68. P. 275-280.
53. ¹Denyer J. C., Brown H. F. Rabbit sino-atrial node cells: isolation and electrophysiological properties // *J Physiol.* 1990. V. 428. P. 405-424.
54. ²Denyer J. C., Brown H. F. Pacemaking in rabbit isolated sino-atrial node cells during Cs⁺ block of the hyperpolarization-activated current if // *J. Physiol.* 1990. V. 429. P. 401-409.
55. Dhar Malhotra J., Chen C., Rivolta I., Abriel H., Malhotra R., Mattei L. N., Brosius F. C., Kass R. S., Isom L. L. Characterization of sodium channel α - and β -subunits in rat and mouse cardiac myocytes // *Circulation.* 2001. V. 103 (9). P. 1303-1310.
56. DiFrancesco D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue // *Annu Rev Physiol.* 1993. V. 55. P. 455-472.
57. DiFrancesco D. The role of the funny current in pacemaker activity // *Circ. Res.* 2010. V. 106. P. 434-446.
58. DiFrancesco D., Camm J. A. Heart rate lowering by specific and selective I(f) current inhibition with ivabradine: a new therapeutic perspective in cardiovascular disease // *Drugs.* 2004. V. 64. P. 1757-1765.

59. DiFrancesco D., Ojeda C. Properties of the current I_f in the sino-atrial node of the rabbit compared with those of the current I_K , in Purkinje fibres // *J Physiol*. 1980. V. 308. P. 353-367.
60. DiPolo R., Beaugé L. Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions // *Physiol Rev*. 2006. V. 86. P. 155-203.
61. Dobrzynski H., Boyett M. R., Anderson R. H. New insights into pacemaker activity: promoting understanding of sick sinus syndrome // *Circulation*. 2007. V. 115. P.1921-1932.
62. Dobrzynski H., Li J., Tellez J., Greener I. D., Nikolski V. P., Wright S. E., Parson S. H., Jones S. A., Lancaster M. K., Yamamoto M., Honjo H., Takagishi Y., Kodama I., Efimov I. R., Billeter R., Boyett M. R. Computer three-dimensional reconstruction of the sinoatrial node // *Circulation*. 2005. V. 111. P. 846-854.
63. Du X. J., Feng X., Gao X. M., Tan T. P., Kiriazis H., Dart A. M. $I(f)$ channel inhibitor ivabradine lowers heart rate in mice with enhanced sympathoadrenergic activities // *Br J Pharmacol*. 2004. V. 142. P. 107-112.
64. Frank J. S., Mottino G., Reid D., Molday R. S., Philipson K. D. Distribution of the $Na^{(+)}-Ca^{2+}$ exchange protein in mammalian cardiac myocytes: an immunofluorescence and immunocolloidal gold-labeling study // *J Cell Biol*. 1992. V. 117. P. 337-345.
65. Gold M. S., Reichling D. B., Hampl K. F., Drasner K., Levine J. D. Lidocaine toxicity in primary afferent neurons from the rat // *J Pharmacol Exp Ther*. 1998. V. 285. P. 413-421.
66. Golovko V. The effects of sodium substitution on action potential waveforms in cells with different upstroke velocity of sinoatrial area // XXVIII European Section Meeting ISHR, Medimond. 2008. P. 43-46.
67. Golovko V., Gonotkov M. The contribution of currents involving potassium ions in the formation of action potential in true pacemaker cells of mouse sino-auricular node // *Cardiovasc. Res*. 2014. V. 103. P. 102-103.

68. Golovko V., Gonotkov M., Lebedeva E. Effects of 4-aminopyridine on action potentials generation in mouse sinoauricular node strips // *Physiol Rep.* 2015. V. 3 (7). e12447. doi: 10.14814/phy2.12447. P. 1-8.
69. Gendvilienė V, Macianskienė R, Narusevicius E, Jurevicius J, Veleno A, Duburs G.// Effect of slow calcium channel blockers on the electromechanical activity of frog myocardium in the presence of epinephrine. *Gen Physiol Biophys.* 1985. V. 4 (4). P. 349-358.
70. Guo J., Ono K., Noma A. A sustained inward current activated at the diastolic potential range in rabbit sino-atrial node cells // *J Physiol.* 1995. V. 483 (Pt 1). P. 1-13.
71. Hanck D. A., Makielski J. C., Sheets M. F. Lidocaine alters activation gating of cardiac Na channels // *Pflugers Arch.* 2000. V. 439 (6). P. 814-821.
72. Hanck D. A., Nikitina E., McNulty M. M., Fozzard H. A., Lipkind G. M., Sheets M. F. Using lidocaine and benzocaine to link sodium channel molecular conformations to state-dependent antiarrhythmic drug affinity // *Circ Res.* 2009. V. 105 (5). P. 492-499.
73. Hegyi B., Bárándi L., Komáromi I., Papp F., Horváth B., Magyar J., Bányász T., Krasznai Z., Szentandrassy N., Nánási P. P. Tetrodotoxin blocks L-type Ca²⁺ channels in canine ventricular cardiomyocytes // *Pflugers Arch.* 2012. V. 464 (2). P. 167-174.
74. Herrmann S., Stieber J., Ludwig A. Pathophysiology of HCN channels // *Pflugers Arch.* 2007. V. 454. P. 517-522.
75. Herrmann S., Fabritz L., Layh B., Kirchhof P., Ludwig A. Insights into sick sinus syndrome from an inducible mouse model // *Cardiovasc. Res.* 2011. V. 90. P. 38–48.
76. Ho W. K., Brown H. F., Noble D. High selectivity of the i(f) channel to Na⁺ and K⁺ in rabbit isolated sinoatrial node cells // *Pflugers Arch.* 1994. V. 426. P. 68-74.
77. Hryshko L.V., Philipson K. D. Sodium-calcium exchange: recent advances // *Basic Res Cardiol.* 1997. V.92. P. 45-51.

78. Kaese S., Verheule S. Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size // *Front Physiol.* 2012. V. 3. P. 1-19.
79. Kharche S., Yu J., Lei M., Zhang H. A mathematical model of action potentials of mouse sinoatrial node cells with molecular bases // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011. V.301. P. 945-963.
80. Kodama I., Nikmaram M. R., Boyett M. R., Suzuki R., Honjo H., Owen J. M. Regional differences in the role of the Ca²⁺ and Na⁺ currents in pacemaker activity in the sinoatrial node // *Am J Physiol.* 1997. V. 272. P. 2793-2806.
81. Kreitner D. Electrophysiological study of the two main pacemaker mechanisms in the rabbit sinus node // *Cardiovasc Res.* 1985. V. 19 (5). P. 304-318.
82. Kurata Y., Hisatome I., Imanishi S., Shibamoto T. Dynamical description of sinoatrial node pacemaking: improved mathematical model for primary pacemaker cell // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002. V. 283. P. 2074-2101.
83. Kurata Y., Matsuda H., Hisatome I., Shibamoto T. Regional difference in dynamical property of sinoatrial node pacemaking: role of Na⁺ channel current // *Biophys J.* 2008. V. 95. P. 951-977.
84. Lakatta E. G., DiFrancesco D. What keeps us ticking: a funny current, a calcium clock, or both? // *J Mol Cell Cardiol.* 2009. V. 47. P. 157-170.
85. Larsson H. P. How is the heart rate regulated in the sinoatrial node? Another piece to the puzzle // *J Gen Physiol.* 2010. V. 136 (3). P. 237-241.
86. Laursen M., Yatime L., Nissen P., Fedosova N. U. Crystal structure of the high-affinity Na⁺,K⁺-ATPase-ouabain complex with Mg²⁺ bound in the cation binding site // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013. V. 110 (27). P. 10958-10963.
87. Lei M., Goddard C., Liu J., Léoni A. L., Royer A., Fung S. S., Xiao G., Ma A., Zhang H., Charpentier F., Vandenberg J. I., Colledge W. H., Grace A.

- A., Huang C. L. Sinus node dysfunction following targeted disruption of the murine cardiac sodium channel gene *Scn5a* // *J Physiol*. 2005. V. 567. P. 387-400.
88. Lei M., Huang C. L., Zhang Y. Genetic Na⁺ channelopathies and sinus node dysfunction // *Prog Biophys Mol Biol*. 2008. V. 98 (2-3). P. 171-178.
89. Lei M., Jones S. A., Liu J., Lancaster M. K., Fung S. S., Dobrzynski H., Camelliti P., Maier S. K., Noble D., Boyett M. R. Requirement of neuronal- and cardiac-type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking // *J Physiol*. 2004. V. 559 P. 835-848.
90. Lei M., Zhang H., Grace A. A., Huang C. L. SCN5A and sinoatrial node pacemaker function // *Cardiovasc Res*. 2007. V.74. P. 356-365.
91. Létienne R., Vié B., Le Grand B. Pharmacological characterisation of sodium channels in sinoatrial node pacemaking in the rat heart // *Eur J Pharmacol*. 2006. V. 530. P. 243-249.
92. Li Z. P., Burke E. P., Frank J. S., Bennett V., Philipson K. D. The cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger binds to the cytoskeletal protein ankyrin // *J Biol Chem*. 1993. V. 268. P. 11489-11491.
93. Lingamaneni R., Hemmings H. C. Jr. Differential interaction of anaesthetics and antiepileptic drugs with neuronal Na⁺ channels, Ca²⁺ channels, and GABA(A) receptors // *Br J Anaesth*. 2003. V. 90. P. 199-211.
94. Lipkind GM, Fozzard HA. Molecular modeling of interactions of dihydropyridines and phenylalkylamines with the inner pore of the L-type Ca²⁺ channel // *Mol Pharmacol*. 2003. V. 63 (3) P. 499-511.
95. Liu J., Dobrzynski H., Yanni J., Boyett M. R., Lei M. Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels // *Cardiovasc Res*. 2007. V. 73. P. 729-738.
96. Ludwig A., Budde T., Stieber J., Moosmang S., Wahl C., Holthoff K., Langebartels A., Wotjak C., Munsch T., Zong X., Feil S., Feil R., Lancel M., Chien K. R., Konnerth A., Pape H. C., Biel M., Hofmann F. Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2 // *EMBO J*. 2003. V. 22. P. 216-224.

97. Ludwig A., Herrmann S., Hoesl E., Stieber J. Mouse models for studying pacemaker channel function and sinus node arrhythmia // *Prog Biophys Mol Biol*. 2008. V. 98. (2-3). P. 179-185.
98. Lytton J. Na⁺/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport // *Biochem J*. 2007. V. 406. P. 365-382.
99. Maier S. K., Westenbroek R. E., Yamanushi T. T., Dobrzynski H., Boyett M. R., Catterall W. A., Scheuer T. An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. V. 100. P. 3507-3512.
100. Maltsev V. A., Vinogradova T. M., Bogdanov K. Y., Lakatta E. G., Stern M. D. Diastolic calcium release controls the beating rate of rabbit sinoatrial node cells: numerical modeling of the coupling process // *Biophys J*. 2004. V. 86. P. 2596-2605.
101. Maltsev V. A., Lakatta E. G. Synergism of coupled subsarcolemmal Ca²⁺ clocks and sarcolemmal voltage clocks confers robust and flexible pacemaker function in a novel pacemaker cell model // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009. V. 296 (3). P. 594-615.
102. Maltsev V. A., Lakatta E. G. Funny current provides a relatively modest contribution to spontaneous beating rate regulation of human // *J Mol Cell Cardiol*. 2010. V. 48 (4). P. 804-806.
103. Mangoni M. E., Couette B., Bourinet E., Platzer J., Reimer D., Striessnig J., Nargeot J. Functional role of L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. V. 100 (9). P. 5543-5548.
104. Mangoni M. E., Couette B., Marger L., Bourinet E., Striessnig J., Nargeot J. Voltage-dependent calcium channels and cardiac pacemaker activity: from ionic currents to genes // *Prog Biophys Mol Biol*. 2006. V. 90 (1-3). P. 38-63.
105. Mangoni M. E., Nargeot J. Properties of the hyperpolarization-activated current I_f in isolated mouse sino-atrial cells // *Cardiovasc Res*. 2001. V. 52. P. 51-64.

106. Mangoni M. E., Nargeot J. Genesis and Regulation of the Heart Automaticity // *Physiol Rev.* 2008. V. 88. P. 919-982.
107. Marionneau C., Couette B, Liu J., Li H, Mangoni M. E., Nargeot J., Lei M., Escande D., Demolombe S. Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart // *J Physiol.* 2005. V. 562. P. 223-234.
108. McNulty M. M., Edgerton G. B., Shah R. D., Hanck D. A., Fozzard H. A., Lipkind G. M. Charge at the lidocaine binding site residue Phe-1759 affects permeation in human cardiac voltage-gated sodium channels // *J Physiol.* 2007. V. 581 (Pt 2). P. 741-755.
109. Miles A. J., Fedosova N. U., Hoffmann S. V., Wallace B. A., Esmann M. Stabilisation of Na,K-ATPase structure by the cardiotonic steroid ouabain // *Biochem Biophys Res Commun.* 2013. V. 435 (2). P. 300-305.
110. Mitsuiye T., Guo J., Noma A. Nicardipine-sensitive Na⁺-mediated single channel currents in guinea-pig sinoatrial node pacemaker cells // *J Physiol.* 1999. V. 521 (Pt 1). P. 69-79.
111. Mitsuiye T., Shinagawa Y., Noma A. Sustained inward current during pacemaker depolarization in mammalian sinoatrial node cells // *Circ Res.* 2000. V. 87. P. 88-91.
112. Monfredi O., Dobrzynski H., Mondal T., Boyett M. R., Morris G. M. The Anatomy and Physiology of the Sinoatrial Node—A Contemporary. // *Review Pacing Clin Electrophysiol.* 2010. V. 33 (11). P. 1392-406.
113. Muramatsu H., Nathan R. D., Shimura T. A TTX-sensitive transient Na⁺ current recorded in morphologically identified primary pacemaker cells // *Nihon Ika Daigaku Zasshi.* 1999. V. 66 (5). P. 350-352.
114. Neco P., Torrente A. G., Mesirca P., Zorio E., Liu N., Priori S. G., Napolitano C., Richard S., Benitah J. P., Mangoni M. E., Gómez A. M. Paradoxical effect of increased diastolic Ca(2⁺) release and decreased sinoatrial node activity in a mouse model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia // *Circulation.* 2012. V. 126 (4). P. 392-401.

115. Nikitina L. V., Kopylova G. V., Shchepkin D. V., Nabiev S. R., Bershitsky S. Y. Investigations of Molecular Mechanisms of Actin-Myosin Interactions in Cardiac Muscle // *Biochemistry (Mosc)*. 2015. 80(13):1748-63. doi: 10.1134/S0006297915130106. P. 1748-1763.
116. Nikmaram M. R., Liu J., Abdelrahman M., Dobrzynski H., Boyett M. R., Lei M. Characterization of the effects of Ryanodine, TTX, E-4031 and 4-AP on the sinoatrial and atrioventricular nodes // *Progr. in Biophys. and Mol. Biol.* 2008. V. 96. P. 452-464.
117. Ogawa H., Shinoda T., Cornelius F., Toyoshima C. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺,K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. V. 106 (33). P. 13742-13747.
118. Ono K., Shibata S., Iijima T. Pacemaker mechanism of porcine sinoatrial node cells // *J Smooth Muscle Res*. 2003. V. 39. P. 195-204.
119. Opthof T. Function and structure of the mouse sinus node: nothing you can see that isn't shown // *Cardiovasc Res*. 2001. V. 52. P. 1-4.
120. Opthof T., de Jonge B., Jongsma H.J., Bouman L.N.. Functional morphology of the mammalian sinoatrial node. // *Eur Heart J*. 1987. V. 8 (11). P. 1249-1259.
121. Pieske B., Houser S. R. [Na⁺]_i handling in the failing human heart // *Cardiovasc Res*. 2003. V. 57. P. 874-886.
122. Pott C., Henderson S. A., Goldhaber J. I., Philipson K. D. Na⁺/Ca²⁺ exchanger knockout mice: plasticity of cardiac excitation-contraction coupling // *Ann N Y Acad Sci*. 2007. V. 1099. P. 270-275.
123. Protas L., Oren R. V., Clancy C. E., Robinson R. B. Age-dependent changes in Na current magnitude and TTX-sensitivity in the canine sinoatrial node // *J Mol Cell Cardiol*. 2010. V. 48. P. 172-180.
124. Putrenko I., Schwarz S. K. Lidocaine blocks the hyperpolarization-activated mixed cation current, I_h, in rat thalamocortical neurons // *Anesthesiology*. 2011. V. 115 (4). P. 822-835.

125. Reeves J. P. Na⁺/Ca²⁺ exchange and cellular Ca²⁺ homeostasis // *J Bioenerg Biomembr.* 1998. V. 30. P. 151-160.
126. Reppel M., Fleischmann B. K., Reuter H., Pillekamp F., Schunkert H., Hescheler J. Regulation of Na⁺/Ca²⁺ exchange current in the normal and failing heart // *Ann N Y Acad Sci.* 2007. V. 1099. P. 361-372.
127. Rocchetti M., Armato A., Cavalieri B., Micheletti M., Zaza A. Lidocaine inhibition of the hyperpolarization-activated current (I_f) in sinoatrial myocytes // *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999. V. 34. P. 434-439.
128. Rosen M. R., Brink P. R., Cohen I. S., Robinson R. B. Genes, stem cells and biological pacemakers // *Cardiovasc Res.* 2004. V. 64(1). P. 12-23.
129. Sakai R., Hagiwara N., Matsuda N., Kassanuki H., Hosoda S. Sodium-potassium pump current in rabbit sino-atrial node cells // *J Physiol.* 1996. V. 490. P. 51-62.
130. Sanders L., Rakovic S., Lowe M., Mattick P. A., Terrar D. A. Fundamental importance of Na⁺-Ca²⁺ exchange for the pacemaking mechanism in guinea-pig sino-atrial node // *J Physiol.* 2006. V. 571. P. 639-649.
131. Sandtner W., Egwolf B., Khalili-Araghi F., Sánchez-Rodríguez J. E., Roux B., Bezanilla F., Holmgren M. Ouabain binding site in a functioning Na⁺/K⁺ ATPase // *J Biol Chem.* 2011. V. 286 (44). P. 38177-38183.
132. Satin J., Kyle J. W., Chen M., Bell P., Cribbs L. L., Fozzard H. A., Rogart R. B. A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties // *Science.* 1992. V. 256 (5060). P. 1202-1205.
133. Satoh H. Comparison of the chronotropic responses to local anesthetics (procaine, lidocaine, prilocaine, mepivacaine and bupivacaine) of the canine sinus node in situ // *Jpn J Pharmacol.* 1981. V. 31. P. 85-93.
134. Satoh H. Sino-atrial nodal cells of mammalian hearts: ionic currents and gene expression of pacemaker ionic channels // *J Smooth Muscle Res.* 2003. V. 39 (5). P. 175-193.

135. Satoh H., Hashimoto K. Effect of lidocaine on membrane currents in rabbit sino-atrial node cells // *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1984. V. 270 (2). P. 241-254.
136. Scholz A. Mechanisms of (local) anaesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels // *Br J Anaesth.* 2002. V. 89. P. 52-61.
137. Severi S., Fantini M., Charawi L.A., DiFrancesco D. An updated computational model of rabbit sinoatrial action potential to investigate the mechanisms of heart rate modulation // *J Physiol.* 2012. V. 590. P. 4483–4499.
138. Sheets M. F., Fozzard H. A., Lipkind G. M., Hanck D. A. Sodium channel molecular conformations and antiarrhythmic drug affinity // *Trends Cardiovasc Med.* 2010. V. 20. P.16-21.
139. Sher A. A., Noble P. J., Hinch R., Gavaghan D. J., Noble D. The role of the Na⁺/Ca²⁺ exchangers in Ca²⁺ dynamics in ventricular myocytes // *Prog Biophys Mol Biol.* 2008. V. 96. P. 377-398.
140. Shih H. T. Anatomy of the action potential in the heart // *Tex Heart Inst J.* 1994. V. 21 (1). P. 30-41.
141. Steinbeck G., Bonke F. I., Allessie M. A., Lammers W. J. The Effect of Ouabain on the Isolated Sinus Node Preparation of the Rabbit Studied with Microelectrodes // *Circ Res.* 1980. V. 46 (3). P. 406-414.
142. Stimers J. R., Liu S., Lieberman M. Apparent affinity of the Na/K pump for ouabain in cultured chick cardiac myocytes. Effects of Naⁱ and K^o // *J Gen Physiol.* 1991. V. 98 (4). P. 815-33.
143. Su Z., Sheets M., Ishida H., Li F., Barry W. H. Saxitoxin blocks L-type ICa // *J Pharmacol Exp Ther.* 2004. V. 308 (1). P. 24–29.
144. Sugiyama K., Muteki T. Local anesthetics depress the calcium current of rat sensory neurons in culture // *Anesthesiology.* 1994. V. 80. P. 1369-1378.
145. Sun H., Varela D., Chartier D., Ruben P. C., Nattel S., Zamponi G. W., Leblanc N. Differential Interactions of Na⁺ Channel Toxins with T-type Ca²⁺ Channels // *J Gen Physiol.* 2008. V. 132 (1). P. 101-113.

146. Sunami A., Dudley S. C. Jr., Fozzard H. A. Sodium channel selectivity filter regulates antiarrhythmic drug binding // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997. V. 94. P. 14126-14131.
147. Tellez J. O., Dobrzynski H., Greener, I. D., Graham G. M., Laing E., Honjo H., Hubbard S. J., Boyett M. R., Billeter R. Differential Expression of Ion Channel Transcripts in Atrial Muscle and Sinoatrial Node in Rabbit // *Circ Res*. 2006. V. 99. P. 1384-1393.
148. van der Heyden M. A., Wijnhoven T. J., Opthof T. Molecular aspects of adrenergic modulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels // *Cardiovasc Res*. 2005 V. 65 (1). P. 28-39.
149. van Veen A. A., van Rijen H. V., Opthof T. Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties // *Cardiovasc Res*. 2001. V. 51. P. 217-229.
150. Veldkamp M. W., Wilders R., Baartscheer A., Zegers J. G., Bezzina C. R., Wilde A. A. Contribution of sodium channel mutations to bradycardia and sinus node dysfunction in LQT3 families // *Circ Res*. 2003. V. 92. P. 976-983.
151. Verheijck E. E., van Ginneken A. C., Wilders R., Bouman L. N. Contribution of L-type Ca²⁺ current to electrical activity in sinoatrial nodal myocytes of rabbits // *Am J Physiol*. 1999. V. 276. P. 1064-1077.
152. Verheijck E. E., van Kempen M. J., Veereschild M., Lurvink J., Jongasma H. J., Bouman L. N. Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution // *Cardiovasc Res*. 2001. V. 52. P. 40-50.
153. ¹Verkerk A. O., van Ginneken A. C., Wilders R. Pacemaker activity of the human sinoatrial node: role of the hyperpolarization-activated current, I(f) // *Int J Cardiol*. 2009. V. 132. P. 318-336.
154. Verkerk A. O., Wilders R., van Borren M. M., Peters R. J. G., Broekhuis E., Lam K., Coronel R., de Bakker J. M., Tan H. L. Pacemaker current (I_f) in the human sinoatrial node // *Eur Heart J*. 2007. V. 28. P. 2472-2478.

155. ²Verkerk A. O., Wilders R, van Borren M. M., Tan H. L. Is sodium current present in human sinoatrial node cell? // *Int J Biol Sci.* 2009. V. 5. P. 201-204.
156. Verkerk A. O., van Borren M. M., Wilders R. Calcium transient and sodium-calcium exchange current in human versus rabbit sinoatrial node pacemaker cells // *Scientific World Journal.* 2013. 507872. doi: 10.1155/2013/507872. P. 1-10.
157. Verkerk A. O., Wilders R. Hyperpolarization-activated current, in mathematical models of rabbit sinoatrial node pacemaker cells // *Biomed Res Int.* 2013. 872454. doi: 10.1155/2013/872454. P. 1-18.
158. Viswanathan S., Burch J. B. E., Fishman G. I., Moskowitz I. P., Benson D.W. Characterization of Sinoatrial Node in Four Conduction System Marker Mice // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2007. V. 42. P. 946-953.
159. Wheeler D. M., Bradley E. L., Woods W. T. Jr. The electrophysiologic actions of lidocaine and bupivacaine in the isolated, perfused canine heart // *Anesthesiology.* 1988. V. 68. P. 201-212.
160. Wu J., Schuessler R. B., Rodefeld M. D., Saffitz J. E., Boineau J. P. Morphological and membrane characteristics of spider cells isolated from rabbit sinus node // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001. V. 280 (3). P. 1232-1240.
161. Wu J., Zhang Y., Zhang X., Cheng L., Lammers W.J., Grace A. A., Fraser J. A., Zhang H., Huang C. L., Lei M. Altered sinoatrial node function and intra-atrial conduction in murine gain-of-function *Scn5a*^{+/ Δ KPQ} hearts suggest an overlap syndrome // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012. V. 302. P. 1510-1523.
162. Xu L., Jones R., Meissner G. Effects of local anesthetics on single channel behavior of skeletal muscle calcium release channel // *J Gen Physiol.* 1993. V. 101. P. 207-233.
163. Zahler R., Brines M., Kashgarian M., Benz E. J. Jr., Gilmore-Hebert M. The cardiac conduction system in the rat expresses the alpha 2 and alpha 3 isoforms of the Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992. V. 89 (1). P. 99-103.

164. Zaza A., Micheletti M., Brioschi A., Rocchetti M. Ionic currents during sustained pacemaker activity in rabbit sino-atrial myocytes // *J Physiol*. 1997. V. 505 (3). P. 677-688.
165. Zaza A., Wilders R., Opthof T. Cellular Electrophysiology. *Comprehensive Electrocardiology*, 2nd Ed. Springer, London. 2009. 103 p.
166. Zhang H., Holden A. V., Kodama I., Honjo H., Lei M., Varghese T., Boyett M. R. Mathematical models of action potentials in the periphery and center of the rabbit sinoatrial node // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000. V.279. P. 397-421.
167. Zhang H., Holden A. V., Boyett M. R. Gradient model versus mosaic model of the sinoatrial node // *Circulation*. 2001. V. 103 (4). P. 584-588.
168. Zhang H., Joung B., Shinohara T., Mei X., Chen P. S., Lin S. F. Synergistic dual automaticity in sinoatrial node cell and tissue models // *Circ J*. 2010. V. 74 (10). P. 2079-2088.
169. Zhang H., Vassalle M. Role of $I(K)$ and $I(f)$ in the pacemaker mechanisms of sino-atrial node myocytes // *Can J Physiol Pharmacol*. 2001. V. 79. P. 963-976.
170. Zhang H., Zhao Y., Lei M., Dobrzynski H., Liu J. H., Holden A. V., Boyett M. R. Computational evaluation of the roles of Na^+ current, iNa , and cell death in cardiac pacemaking and driving // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007. V. 292. P. 165-174.
171. Zhang J., Li X., Liang L., Huang S., Zhang H. Effects of external stimuli on the pacemaker function of the sinoatrial node in sodium channel gene mutations models // *Sci China Life Sci*. 2013. V. 56 (9). P. 818-822.