

В.А. Головки, Е.А. Лебедева

Участие чувствительного к лидокаину и тетродотоксину тока в генерировании фазы быстрой деполяризации потенциалов действия с низкой ее скоростью у клеток синоаурикулярного узла мыши

Исследовали эффекты специфических блокаторов натриевых каналов – лидокаина и тетродотоксина (ТТХ) – на генерирование потенциалов действия (ПД) клеток, работающих в режимах истинного и скрытого водителей ритма, в синоаурикулярной (СА) области сердца мыши. Лидокаин (25 мкмоль/л) и ТТХ (25 мкмоль/л) снижали скорость фазы быстрой деполяризации ($dV/dt_{\text{макс}}$) ПД в среднем на 40–50 % у клеток с $dV/dt_{\text{макс}} \approx 3$ В/с. Продолжительность пика ПД возрастала на 30–35 % за счет увеличения его длительности на уровне 20 % реполяризации. Зависимость $dV/dt_{\text{макс}}$ ПД клеток СА-узла от концентрации лидокаина (5–500 мкмоль/л) совпадала с кривой, заданной уравнением Хилла. Пороговая концентрация лидокаина составляла ≈ 20 мкмоль/л, эффективная (подавляющая $dV/dt_{\text{макс}}$ на 50 %) – ≈ 35 мкмоль/л. Клетки, работающие в режиме скрытого водителя ритма, в области артерии СА-узла (15 ± 4 В/с) оказались более чувствительными к блокаторам натриевого тока. В целом полученные результаты свидетельствуют об участии входящего натриевого тока в генерировании фазы быстрой деполяризации ПД у самых «медленных» клеток СА-узла сердца мыши. Ключевые слова: синоаурикулярный узел, трансмембранные потенциалы действия, лидокаин, тетродотоксин, мышшь.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что направленный внутрь потенциалзависимый натриевый ток участвует в формировании фазы быстрой деполяризации («upstroke», $dV/dt_{\text{макс}}$) потенциалов действия (ПД) и в проведении импульсов у возбудимых клеток. Тот факт, что у клеток синоаурикулярной (СА) области с $dV/dt_{\text{макс}} > 20$ В/с в формировании фазы быстрой деполяризации ПД (фаза 0) существенный вклад вносит чувствительный к тетродотоксину (ТТХ) натриевый ток, не вызывает сомнений. Показано, что после добавления ТТХ (3–20 мкмоль/л) в солевой раствор у таких клеток $dV/dt_{\text{макс}}$ ПД замедляется в 4–20 раз по сравнению с контролем. На основании экспериментов,

построены вольт-амперные характеристики для натриевого тока [3, 8, 16]

Вместе с тем вопрос о роли натриевого тока в генерировании фазы быстрой деполяризации ПД клеток центральной зоны СА-узла млекопитающих до сих пор остается предметом для дискуссий. Высказано мнение, что у клеток с самым медленным нарастанием ПД в фазу 0 натриевый ток инактивирован или слишком мал [9, 14]. Однако в литературе имеются сведения о возможном участии данного тока в формировании фазы быстрой деполяризации ПД клеток ($dV/dt_{\text{макс}} \approx 4–5$ В/с) СА-узла сердца человека [20]. Порог для активации этого входящего тока находится на уровне около –60 мВ. В СА-узле сердца кролика, крысы и мыши обнаружена экспрессия

© В.А. Головки, Е.А. Лебедева

изоформ $\text{Na}_v 1,1$ и $\text{Na}_v 1,5$, которые формируют поры потенциалзависимых натриевых каналов [13, 18].

Ранее было показано, что в СА-узле кролика у клеток типа истинного водителя ритма ($dV/dt_{\text{макс}} \approx 3 \text{ В/с}$) замещение натрия на трис (2-амино-2-(гидроксиметил)-пропан-1,3-диол) в солевом растворе приводило к пропорциональному снижению скорости фазы быстрой деполяризации ПД [1]. Это может свидетельствовать о вкладе тока, переносимого с участием Na^+ , в генерировании фазы быстрой деполяризации ПД клеток млекопитающих. Важно отметить, что фаза 0 потенциалов действия у данного типа клеток с $dV/dt_{\text{макс}} \approx 3 \text{ В/с}$ не замедляется в присутствии тетродотоксина (3–30 мкмоль/л) [8] или снижается незначительно – $\leq 15\%$ [3].

Изложенные данные дают основание предположить, что входящий с участием натрия ток может вносить заметный вклад в формирование фазы быстрой деполяризации ПД у клеток СА-узла с самой медленной $dV/dt_{\text{макс}}$. Вероятно, участие, наряду с кальциевым током L-типа, натриевого тока повышает надежность генерирования ПД у клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма сердца млекопитающих. Для проверки этой гипотезы мы исследовали эффекты специфических блокаторов натриевых каналов (лидокаин, ТТХ) на величину $dV/dt_{\text{макс}}$ – показателя суммарного входящего тока во время фазы быстрой деполяризации ПД. Одновременно анализировали влияние блокаторов на основные электрофизиологические параметры ПД клеток в области артерии СА-узла.

МЕТОДИКА

Животные. Опыты проводили на самцах белых мышей ($n=26$) в возрасте 8–16 нед массой $30 \pm 5 \text{ г}$ из питомника животных Института биологии Коми НЦ УрО РАН. Протокол экспериментов был одобрен независимой комиссией по этике Института физиологии Коми

НЦ УрО РАН (прот. №14 от 24 декабря 2009 года). Исследования выполнены с соблюдением международных правил (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th Edition опубликованной the National Academies Press (US) 2011). Животных обездвигивали путем мгновенного смещения шейных позвонков, вскрывали грудную клетку и быстро извлекали сердце.

Регистрация ПД. Препарат имел размер $3 \times 2 \text{ мм}$ и включал область СА-узла, фрагмент ушка правого предсердия с поперечным гребешком (*crista terminalis*) и сегменты верхней и нижней полых вен (*superior u inferior vena cava*) [2, 21]. Затем препарат помещали в проточную термостатируемую камеру, заполненную раствором Тироде следующего состава (ммоль/л): $\text{NaCl} - 140$; $\text{NaHCO}_3 - 10$; $\text{KCl} - 5,4$; $\text{CaCl}_2 - 1,8$; $\text{MgSO}_4 - 1$; глюкоза – 10; $\text{HEPES} - 5$; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 0,33$; $\text{pH} 7,4$. Раствор при поступлении в камеру аэрировали смесью воздуха и O_2 при $31 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. ТТХ и лидокаин («Sigma-Aldrich», Германия) растворяли в деионизированной воде. Стоковые растворы хранились в холодильнике при $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

ПД регистрировали с помощью стеклянных микроэлектродов, заполненных 2,5 моль/л KCl с начальным сопротивлением 20–30 М Ω . Диаметр кончика контролировали под микроскопом («Tesla», Чехия) так, чтобы наружный диаметр кончика микропипеток не превышал 0,2 мкм. Рабочий диапазон усилителя «Electro 705» («World Precision Instruments», США) составлял от 0 до 5 кГц. ПД записывали через аналого-цифровой преобразователь тип E14-140 (L-CARD, Россия) на жесткий диск компьютера. Анализировали следующие показатели ПД: амплитуду (АПД), максимальный диастолический потенциал ($E_{\text{макс}}$, милливольты), длительность пика на уровне 20 % (ДПД₂₀), 50 % (ДПД₅₀), 90 % (ДПД₉₀) и 100 % (ДПД₁₀₀) реполяризации, миллисекунды, длительность диастолической деполяризации (ДД, миллисекунды), частоту генерации ПД (ЧСС, импульсы в минуту), максимальную скорость нарастания

ПД в фазу 0 ($dV/dt_{\text{макс}}$, Вольты на секунду) и скорость фазы медленной диастолической деполяризации (V_4 , милливольты на секунду).

Статистика. Средние значения и среднее квадратичное отклонение ($M \pm \sigma$) для каждой серии рассчитывали по результатам 3–12 экспериментов. Для сравнения групп по средним значениям показателей ПД применяли парный и непарный методы. Данные приведены как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение ($M \pm \sigma$). Значимость различий определяли по критерию U Манна–Уитни. Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая характеристика пейсмекерных ПД. В сино-аурикулярной области вдоль артерии СА узла со стороны субэндокарда регистрировали ПД с медленной диастолической

деполяризацией и скоростью нарастания переднего фронта ПД $dV/dt_{\text{макс}}$ от 2 до 32 В/с. Зарегистрированные ПД были условно разделены на два типа: истинного и скрытого водителей ритма. К истинным относили ПД с $dV/dt_{\text{макс}} < 7$ В/с, наиболее длительным пиком ПД на уровне 50 и 90 % реполяризации и плавным переходом от фазы медленной диастолической деполяризации (фаза 4) к фазе быстрой деполяризации (фаза 0) (рис. 1,а). ПД с медленной ДД, но более высоким значением $dV/dt_{\text{макс}}$ (> 9 В/с) рассматривали как ПД клеток скрытого водителя ритма (см. рис. 1,б). Таким образом, впервые получены результаты, свидетельствующие о том, что в области артерии СА-узла мыши существуют клетки водителя ритма с медленной $dV/dt_{\text{макс}} = 2,9 \pm 1,6$ В/с ($n_{\text{препаратов}} = 25$).

Эффекты лидокаина. Лидокаин является одним из наиболее доступных специфиче-

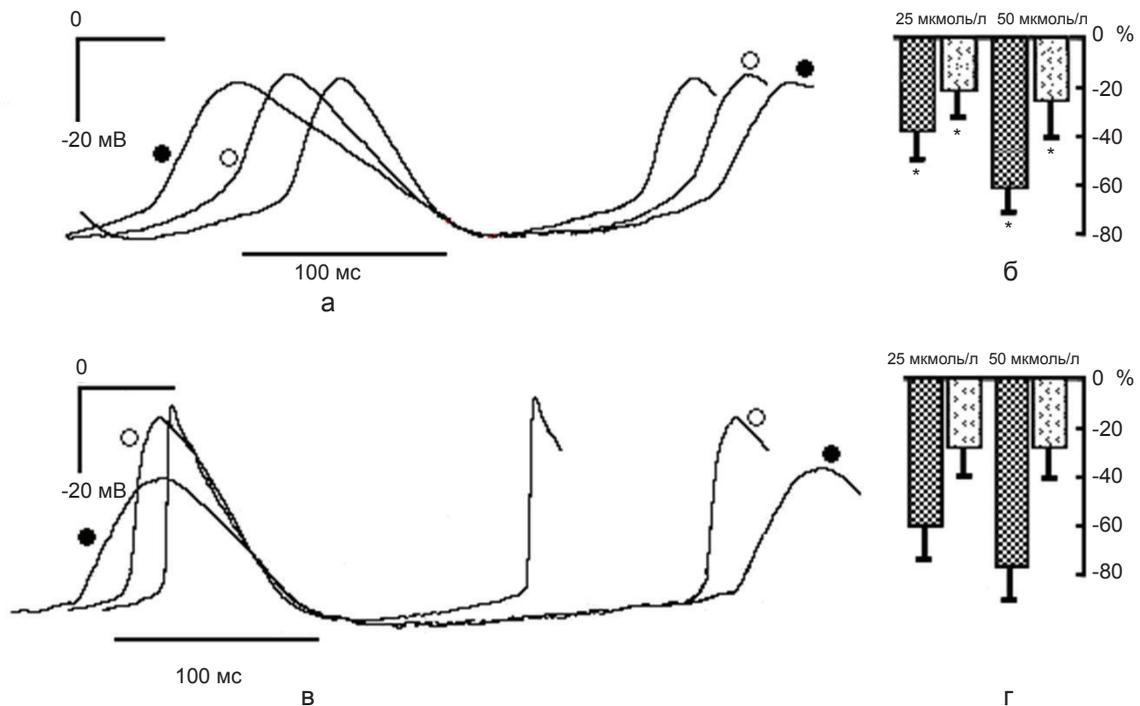


Рис. 1. Изменение конфигурации потенциала действия (ПД) спонтанно сокращающихся полосок синоаурикулярного узла мыши при экспозиции лидокаина (○ – 25; ● – 50 мкмоль/л): а – ПД клетки типа истинного водителя ритма в нормальном растворе ($dV/dt_{\text{макс}} \sim 3$ В/с) и после добавления лидокаина (1,8 и 1,2 В/с соответственно); в – ПД клетки типа скрытого водителя ритма в нормальном растворе ($dV/dt_{\text{макс}} \sim 19$ В/с) и при воздействии блокатора (9 и 2 В/с соответственно); б и г – изменение $dV/dt_{\text{макс}}$ (заштрихованные столбики) и V_4 (светлые столбики) у клеток типа истинного (б) и скрытого (г) водителей ритма. Уровень 0 % соответствует контролю

ских блокаторов потенциалуправляемых натриевых каналов и широко используется в практической медицине как локальный анестетик. Мы не нашли данных о блокировании лидокаином кальциевого тока L-типа. Мы исследовали влияние блокатора в диапазоне концентрации от 5 до 500 мкмоль/л на основные электрофизиологические характеристики ПД. Установлено, что у полосок, сокращающихся спонтанно с частотой 315 ± 36 имп/мин ($n = 25$), лидокаин существенно влиял на длительность ПД на уровне 20 % реполяризации, замедлял скорость нарастания ПД в фазу 0 и скорость фазы ДД, V_4 (см. рис. 1).

Эффекты лидокаина на клетки типа истинного водителя ритма. Лидокаин в концентрации 5–12 мкмоль/л не оказывал влияния на показатели ПД клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма. Повышение концентрации лидокаина от 12 до 25 мкмоль/л приводило к снижению $dV/dt_{\text{макс}}$ ПД от $2,6 \pm 0,8$ В/с до $1,4 \pm 0,3$ В/с ($n_{\text{полосок}} = 5$; $P < 0,05$). Зарегистрировано увеличение длительности ДПД₂₀ на 50 % и медленной ДД на 23 %, а также замедление скорости ее фазы на 15–30 %. В результате частота генерации ПД у клеток истинного водителя ритма за-

медлялась в среднем на 16 % по сравнению с контролем (см. рис. 1,а).

Увеличение концентрации лидокаина в два раза (50 мкмоль/л) приводило к дальнейшему снижению $dV/dt_{\text{макс}}$ ($1 \pm 0,2$ В/с). Эффекты блокатора на остальные анализируемые показатели ПД (ДПД₂₀, длительность и скорость ДД, ЧСС) аналогичны полученным при концентрации лидокаина 25 мкмоль/л. При его концентрации 500 мкмоль/л значение $dV/dt_{\text{макс}}$ было в среднем на 60 % ниже, чем в нормальном растворе Тироде. Длительность ДД возрастала в два раза, а скорость – снижалась вдвое по сравнению с контролем и на 30–35 % по сравнению с концентрацией лидокаина 50 мкмоль/л (см. рис. 1,а,б).

Анализ зависимости скорости фазы 0, $dV/dt_{\text{макс}}$ ПД от концентрации лидокаина в перфузионном растворе выявил, что полученные результаты соответствуют кривой, заданной уравнением Хилла (рис. 2). Пороговая концентрация лидокаина составила ≈ 20 мкмоль/л, а эффективная, подавляющая $dV/dt_{\text{макс}}$ на 50 % (EC_{50}) ≈ 35 мкмоль/л.

Полученные данные свидетельствуют о наличии в клетках истинного водителя ритма СА-узла мыши натриевых каналов, чувстви-

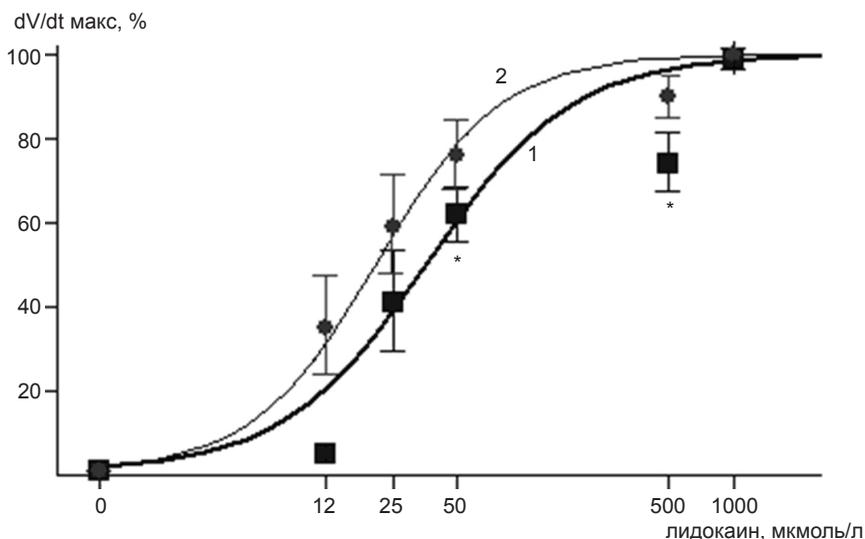


Рис. 2. Блокирование скорости фазы быстрой деполяризации ($dV/dt_{\text{макс}}$) потенциалов действия клеток, работающих в режиме истинного (1) и скрытого (2) водителей ритма в зависимости от концентрации лидокаина. Сплошные линии соответствуют значениям, вычисленным по уравнению Хилла. Значения приведены как $M \pm \sigma$. * $P < 0,05$ по сравнению с клетками типа скрытого водителя ритма

тельных к лидокаину. Эти клетки генерировали ПД с самой низкой $dV/dt_{\text{макс}}$ в фазу 0.

Эффекты лидокаина на клетки скрытого водителя ритма. У полосок СА-области клетки скрытого водителя ритма генерировали ПД с частотой 316 ± 39 имп/мин и значением $dV/dt_{\text{макс}}$, равным $15,5 \pm 4,0$ В/с ($n=22$). Экспозиция препарата в растворе с лидокаином (12 мкмоль/л) вызывала снижение $dV/dt_{\text{макс}}$ ПД до 10 ± 3 В/с (на 33 %) по сравнению с контролем ($n_{\text{препаратов}}=4$; $n_{\text{клеток}}=15$; $P<0,01$). Остальные характеристики ПД при этом не изменялись. Повышение концентрации лидокаина (25 мкмоль/л) приводило к замедлению $dV/dt_{\text{макс}}$ на 25 % по сравнению с 12 мкмоль/л и на 58 % относительно контроля. Продолжительность фазы 4 увеличивалась на 45 %, а ее скорость снижалась на 28 %. В результате частота генерации ПД замедлялась в среднем на 20 % по сравнению с контролем. Лидокаин в концентрации 50 мкмоль/л вызывал дальнейшее снижение $dV/dt_{\text{макс}}$ на 20 %, но не значительно изменял остальные электрофизиологические показатели ПД по сравнению с 25 мкмоль/л (см. рис. 1, в, г). Повышение концентрации блокатора (500 мкмоль/л) вызывало замедление $dV/dt_{\text{макс}}$ на 30 % по сравнению с 50 мкмоль/л и на 78 % по сравнению с контролем. На 5-й минуте экспозиции было отмечено замедление частоты генерирования ПД (рис. 3), но остановки спонтанной актив-

ности при этом не наблюдали.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что клетки скрытого водителя ритма СА-узла мыши более чувствительны к лидокаину, чем клетки истинного водителя ритма.

Эффекты ТТХ на ПД клеток типа истинного водителя ритма. ТТХ остается наиболее распространенным блокатором при анализе электрической активности потенциалуправляемых натриевых каналов у кардиомиоцитов. Нами исследовано влияние ТТХ на конфигурацию ПД у самых медленных клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма в СА-узле мыши.

После добавления в солевой раствор ТТХ (25 мкмоль/л) регистрировали снижение $dV/dt_{\text{макс}}$ от 1,8 до 1 В/с ($n=3$; $P \leq 0,05$). Скорость фазы ДД замедлялась на 50 %. В результате частота генерирования ПД снижалась на 25–30 % по сравнению с контролем (рис. 4, а). Следует отметить, что после экспозиции ТТХ возрастала длительность ПД на уровне 20 % реполяризации, от 51 ± 2 до 65 ± 8 мс ($n_{\text{препаратов}}=3$; $P < 0,05$). Как следствие увеличивалась длительность ПД на уровне 90 % реполяризации. Полученные результаты свидетельствуют о подавлении ТТХ $dV/dt_{\text{макс}}$, увеличении длительности ПД на уровне 20 % реполяризации и снижении скорости ДД почти в два раза по сравнению с контролем (см. рис. 4, а).

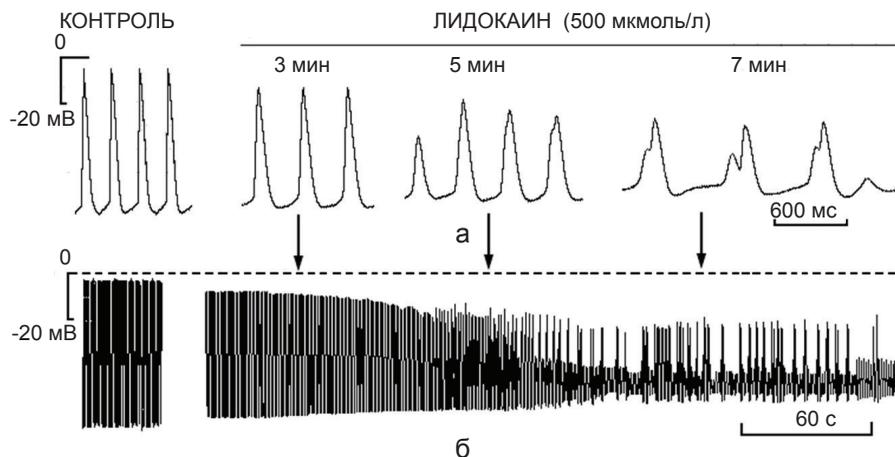


Рис. 3. Развитие эффектов лидокаина на потенциал действия (ПД) клеток, работающих в режиме скрытого водителя ритма синоаурикулярного узла мыши: а – изменение конфигурации ПД; б – запись ПД при сжатой временной шкале

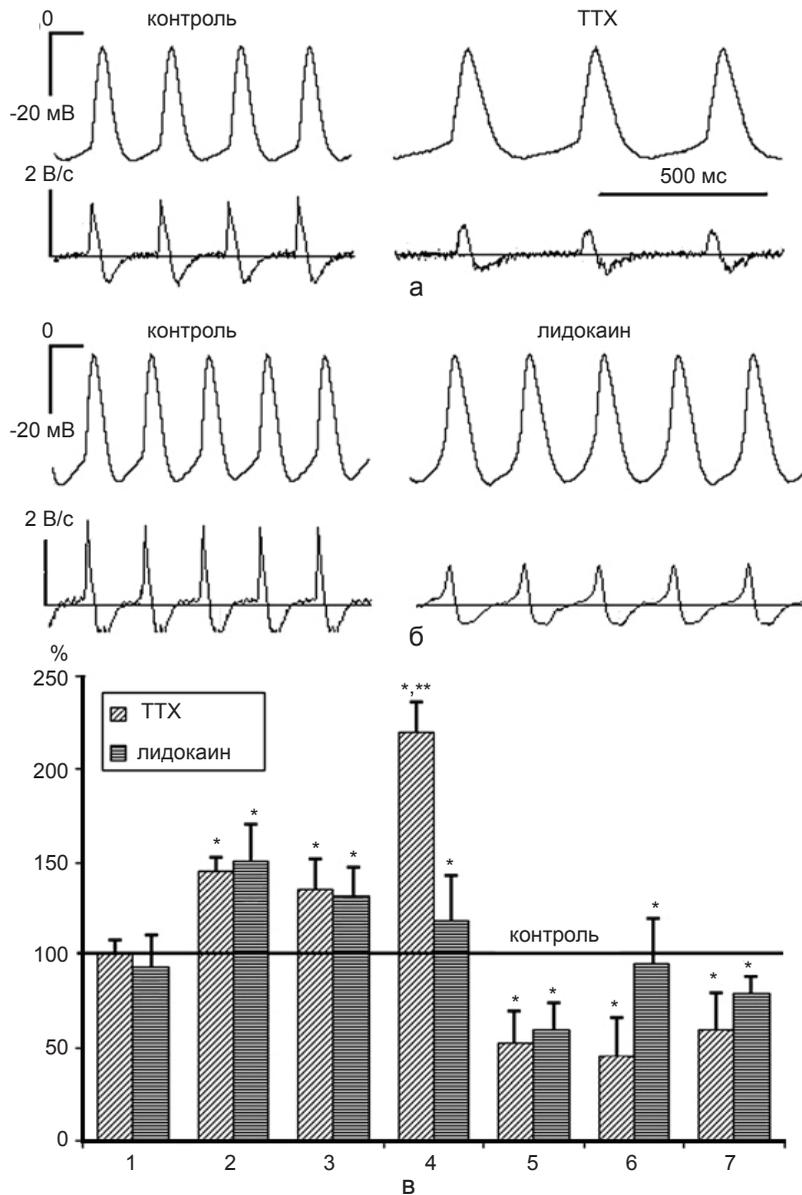


Рис. 4. Эффекты блокаторов натриевых каналов на генерирование потенциалов действия (ПД) клеток типа истинного водителя ритма синоаурикулярного узла мыши: а и б – эффекты тетродотоксина (ТТХ) и лидокаина по 25 мкмоль/л на конфигурацию ПД и скорость фазы быстрой деполяризации ($dV/dt_{\text{макс}}$); в – изменения электрофизиологических показателей ПД клеток в растворе с ТТХ и лидокаином. Уровень 100 % соответствует контролю. * $P < 0,05$ значимость по сравнению с контролем; ** $P < 0,05$ – по сравнению с лидокаином: 1 – амплитуда ПД; 2 и 3 – длительность ПД на уровне 20 и 90 % реполяризации; 4 – диастолическая деполяризация; 5 – максимальная скорость фазы быстрой деполяризации ПД; 6 – скорость фазы ДД; 7 – частота спонтанных сокращений

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами получены данные, свидетельствующие о том, что в правом ушке в области артерии СА-узла мыши существуют клетки водителя

ритма, характеризующиеся низкими величинами первой производной нарастания ПД в фазу 0 ($dV/dt_{\text{макс}}$ равна в среднем 3 В/с). Эти результаты дополняют имеющиеся в литературе [5, 12, 19] сведения об основных элек-

трофизиологических показателях ПД клеток синоартикулярной области мышцы.

До настоящего времени не ясно, какое влияние оказывает лидокаин – препарат, широко применяемый в клинике для местной анестезии, – на генерацию ПД клетками водителя ритма в СА-области сердца млекопитающих. Хорошо изучено его ингибирующее действие на натриевые каналы нервных волокон [15]. Имеются сведения об ингибирующем влиянии лидокаина на частоту сокращений у перфузируемых по Лангендорфу изолированных предсердий крысы [11] и морской свинки [4]. Мы исследовали влияние лидокаина на внутриклеточные ПД клеток СА-узла мышцы с самой медленной скоростью нарастания фазы быстрой деполяризации ПД. Полученные данные свидетельствуют об участии чувствительного к лидокаину и ТТХ входящего натриевого тока в формировании dV/dt_{\max} ПД клеток водителя ритма.

Впервые получена кривая дозозависимого эффекта лидокаина на dV/dt_{\max} в диапазоне 5–500 мкмоль/л, установлены пороговая и эффективная концентрации лидокаина (см. рис. 2). Показано, что экспозиция лидокаина замедляла длительность пика ПД на уровне 20 % реполяризации (см. рис. 4,в). Следовательно, можно полагать, что увеличение продолжительности пика ПД обусловлено ингибированием анестетиком проводимости натриевых каналов.

Лидокаин замедлял скорость фазы ДД ПД, генерируемых клетками, работающими в режиме истинного и скрытого водителя ритма, в среднем на 25 %. По-видимому, лидокаин блокирует ток, активируемый гиперполяризацией [17], и/или опосредованно замедляет ток Na–Ca-обменного механизма [1].

Выявлены различия в чувствительности к лидокаину клеток, работающих в режиме истинного и скрытого водителя ритма (см. рис. 2). Эффективная концентрация лидокаина для клеток истинного водителя ритма была в 1,8 раза больше, чем для клеток скрытого водителя ритма. Для сравнения, у

новорожденных с наследственной мутацией гена SCN5A [6] величина EC_{50} для клеток водителя ритма со скоростью фазы быстрой деполяризации ≈ 16 В/с была почти в четыре раза выше, чем у клеток скрытого водителя ритма СА-узла мышцы (≈ 15 В/с).

Наши результаты свидетельствуют о том, что вклад потенциалуправляемых чувствительных к лидокаину и ТТХ натриевых каналов в формирование ПД клеток, работающих в режиме скрытого водителя ритма, больше по сравнению с клетками истинного водителя ритма. Это согласуется с теоретическими моделями клеток водителя ритма СА-узла кролика [22]. В модели СА-узла мышцы [7] скорость фазы быстрой деполяризации потенциалов действия, генерируемых клетками, была постоянной, тогда как в наших опытах значение этого показателя снижалось на 40–50 % под влиянием блокаторов натриевых каналов. Мы полагаем, что при моделировании электрической активности клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма СА-узла мышцы, следует также учитывать вклад входящего натриевого тока.

В последние годы значительно расширены представления о строении потенциалуправляемых натриевых каналов на молекулярном уровне и взаимодействии их с лидокаином и его производными. Натриевый канал представляет собой пору, образованную α -субъединицей (Na_v) и дополнительной β -субъединицей. Идентифицировано около десяти α -субъединиц и четыре β -субъединицы. Изоформы α -субъединиц по-разному экспрессированы в различных тканях и отличаются по своим фармакологическим свойствам. Например, изоформы $Na_v1,1$ – $1,3$ и $Na_v1,6$ главным образом экспрессированы в нейронах центральной нервной системы и подавляются наномолярными концентрациями ТТХ. Изоформы $Na_v1,5$ в основном экспрессированы в клетках рабочего миокарда предсердий и желудочков млекопитающих и подавляются микромолярными концентрациями ТТХ. Согласно наиболее распростра-

ненной гипотезе, лидокаин проникает внутрь поры натриевых каналов и связывается с фенилаланином (Phe-1579) и тирозином. При этом проводимость одиночного натриевого канала снижается на $\approx 38\%$ [15].

В целом лидокаин и ТТХ вызывали сходные эффекты на клетки истинного водителя ритма СА-узла мыши (см. рис. 4,в). Однако ТТХ сильнее, чем лидокаин, замедлял фазу ДД. Скорее всего, это обусловлено химическим строением молекул ингибиторов и степенью специфичности действия на натриевые каналы. Судя по полученным результатам, можно полагать, что специфичность действия лидокаина на потенциалуправляемые натриевые каналы выше по сравнению с ТТХ. С помощью иммуноблоттинга матричной РНК показано, что изоформы $Na_v1,1$ экспрессированы в центральной части, а $Na_v1,5$ – на периферии СА-узла кролика [18] и мыши [13].

Итак, нами установлено, что у клеток синоаурикулярной области мыши лидокаин и ТТХ ингибировали скорость фазы быстрой деполяризации ПД. Ее снижение в среднем на 40–50 % наблюдали у «медленных» клеток с $dV/dt_{\text{макс}}$ около 3 В/с. Продолжительность пика ПД возрастала на 30–35 % за счет увеличения длительности ПД на уровне 20 % реполяризации в два раза. Зависимость $dV/dt_{\text{макс}}$ ПД клеток, работающих в режиме истинного или скрытого водителя ритма, от концентрации лидокаина подчиняется уравнению Хилла. В совокупности полученные результаты свидетельствуют об участии входящего натриевого тока в генерировании восходящей фазы ПД у самых «медленных» клеток СА-узла сердца мыши.

Активность натриевых каналов регулируется двумя фундаментальными механизмами: временем открывания одиночных каналов и изменением плотности количества каналов в плазматической мембране. Ключом к пониманию физиологической роли натриевого тока в формировании фазы быстрой деполяризации ПД у клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма, может

явиться расшифровка процессов быстрой и медленной инактивации натриевых каналов, сформированных с участием субъединиц каналов $Na_v1,1$ и $Na_v1,5$.

Работа выполнена при поддержке Уральского отделения Российской академии наук (проекты 12-П-4-1054 и 12-У-4-1022) и РФФИ (проект 12-04-32288 мол_а, Л.Е.А.).

В.А. Головки, Е.А. Лебедева

УЧАСТИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО К ЛИДОКАИНУ И ТЕТРОДОТОКСИНУ ТОКА В ГЕНЕРИРОВАНИИ ФАЗЫ БЫСТРОЙ ДЕПОЛЯРИЗАЦИИ ПОТЕНЦИАЛОВ ДЕЙСТВИЯ С НИЗКОЙ ЕЕ СКОРОСТЬЮ У КЛЕТОК СИНОАУРИКУЛЯРНОГО УЗЛА МЫШИ

Проанализированы эффекты лидокаина и тетродотоксина, блокаторов натриевых каналов на трансмембранные потенциалы действия полосок синоаурикулярной (СА) области мыши. Эксперименты проводили с использованием микроэлектродной техники в растворе Тироде (31 °С). Установлено, что скорость фазы быстрой деполяризации ($dV/dt_{\text{макс}}$) потенциалов действия (ПД) самых «медленных» клеток СА-узла замедлялась при действии лидокаина (25 мкмоль/л) и тетродотоксина (25 мкмоль/л) по сравнению с контролем от $3,0 \pm 1,6$ до $1,2 \pm 0,4$ В/с ($n=5$, $P<0,01$) и от $1,6 \pm 0,1$ до $0,8 \pm 0,1$ В/с ($n=3$, $P<0,01$) соответственно. Анализ дозозависимой кривой, построенной с помощью уравнения Хилла, показал, что снижение максимальной скорости деполяризации в фазу 0 на 50 % (EC_{50}) происходило при экспозиции лидокаина ≈ 35 мкмоль/л, а пороговая концентрация составила ≈ 20 мкмоль/л. Следует отметить, что лидокаин и тетродотоксин замедляли длительность пика ПД за счет удлинения на уровне 20 %. Существенное замедление $dV/dt_{\text{макс}}$ при действии блокаторов у клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма, свидетельствует об участии натриевого тока в формировании фазы быстрой деполяризации. Ключом к пониманию физиологической роли натриевого тока в формировании «рпstroke» ПД у клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма, может явиться расшифровка процессов быстрой и медленной инактивации натриевых каналов, сформированных с участием субъединиц каналов $Na_v1,1$ и $Na_v1,5$.

Ключевые слова: синоаурикулярный узел, трансмембранные потенциалы действия, лидокаин, тетродотоксин, мышь.

V. A. Golovko, E.A. Lebedeva

THE INVOLVEMENT OF LIDOCAINE AND TETRODOTOXIN-SENSITIVE CURRENT IN THE GENERATION OF ACTION POTENTIALS UPSROKE WITH LOW DV/DT MAX IN THE CELLS OF THE MOUSE SINOAURICULAR REGION

The effects of the specific blockers of the inward Na-current - lidocaine and tetrodotoxin (TTX) were studied with microelectrode technique on the spontaneously beating strips of the mouse sinoauricular (SA) area. Lidocaine (25 μM) and TTX (25 μM) increased the duration of the peak of the action potentials (AP) of true pacemaker cells by extending the plateau phase (phase 2 or APD 20), slowing the dV/dt max from 2.6 ± 0.8 V/s (n=25) to 1.4 ± 0.3 V/s (n=5, $p < 0.05$) and reducing the velocity of diastolic depolarization (DD) by 20%. The extend of the dV/dt max value decline depended on the lidocaine concentration. The experimental data fully meted to Hill equation. The lidocaine threshold concentration was 20 μM . The lidocaine effective concentration which decreased dV/dt max by 50% (EC50) was 35 μM . The TTX (25 μM) exposure decreased the dV/dt max from 1.6V/s to 0.8 V/s and DD velocity slowed by 49%. It should be noted that TTX also increased the duration of APD20. Our data show that dV/dt max of the true pacemaker cells was reduced by 35-45% after exposure to TTX and lidocaine. This fact confirms the involvement of Na-current in the generation of the upstroke true pacemaker cells AP.

Key words: Transmembrane action potential; true pacemaker, sinoauricular node; lidocaine; tetrodotoxin; mouse.

Institute of Physiology, Komi Science Centre, the Urala Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Головки В.А. Вклад медленного натриевого тока в механизм деполяризации сарколеммы клеток истинного водителя ритма сердца кролика // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2009. – **95**, №4. – С. 387–397.
2. Гонотков, М.А., Головки В.А. Отрицательный хронотропный эффект ионов цезия на генерацию трансмембранных потенциалов клеток синусно-предсердного узла у мыши // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2011. – **152**, № 8. – С. 128–131.
3. Baruscotti M., DiFrancesco D., Robinson R.B. A TTX-sensitive inward sodium current contributes to spontaneous activity in newborn rabbit sino-atrial node cells // J. Physiol. – 1996. – **492**. – P. 21–30.
4. 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. – **65**. – P. 911–917.
5. Cho H.S., Takano M., Noma A. The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node // J. Physiol. – 2003. – **550**. – P. 169–180.
6. Derangeon M., Montnach J., Baró I., Charpentier F. Mouse models of SCN5A-related cardiac arrhythmias // Front Physiol. – 2012. – **3**. – P. 1–4.
7. Kharche S., Yu J., Lei M., Zhang H. A mathematical model of action potentials of mouse sinoatrial node cells with molecular bases // Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol. – 2011. – **301**. – P. 945–963.
8. Kodama I., Nikmaram M.R., Boyett M.R., Suzuki R., Honjo H., Owen J.M. Regional differences in the role of the Ca^{2+} and Na^{+} currents in pacemaker activity in the sinoatrial node // Amer. J. Physiol. – 1997. – **272**. – P. 2793–2806.
9. 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 – **95**. – P. 951–977.
10. 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. – **559**. – P. 835–848.
11. Létienne R., Vié B., Le Grand B. Pharmacological characterisation of sodium channels in sinoatrial node pacemaking in the rat heart // Eur. J. Pharmacol. – 2006. – **530**. – P. 243–249.
12. Liu J., Dobrzynski H., Yanni J., Boyett M.R., Lei M. Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels // Cardiovascular. Res. – 2007. – **73**. – P. 729–738.
13. 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. USA. – 2003. – **100**. – P. 3507–3512.
14. Maltsev V.A., Lakatta E.G. Dynamic interactions of an intracellular Ca^{2+} clock and membrane ion channel clock underlie robust initiation and regulation of cardiac pacemaker function // Cardiovascular. Res. – 2008. – **77**, №2. – P. 274–284.
15. 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. – **581**(Pt 2) – P. 741–755.
16. 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. – **48**. – P. 172–180.
17. Rocchetti M., Armato A., Cavalieri B., Micheletti M., Zaza A. Lidocaine inhibition of the hyperpolarization-activated current (I_f) in sinoatrial myocytes // J. Cardiovascular. Pharmacol. – 1999. – **34**. – P. 434–439.
18. 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 // *Circulat. Res.* – 2006. – **99**. – P. 1384–1393.
19. Temple J., Frias P., Rottman J., Yang T., Wu Y., Verheijck E.E., Zhang W., Siprachanh C., Kanki H., Atkinson J.B., King P., Anderson M.E., Kupersmidt S., Roden D.M. Atrial fibrillation in KCNE1-null mice // *Ibid.* – 2005. – **97**, №1. – P. 62–69.
20. 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_p) in the human sinoatrial node // *Eur. Heart. J.* – 2007. – **28**. – P. 2472–2478.
21. Viswanathan S., Burch J.B., Fishman G.I., Moskowitz I.P., Benson D.W.. Characterization of sinoatrial node in four conduction system marker mice // *J. Mol Cell Cardiol.* – 2007. – **42**, № 5. – P. 946–953.
22. 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 // *Amer. J. Physiol Heart. Circ ulat. Physiol.* – 2000. – **279**. – P. 397–421.

*Ин-т физиологии Коми науч. центра Уральского отделения
Российской академии наук, г. Сыктывкар
E-mail: golovko@physiol.komisc.ru*

*Материал поступил в
редакцию 16.04.2013*