

УДК 612.171+612.178

АВТОМАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕЙСМЕКЕРНЫХ
КЛЕТОК АТРИО-ВЕНТРИКУЛЯРНЫХ КЛАПАНОВ
ПРИ ДЕЙСТВИИ ПАРАСИМПАТИЧЕСКОГО
И СИМПАТИЧЕСКИХ МЕДИАТОРОВ

И. Л. Кошарская, В. А. Макарычев, Л. С. Ульянинский

Лаборатория экспериментальной кардиологии (зав. Л. С. Ульянинский) Института
нормальной физиологии им. П. К. Анохина АМН СССР, Москва

Исследовано влияние норадреналина, адреналина и ацетилхолина в концентрациях $4.5 \cdot 10^{-7}$ М— $2.9 \cdot 10^{-6}$ М на автоматию пейсмекерных клеток атрио-вентрикулярных клапанов сердца кролика. Симпатические медиаторы увеличивали частоту возбуждений вследствие увеличения крутизны нарастания медленной диастолической деполяризации (МДД) или в результате появления дополнительных подпороговых потенциалов, переходящих в ПД. Ацетилхолин в концентрации $1.1 \cdot 10^{-6}$ М уменьшал частоту возбуждений, а в концентрации $2.7 \cdot 10^{-6}$ М подавлял автоматию либо путем внезапного прекращения генерации ПД на фоне затухающих осцилляций мембранных потенциалов, либо вследствие постепенного уменьшения частоты и амплитуды ПД. При одновременном действии одинаковых концентраций ацетилхолина и адреналина или норадреналина отрицательный хронотропный эффект ацетилхолина не только преобладал над действием симпатических медиаторов, но и усиливался под их влиянием. Механизмы взаимодействия этих медиаторов могут быть объяснены их влиянием на проницаемость мембран пейсмекерных клеток по медленному натрий-кальциевому каналу.

Ключевые слова: ацетилхолин, норадреналин, адреналин, потенциал действия.

Исследование экстракардиальной регуляции сердечного ритма остается одной из важнейших проблем кардиологии. При этом особое внимание обращено на изучение механизмов взаимодействия симпатических и парасимпатических влияний на эффекторном органе. Известно, что в условиях целого организма парасимпатические влияния на сердечный ритм преобладают над симпатическими [4, 11, 12]. В последние годы это было подтверждено при исследовании взаимодействия медиаторов на мембрanaх пейсмекерных клеток синоатриального узла: при одновременном действии ацетилхолина и норадреналина в одинаковых концентрациях проявлялся лишь отрицательный хронотропный эффект парасимпатического медиатора [7, 10].

Эффекты взаимодействия симпатических и парасимпатических медиаторов на пейсмекерных клетках потенциальных водителей ритма не исследовались. В данной работе этот вопрос изучали на пейсмекерных образованиях, расположенных в атрио-вентрикулярных клапанах сердца кролика. Как было показано нами ранее [1], эти образования представляют собой сложные морфо-функциональные комплексы, состоящие из Р-клеток, переходных клеток и клеток типа клеток Пуркинье. Образования хорошо иннервированы, причем холинергические первые окончания преобладают над адренергическими. Электрофизиологическое изучение показало, что пейсмекерные клетки генерируют ПД с медленной диастолической деполяризацией (МДД), и их автоматия обеспечивается

преимущественным функционированием медленного Na—Ca канала [²]. Характеристики ПД пейсмекерных клеток атрио-вентрикулярных клапанов сердца кролика оказались сходными с характеристиками ПД пейсмекерных клеток атрио-вентрикулярных клапанов собаки и обезьяны [^{15, 18}].

В настоящей работе при исследовании взаимодействия парасимпатического и симпатических медиаторов на мембранах пейсмекерных клеток атрио-вентрикулярных клапанов проводилось сравнение эффектов раздельного и одновременного действия ацетилхолина и норадреналина или адреналина.

МЕТОДИКА

Работа выполнена на 45 кроликах. Под уретановым наркозом у животных извлекали сердце, помещали его в оксигенированный раствор Тироде при температуре 36—37° и из правого желудочка вырезали створки атрио-вентрикулярных клапанов. Спонтанно сокращающиеся препараты перфузировали раствором Тироде следующего состава (в мМ/л): NaCl — 137; KCl — 2.7; CaCl₂ — 1.8; MgCl₂ — 1.0; NaHCO₃ — 12; NaH₂PO₄ — 0.4; глюкоза — 5.5. Раствор оксигенировали газовой смесью, содержащей 95% O₂ и 5% CO₂; pH раствора — 7.4, температура — 36—37°.

Мембранные потенциалы пейсмекерных клеток отводили с помощью стеклянных микроэлектродов, заполненных 3М KCl, с диаметром кончика 0.5 мкм и сопротивлением 20—40 мОм. Для усиления и регистрации биопотенциалов использовали катодный повторитель СКТБ «Биофизприбор», электроннолучевой осциллограф С1-19Б и шлейфный осциллограф Н041.

Исследовали влияние парасимпатического и симпатических медиаторов на частоту спонтанных возбуждений, амплитуду ПД, уровни критического и максимального диастолического потенциалов. Отечественные препараты адреналина (гидрохлорида), норадреналина (гидротарtrата) и ацетилхолин-хлорида использовали в концентрациях $4.5 \cdot 10^{-7}$ М— $2.9 \cdot 10^{-6}$ М. При изучении эффектов совместного действия парасимпатического и симпатических медиаторов концентрация их в перфузионном растворе была одинаковой. Атропин применяли в концентрации $2.9 \cdot 10^{-7}$ М. Всего было проведено 110 наблюдений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исходная частота спонтанных возбуждений пейсмекерных клеток атрио-вентрикулярных клапанов составляла в среднем 77 ± 4.0 в 1 мин. При регистрации ПД этих клеток во всех опытах отмечалась четко выраженная МДД. Средние величины критического и максимального диастолического потенциалов были соответственно -41 ± 0.8 и -62 ± 1.1 мВ, а величина амплитуды ПД составляла в среднем 54 ± 0.8 мВ.

Действие симпатических медиаторов исследовано в 42 опытах. Адреналин и норадреналин оказывали положительный хронотропный эффект, который начинал проявляться через 4—6 мин и достигал максимума на 10—15-й мин действия медиаторов. При малых концентрациях симпатических медиаторов увеличение частоты возбуждений происходило за счет увеличения крутизны нарастания МДД (рис. 1, *B, B'*), а при больших концентрациях могло также происходить за счет появления дополнительных подпороговых потенциалов, переходящих в регулярные ПД (рис. 1, *G, D*). При этом положительный хронотропный эффект норадреналина был выражен слабее, чем эффект эквимолярных концентраций адреналина.

В первые минуты действия симпатических медиаторов наблюдалась гиперполяризация мембрани и увеличение амплитуды ПД (рис. 1, *B, B'*). В дальнейшем эти эффекты уменьшались при достижении максимального хронотропного действия медиаторов (рис. 1, *B, B', G, G'*).

Действие парасимпатического медиатора исследовано в 28 опытах. Ацетилхолин в концентрации $5.5 \cdot 10^{-7}$ М не оказывал существенного влияния на частоту спонтанных возбуждений пейсмекерных клеток (рис. 2, *A, A'*). При увеличении концентрации медиатора до $1.1 \cdot 10^{-6}$ М наблюдалось заметное понижение частоты возбуждений в среднем на 32% от исходной величины ($p < 0.001$, по данным 8 опытов) вследствие уменьшения крутизны нарастания МДД (рис. 2, *B, B'*). Это происходило при незначительном изменении амплитуды ПД и уровней мембранных потенциалов пейсмекерных клеток.

Увеличение концентрации ацетилхолина до $2.7 \cdot 10^{-6}$ М приводило к подавлению автоматии в течение 5–12 мин. При этом отмечалось два

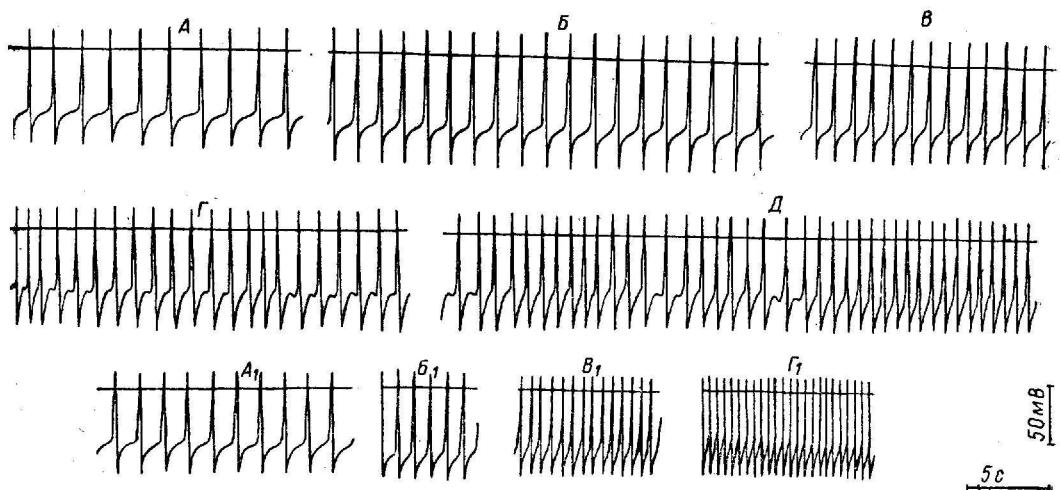


Рис. 1. Действие различных концентраций адреналина на активность пейсмекерных клеток атрио-вентрикулярных клапанов сердца кролика.

A, A₁ — исходные спонтанно возникающие ПД; *B, B₁* — ПД на 6-й и 11-й мин действия адреналина в концентрации $4.5 \cdot 10^{-7}$ М; *C, C₁* — ПД на 5-й и 10-й мин действия адреналина в концентрации $0.9 \cdot 10^{-6}$ М; *D, D₁* — ПД на 5-й, 9-й и 13-й мин действия адреналина в концентрации $2.3 \cdot 10^{-6}$ М.

вида динамики устраниния пейсмекерной активности. Для одного из них (7 опытов) было характерно некоторое замедление частоты возбуждений при отсутствии существенных изменений амплитуды ПД и уровней

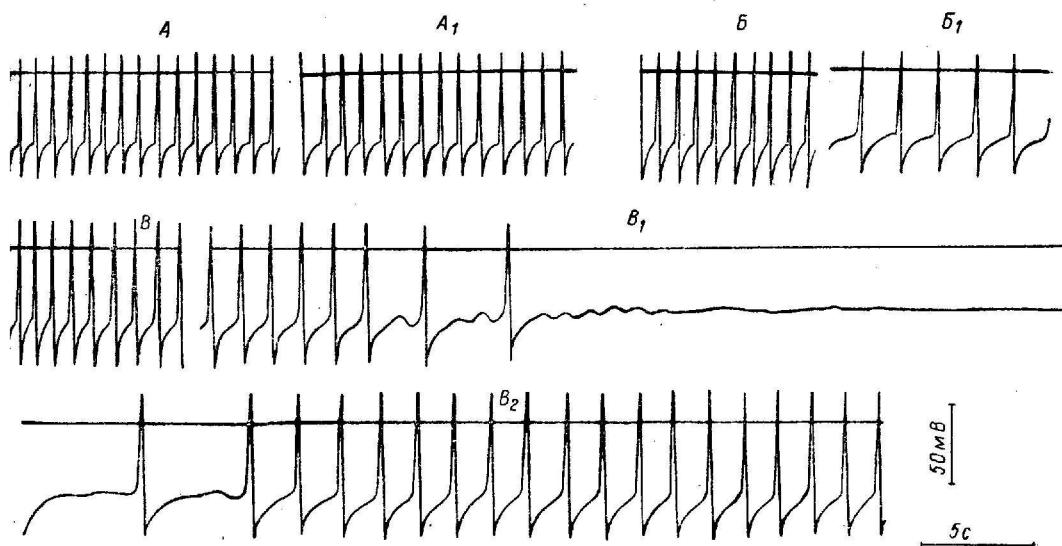


Рис. 2. Действие различных концентраций ацетилхолина на активность пейсмекерных клеток.

A, B, C — исходные спонтанно возникающие ПД; *A₁* — ПД на 12-й мин действия ацетилхолина в концентрации $5.5 \cdot 10^{-7}$ М; *B₁* — прекращение пейсмекерной активности на 7-й мин действия ацетилхолина в концентрации $2.7 \cdot 10^{-6}$ М; *B₂* — восстановление активности на 5-й мин действия атропина в концентрации $2.9 \cdot 10^{-7}$ М.

мембранных потенциалов; затем происходило выпадение отдельных ПД и прекращение их генерации на фоне затухающих осцилляций подпороговых потенциалов мембранны (рис. 2, *B₁*). При другом виде (8 опытов) устраниению автоматии предшествовало значительное урежение частоты

генерации ПД и градуальное уменьшение их амплитуды (рис. 3, Б, В, Г, Д). Под действием атропина в концентрации $2.9 \cdot 10^{-7}$ М автоматия восстанавливалась, причем наблюдалось два вида восстановления пейсмекерной активности: в первом случае на фоне осцилляторных колебаний

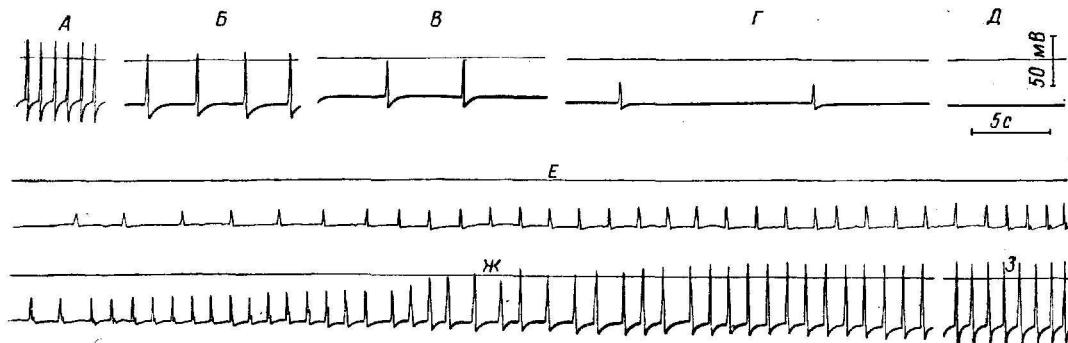


Рис. 3. Динамика подавления пейсмекерной активности при действии ацетилхолина в концентрации $2.7 \cdot 10^{-6}$ М.

А — исходные спонтанно возникающие ПД; Б, В, Г, Д — постепенное устранение пейсмекерной активности соответственно на 8-й, 10-й, 12-й и 13-й мин действия ацетилхолина в концентрации $2.7 \cdot 10^{-6}$ М; Е, Ж, З — восстановление активности соответственно на 6-й, 7-й и 12-й мин действия атропина в концентрации $2.9 \cdot 10^{-7}$ М.

мембранных потенциалов возникали ПД, амплитуда которых была близка к исходной (рис. 2, B_2); во втором случае наблюдалось градуальное увеличение амплитуды и частоты ПД до исходных параметров (рис. 3, Е, Ж, З).

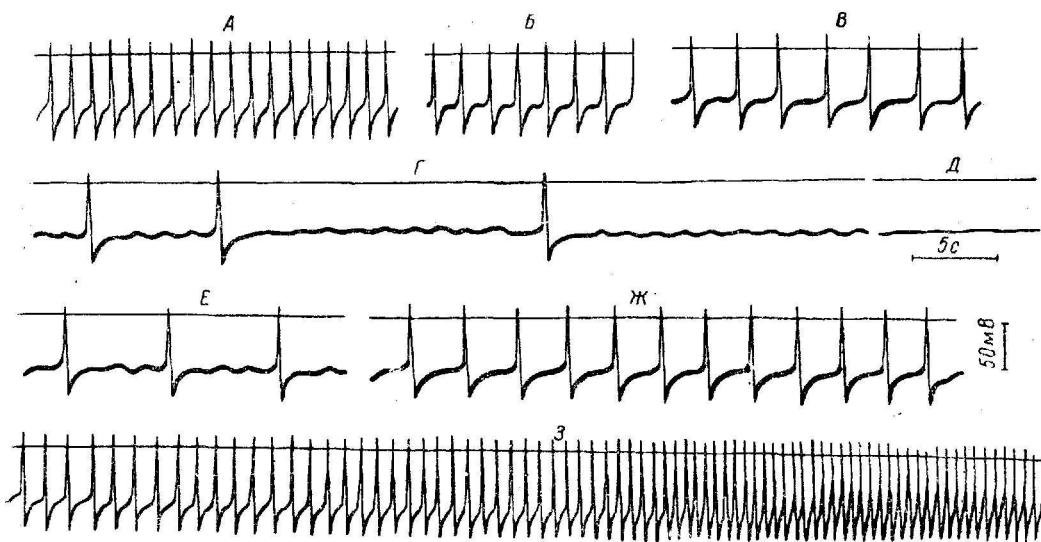


Рис. 4. Эффекты одновременного действия ацетилхолина и адреналина в концентрации $1.1 \cdot 10^{-6}$ М.

А — исходные ПД; Б, В, Г, Д — постепенное исчезновение ПД и подпороговых осцилляторных потенциалов на 10-й, 11-й, 12-й и 14-й мин одновременного действия медиаторов в концентрации $1.1 \cdot 10^{-6}$ М; Е, Ж, З — постепенное восстановление активности на 5-й, 7-й и 10-й мин действия атропина в концентрации $2.9 \cdot 10^{-7}$ М.

Одновременное действие одинаковых концентраций ацетилхолина и одного из симпатических медиаторов исследовано в 40 опытах. Во всех этих опытах наблюдалась преобладание отрицательного хронотропного эффекта ацетилхолина над положительными хронотропными эффектами

адреналина или норадреналина. При концентрации медиаторов $4.5 \cdot 10^{-7}$ — $6 \cdot 10^{-7}$ М отмечалась тенденция к урежению частоты возбуждений. Увеличение же концентрации обоих медиаторов до $1.1 \cdot 10^{-6}$ М приводило в большинстве опытов к значительному урежению частоты возбуждений в среднем на 35% по сравнению с исходной, а в некоторых опытах — к полному устранению автоматии. Так, на рис. 4 показаны эффекты одновременного действия ацетилхолина и адреналина в концентрации $1.1 \cdot 10^{-6}$ М. При действии этих медиаторов происходило постепенное понижение частоты возбуждений (рис. 4, Б, В), а затем спонтанная активность препаратов устраивалась в течение 14 мин. При этом сначала исчезали ПД, а затем и подпороговые потенциалы (рис. 4, Г, Д). Атропин восстанавливал автоматию и позволял проявиться эффекту адреналина (рис. 4, Е, Ж, З).

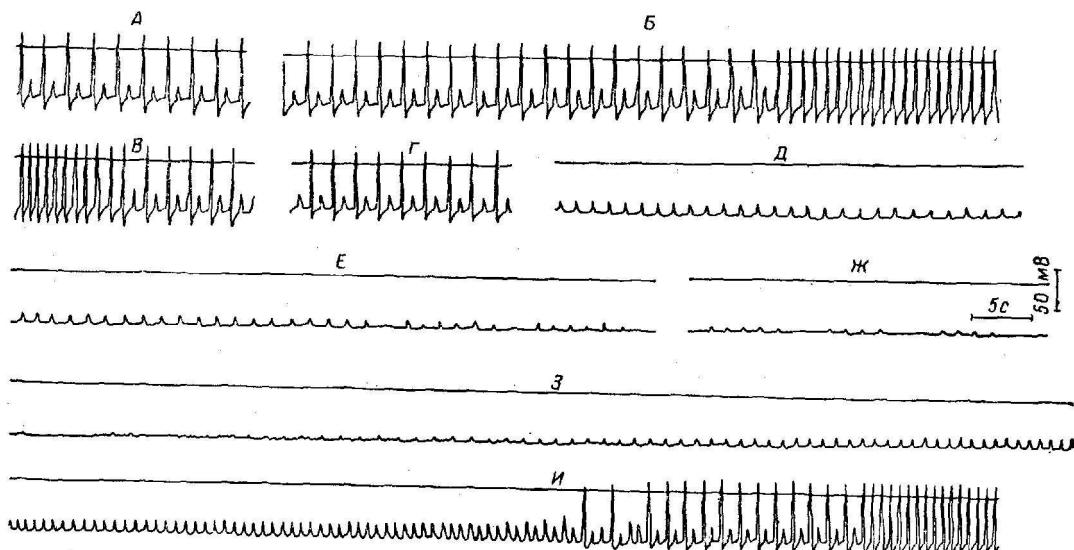


Рис. 5. Влияние норадреналина и ацетилхолина на генерацию подпороговых потенциалов и ПД пейсмекерных клеток.

А, Б — появление подпороговых потенциалов на 8-й мин и градуальное увеличение их амплитуды с переходом в дополнительные ПД на 10-й мин при действии норадреналина в концентрации $2.9 \cdot 10^{-6}$ М; В, Г, Д, Е, Ж — постепенное устранение пейсмекерной активности соответственно на 5-й, 8-й, 9-й, 10-й и 11-й мин действия раствора, содержащего норадреналин ($2.9 \cdot 10^{-6}$ М) и ацетилхолин ($2.7 \cdot 10^{-6}$ М); З, И — постепенное восстановление пейсмекерной активности на 3-й и 5-й мин действия атропина в концентрации $2.9 \cdot 10^{-7}$ М.

При одновременном действии ацетилхолина и норадреналина или адреналина в одинаковых концентрациях ($2.3 \cdot 10^{-6}$ М— $2.9 \cdot 10^{-6}$ М) автоматия устраивалась во всех случаях. Так, предварительное добавление в перфузионный раствор норадреналина в концентрации $2.9 \cdot 10^{-6}$ М приводило к возникновению подпороговых потенциалов (рис. 5, А). Амплитуда подпороговых потенциалов градуально увеличивалась, что привело к переходу их в дополнительные ПД (рис. 5, Б). При добавлении в тот же раствор ацетилхолина даже в несколько меньшей концентрации ($2.7 \cdot 10^{-6}$ М) наблюдалось урежение частоты возбуждений вследствие выпадения отдельных спайков ПД, на месте которых выявлялись уменьшающиеся по амплитуде подпороговые потенциалы (рис. 5, В, Г). В дальнейшем генерация ПД прекращалась, амплитуда подпороговых потенциалов продолжала постепенно уменьшаться вплоть до полного устранения биоэлектрической активности (рис. 5, Д, Е, Ж). Атропин восстанавливал автоматию путем градуального увеличения амплитуды подпороговых потенциалов и перехода их в регулярные ПД, частота которых определялась действием норадреналина (рис. 5, З, И).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные исследования показали, что увеличение частоты ПД под влиянием адреналина или норадреналина происходит не только вследствие увеличения крутизны нарастания МДД, но также за счет появления дополнительных подпороговых потенциалов и перехода их в регулярные ПД. Эти эффекты симпатических медиаторов можно объяснить известным их свойством увеличивать проницаемость мембран пейсмекерных клеток по медленному каналу. Так, установлено, что адреналин, действуя снаружи на мембранные пейсмекерные клетки синоатриального узла и волокон Пуркинье, а его вторичный мессенджер — цАМФ, действуя на мембранны изнутри, приводят к увеличению медленного входящего тока, что сопровождается увеличением частоты возбуждений [14, 19]. Известно также, что медленный входящий ток, переносимый ионами натрия и кальция, имеет свойство изменяться градуально в отличие от быстрого входящего тока [20]. Этим свойством медленного входящего тока можно объяснить постепенное увеличение амплитуды подпороговых потенциалов до появления спайков ПД под действием симпатических медиаторов.

Урежение частоты спонтанных возбуждений и подавление автоматики пейсмекерных клеток клапанов под влиянием ацетилхолина обусловлено, по-видимому, его ингибирующим влиянием на медленный натрий-кальциевый канал. Ранее нами было показано, что при действии ингибиторов этого канала наблюдается подавление автоматики либо вследствие постепенного уменьшения частоты и амплитуды ПД, либо путем прекращения генерации ПД на фоне затухающих подпороговых потенциалов [2]. Сходство динамики устранения автоматики при этих воздействиях и при действии ацетилхолина позволяет предположить, что парасимпатический медиатор подавляет медленный натрий-кальциевый канал и тем самым устраняет автоматию. Недавно в опытах с фиксацией напряжения на миокарде предсердий теплокровных и холоднокровных прямо показано подавление медленного входящего тока при действии ацетилхолина, происходящее наряду с увеличением калиевой проницаемости мембранны [9, 17].

При изучении эффектов одновременного действия парасимпатического и симпатических медиаторов в одинаковых концентрациях установлено, что отрицательный хронотропный эффект ацетилхолина не только преобладал над действием симпатических медиаторов, но и усиливается под их влиянием. Преобладание действия ацетилхолина над действием симпатических медиаторов не связано с изменением чувствительности β -адренорецепторов пейсмекерных клеток под влиянием ацетилхолина, так как при блокаде атропином М-холинорецепторов не только устраивались эффекты ацетилхолина, но и выявлялось действие симпатических медиаторов.

Эффекты взаимодействия парасимпатического и симпатических медиаторов, по-видимому, можно объяснить внутриклеточным взаимодействием их вторичных мессенджеров — цАМФ и цГМФ. Известно, что катехоламины активируют образование цАМФ в сердечной мышце [3, 6, 13], а ацетилхолин не только увеличивает содержание цГМФ, но и уменьшает содержание цАМФ в миокарде [5, 8, 13, 16].

Усиление действия ацетилхолина под влиянием симпатических медиаторов на мембранных пейсмекерных клеток может быть одной из причин усиления отрицательного хронотропного эффекта блуждающего нерва на фоне высокого тонуса симпатической нервной системы в условиях целого организма [11, 12].

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Б е с к р о в н о в а Н. Н., К о р о л е в В. В., К о ш а р с к а я И. Л., М а к а�ы ч е в В. А., У ль яни н ский Л. С. Структурно-функциональная организация пейсмекерных образований атрио-вентрикулярных клапанов сердца. В сб.: Ультраструктурные аспекты морфогенеза и регенерации в норме и патологии. Изд. I. ММИ, М., 1976, 77—83.

- [2] Макарычев В. А., Кошарская И. Л., Ульянинский Л. С. Автоматическая активность пейсмекерных клеток атрио-вентрикулярных клапанов сердца кролика. Бюлл. экспер. биол. и мед. 1976, 81, 517—520.
- [3] Перцева М. Н. Циклический аденоzinмонофосфат и ионы кальция в механизме действия катехоламинов. Усп. совр. биол. 1976, 82, 18—33.
- [4] Удельнов М. Г. Физиология сердца. Изд. МГУ, М., 1975.
- [5] Федоров Н. А. Циклический гуанизинмонофосфат (цГМФ): метаболизм и его биологическая роль. Усп. совр. биол., 1976, 82, 34—46.
- [6] Четверикова Е. Ф., Изаков В. Я., Мавский Е. И., Верещагина В. М. Адреналин и инотропия миокарда. Усп. физiol. наук, 1976, 7, 67—93.
- [7] Carriger G. O., Bishop V. S. The interaction of acetylcholine and norepinephrine on heart rate. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1972, 180, 31—37.
- [8] George W. J., Wilkerson R. D., Kadowitz P. J. Influence of acetylcholine on contractile force and cyclic nucleotide levels in the isolated perfused rat heart. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1973, 184, 228—235.
- [9] Giles W., Noble S. J. Changes in membrane currents in bullfrog atrium produced by acetylcholine. J. Physiol. (Brit.), 1976, 261, 103—123.
- [10] Grodner A. S., Lahritz H. G., Pool P. E., Braunwald E. Neurotransmitter control of sinoatrial pacemaker frequency in isolated rat atria and in intact rabbits. Circ. Res., 1970, 27, 867—873.
- [11] Higgins C. B., Vatner S. F., Braunwald E. Parasympathetic control of the heart. Pharmacol. Reviews, 1973, 25, 119—155.
- [12] Levi M. N. Sympathetic-parasympathetic interactions in the heart. Circ. Res., 1971, 29, 437—445.
- [13] Murad F., Chi Y. M., Rall T. W., Sutherland E. W. Adenyl cyclase. III. The effect of catecholamines and choline esters on the formation of adenosine 3,5-phosphate by preparations from cardiac muscle and liver. J. Biol. Chem., 1962, 237, 1233—1238.
- [14] Reuter H. Localization of beta adrenergic receptors, and effects of noradrenaline and cyclic nucleotides on action potentials, ionic currents and tension in mammalian cardiac muscle.
- [15] Rosen M., Wit A. L., Hoffman B. F. Electrophysiology and pharmacology of cardiac arrhythmias. VI. Cardiac effects of verapamil. Amer. Heart J., 1975, 89, p. 665—673.
- [16] Schwiegler M. Sympathetic-parasympathetic interaction on the ventricular myocardium: possible role of cyclic nucleotides. Basic Res. Cardiol., 1974, 69, 215—221.
- [17] Tenck R., Nawrath H., McDonald T. F., Trautwein W. On the mechanism of the negative inotropic effect of acetylcholine. Pflugers Arch., 1976, 361, 207—213.
- [18] Wit A. L., Fenoglio J. J., Wagner B. M., Bassett A. L. Electrophysiological properties of cardiac muscle in the anterior mitral valve leaflet and the adjacent atrium in the dog. Circ. Res., 1973, 32, 731—745.
- [19] Yamasaki Y., Toda N., Fujiwara M. Effects of intracellular applied cyclic 3,5-AMP and dibutyryl cyclic 3,5-AMP on electrical activity of isolated sinoatrial node. Jap. J. Pharmacol., 1973, 23, suppl, 40—41.
- [20] Zipes D. P., Besch H. R., Watanabe A. M. Role of the slow current in cardiac electrophysiology. Circulation, 1975, 51, 761—765.

Поступило 2 II 1977

EFFECTS OF PARASYMPATHETIC AND SYMPATHETIC MEDIATORS
ON THE AUTOMATIC ACTIVITY OF THE PACE-MAKER CELLS
OF THE HEART ATRIOVENTRICULAR VALVES

I. L. Kosharskaya, V. A. Makaritchev and L. S. Ulyaninsky

P. K. Anokhin's Institute of Normal Physiology, Acad. Med. Sci. USSR, Moscow

Effects of norepinephrine, epinephrine, and acetylcholine $4.5 \cdot 10^{-7}$ M— $2.9 \cdot 10^{-6}$ M on the automatic activity of the pace-maker cells of the rabbit atrioventricular valves were studied. The sympathetic mediators accelerated spontaneous beating by increasing the rate of slow diastolic depolarization or by the inducing additional subthreshold potentials converted in action potentials. Acetylcholine ($1.1 \cdot 10^{-6}$ M) reduced the rate of the spontaneous beating and in concentrations $2.7 \cdot 10^{-6}$ M eliminated automatic activity either by suppression of AP when subthreshold potentials gradually disappeared or by gradual decrement of AP rate and amplitude. Simultaneous application of equal doses of acetylcholine and sympathetic mediators revealed a predominant effect of acetylcholine as well as intensification of the acetylcholine effect under the influence of sympathetic mediators. Sympathetic-parasympathetic interactions can be explained by their influence on permeability of membrane of the pace-maker cells through the slow Na—Ca channel.