

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Потехина Виктория Маратовна

**АДРЕНЕРГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ МИОКАРДА ЛЕГОЧНЫХ ВЕН МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ЕЁ
ИЗМЕНЕНИЕ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

Специальность 03.03.01 - Физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научный руководитель:

Кузьмин Владислав Стефанович – кандидат биологических наук

Официальные оппоненты:

Азаров Ян Эрнестович – доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Комплексный научный центр Уральского отделения Российской академии наук», лаборатория физиологии сердца, главный научный сотрудник

Карпушев Алексей Валерьевич – кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт молекулярной биологии и генетики, старший научный сотрудник

Маслюков Петр Михайлович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Ярославский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой нормальной физиологии с биофизикой

Защита диссертации состоится 30 марта 2020 г. в 15:30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.06 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет МГУ, аудитория М-1.

E-mail: bellaum@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/278888419/>

Автореферат разослан 28 февраля 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета МГУ.03.06,
доктор биологических наук



Б.А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы и степень ее разработанности. Более ста лет назад было показано, что стенка легочных вен (ЛВ) большинства млекопитающих содержит кардиомиоциты, которые формируют здесь слои миокардиальной ткани, т.н. миокардиальную обкладку или миокардиальные «рукава» (Favaro, 1910; Marshall, 1850; Stieda, 1877). Миокардиальная ткань ЛВ электрически связана с предсердным миокардом, способна генерировать потенциалы действия и проводить волны возбуждения. Внимание исследователей миокардиальные «рукава» ЛВ стали привлекать только последние два десятилетия в связи с тем, что источники активности, приводящие к суправентрикулярным аритмиям, наиболее часто располагаются именно в данной ткани (Haïssaguerre et al., 1998; Schotten et al., 2011).

Кардиомиоциты обкладки легочных вен обладают рядом электрофизиологических свойств, делающих их отличными от клеток рабочего миокарда предсердий. Для кардиомиоцитов ЛВ характерен нестабильный потенциал покоя (ПП) (Doisne et al., 2009); фаза реполяризации потенциала действия (ПД) в данных кардиомиоцитах часто сопровождается осцилляциями. Наиболее важной особенностью кардиомиоцитов ЛВ является способность в определенных условиях спонтанно (автоматически) генерировать ПД. Таким образом, миокард ЛВ служит источником спонтанной или триггерной активности, приводящей к формированию очагов эктопической (внеузловой) автоматии, способствующих возникновению предсердных аритмий, в частности, фибрилляции предсердий (ФП) (Chard and Tabrizchi, 2009). ФП является одной из самых распространенных и клинически значимых аритмий, представляя собой существенную проблему медицины во всем мире; заболеваемость ФП в настоящее время растет, особенно в старшей возрастной группе населения (Филатов и Тарашвили, 2012). ФП приводит к нарушению гемодинамики, развитию сердечной недостаточности, способствует тромбообразованию в предсердиях. Электрофизиологические механизмы «проаритмических» явлений в ЛВ остаются до конца не изученными. Малоизучены также механизмы нервного контроля биоэлектрической активности ЛВ. Известно, что вегетативная иннервация сердца играет существенную роль в формировании предсердных аритмий. Симпатическая стимуляция существенно усиливает аритмогенные свойства миокардиальной обкладки ЛВ за счет влияния на ее биоэлектрические свойства (Ehrlich et al., 2003; Mauroil et al., 2007). Исследование механизмов симпатической или адренергической регуляции биоэлектрической активности легочных вен, которая, несомненно, в этой миокардиальной ткани имеет существенные особенности, является крайне актуальной задачей.

Подавляющая часть исследований, касающихся ФП, направлена на изучение проаритмической активности и ее нервной регуляции в зрелом миокарде и ткани ЛВ. Однако, биоэлектрические свойства и механизмы нервной регуляции работы сердца существенно

изменяются в ходе онтогенеза. (Hildreth et al., 2009; Lau et al., 1982). В настоящий момент остается неизученным, на каком этапе онтогенеза формируется проаритмический характер биоэлектрической активности ЛВ. Вегетативная иннервация вызывает преобразование свойств миокарда в ходе развития (Froncek et al., 1983). К данному времени не известно, играет ли формирование симпатической иннервации какую-либо роль в становлении аритмогенных электрофизиологических свойств ЛВ в онтогенезе. Исследование электрофизиологии легочных вен и ее адренергической регуляции в онтогенетическом аспекте имеет существенную актуальность, поскольку будет способствовать пониманию причин возникновения аритмий.

Итак, **целью данной работы** является изучение электрофизиологических свойств миокардиальной ткани легочных вен и эффектов ее адренергической стимуляции на разных этапах постнатального онтогенеза.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить изменения биоэлектрической активности миокардиальной ткани легочных вен крыс в ходе постнатального онтогенеза;
2. Выявить особенности эффектов адренергической стимуляции в миокардиальной ткани легочных вен на разных стадиях постнатального онтогенеза;
3. Исследовать механизмы электрофизиологических эффектов адренергической стимуляции в миокарде легочных вен;
4. Изучить действие пуриновых комедиаторов симпатической нейротрансмиссии (НАД⁺, АТФ, диаденозинтетрафосфата) на биоэлектрическую активность миокардиальной ткани легочных вен на разных этапах постнатального онтогенеза;
5. Охарактеризовать динамику формирования симпатической иннервации и адренергической рецепции в легочных венах крыс в ходе постнатального онтогенеза;
6. Определить роль симпатической иннервации, как фактора, влияющего на характер биоэлектрической активности в миокардиальной ткани легочных вен в ходе постнатального онтогенеза.

Научная новизна исследования. (1) В данной работе впервые получены данные о характере биоэлектрической активности миокардиальной ткани легочных вен крыс на ранних стадиях постнатального онтогенеза и преобразовании этой активности в ходе развития. Впервые показано, что биоэлектрическая активность в ЛВ существенно изменяется в первые две-три недели постнатальной жизни. (2) Впервые показано, что эффекты агонистов адренорецепторов в ЛВ изменяются в ходе постнатального онтогенеза таким образом, что эктопическая автоматия, вызванная катехоламинами, становится возможной только после 2-х недель постнатальной жизни. Эти результаты позволили впервые сделать предположение о постнатальном формировании проаритмических свойств электрической активности ЛВ. (3) В

работе впервые изучены внутриклеточные сигнальные каскады и электрофизиологические механизмы, опосредующие изменения мембранного потенциала, а также обуславливающие индукцию спонтанных потенциалов действия в миокарде легочных вен крыс при активации адренорецепторов α_1 - и β -типа. (4) Впервые получены данные об эффектах таких пуриновых комедиаторов симпатической нейротрансмиссии, как НАД⁺, АТФ, диаденозинтетрафосфата в миокардиальной ткани легочных вен крыс разных возрастных групп и их роли в модулировании адренергической эктопической автоматии легочных вен. (5) Впервые описано формирование симпатической иннервации в ходе первых трех недель постнатальной жизни, а также впервые получены данные об экспрессии и распределении адренорецепторов α_{1A} - и β_1 -подтипов в миокарде легочных вен крыс на разных этапах онтогенеза. (6) Впервые установлено, что неонатальная хроническая десимпатизация снижает способность норадреналина индуцировать эктопическую активность в легочных венах, начиная со второй недели постнатальной жизни. На основе полученных данных сделано предположение, что изменения характера биоэлектрической активности легочных вен в ходе постнатального онтогенеза связаны с формированием симпатической иннервации.

Теоретическая и практическая значимость. Данная работа имеет как фундаментальные, так и прикладные аспекты. Работа направлена на исследование биоэлектрической активности миокарда ЛВ и его адренергической регуляции в ходе постнатального онтогенеза. Результаты, полученные в ходе выполнения данной работы, с фундаментальной точки зрения способствуют развитию представлений об электрофизиологических особенностях миокардиальной ткани ЛВ млекопитающих как аритмогенного субстрата; развивают представления о рецепторных и внутриклеточных механизмах адренергической регуляции электрофизиологических свойств данной ткани; способствуют пониманию причин формирования проаритмического фенотипа электрофизиологических свойств в онтогенетическом аспекте. В работе затронуты теоретические аспекты современной физиологии, касающиеся трофической и трансформирующей роли симпатической иннервации в иннервируемой ткани, вопросы, касающиеся роли котрансмиттеров симпатической нейротрансмиссии в регуляции активности миокарда. Эти аспекты изучены в представленной работе в онтогенетическом плане.

Кратко формулируя, данная работа направлена на решение фундаментальной задачи – исследование вопроса о происхождении проаритмических свойств миокарда легочных вен. Данная работа вносит существенный теоретический вклад в понимание причин формирования предсердных аритмий. С практической точки зрения решение поставленных в работе задач способствует совершенствованию способов предотвращения аритмий и контроля проаритмической эктопической автоматии в миокарде легочных вен.

Методология и методы исследования. В представленной работе для изучения особенностей биоэлектрической активности в миокардиальной ткани ЛВ крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза проводили эксперименты с использованием многоклеточных изолированных венозно-легочных препаратов, включающих легочные вены, методом микроэлектродной внутриклеточной регистрации. Для оценки плотности катехоламин-содержащих волокон в ЛВ крыс, выявления количества и типа адренорецепторов в легочных венах на разных стадиях постнатального онтогенеза использовали гистохимические и иммунофлюоресцентные методы, в сочетании с конфокальной микроскопией. Для выяснения роли симпатической иннервации в формировании электрофизиологических свойств ЛВ использовали *in vivo* модель хронической неонатальной десимпатизации. Все эксперименты были проведены на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Электрофизиологические свойства миокардиальной ткани легочных вен крыс на ранних этапах онтогенеза отличаются от таковых у взрослых животных. В ходе онтогенеза в легочных венах изменяется длительность потенциалов действия, значения потенциала покоя, величина спонтанного сдвига мембранного потенциала;
2. Эффекты активации адренорецепторов в легочных венах различны на разных этапах постнатальной жизни. Селективные агонисты адренорецепторов приобретают способность влиять на мембранный потенциал миокарда ЛВ в ходе постнатального онтогенеза, начиная с третьей недели развития; норадреналин приобретает способность вызывать эктопическую активность только с 14 суток постнатальной жизни;
3. В основе гиперполяризации потенциала покоя в миокарде легочных вен при адренергических воздействиях лежит активация элементов сигнальных каскадов протеинкиназы А и повышение уровня цитоплазматического кальция;
4. Пуриновые комедиаторы симпатической нейротрансмиссии подавляют «проаритмические» эффекты норадреналина в миокарде легочных вен, заключающиеся в деполяризации потенциала покоя и индукции эктопической активности;
5. Симпатическая иннервация миокардиальной ткани легочных вен крыс формируется постнатально - в ходе первых двух недель постнатальной жизни; α_{1A} - и β_1 -адренорецепторы присутствуют в кардиомиоцитах ЛВ, начиная с самых ранних этапов постнатального онтогенеза, и их количество слабо меняется до 60-х суток постнатальной жизни;

6. Развитие симпатической иннервации способствует формированию «проаритмического» фенотипа миокардиальной ткани легочных вен крыс в ходе постнатального онтогенеза.

Степень достоверности данных. Представленные в работе данные получены с использованием современных общепринятых экспериментальных методик; результаты, представленные в работе, статистически значимы и воспроизводимы. Обзор литературы и обсуждение подготовлены с использованием актуальной тематической литературы.

Публикации. По материалам работы было опубликовано 16 работ: 7 статей и 4 тезисов докладов конференций в рецензируемых научных изданиях, в журналах, индексируемых аналитическими базами Scopus, Web of Science и RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.03.06 по специальности физиология 03.03.01, а также 5 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях. Публикации полностью соответствуют теме научно-квалификационного исследования и раскрывают её основные положения.

Апробация материалов диссертации. Результаты данной диссертационной работы были представлены на XXIII съезде Физиологического общества им. И. П. Павлова, (Воронеж, Россия 2017); на Joint Meeting of the Federation of European Physiological Societies and the Austrian Physiological Society (FEPS 2017), (Вена, Австрия), (FEPS 2015. Каунас, Литва), на Scandinavian Physiological Society Annual Meeting (SPS 2016, Осло, Норвегия); на VI Всероссийской с международным участием школе-конференции по физиологии кровообращения, МГУ имени М.В. Ломоносова, (Россия 2016) и других конференциях.

Диссертационная работа апробирована на заседании кафедры человека и животных Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова 21 октября 2019 года.

Личный вклад автора. Соискатель лично принимал участие во всех этапах работы: планировании экспериментов, технической подготовке экспериментов и отладке методик, проведении экспериментов, статистической обработке и обобщении результатов, написании статей и тезисов, представлении результатов работы на российских и международных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 176 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения полученных данных, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Список литературы включает 293 источника. Работа проиллюстрирована 57 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В экспериментах использовали крыс Wistar (самцы, самки, 200-250 г, 2 мес), полученных из питомника ФГБУ "НЦ Биомедицинских технологий" ФМБА. Самцов крыс использовали для получения тканевых препаратов легочных вен; самок для получения потомства. При работе с животными соблюдали все требования актуальных правил работы и использования лабораторных животных. Для изучения биоэлектрических особенностей миокарда легочных вен крыс в ходе постнатального онтогенеза в работе использовали венозно-предсердные препараты, полученные от крыс в конце первых суток постнатального развития (1Д), а также на 7-е, 14-е, 21-е сутки (7Д, 14Д, 21Д) постнатальной жизни. и взрослых животных (60Д).

В серии экспериментов, направленной на выявление роли симпатической иннервации в формировании аритмогенных свойств миокардиальной ткани ЛВ крыс, использовали животных с хронической неонатальной десимпатизацией. Для этого крысам проводили подкожные инъекции гуанетидина сульфата (Santa Cruz Biotechnology, США) в дозе 25 мг/кг со 2 по 14 день жизни и в дозе 50 мг/кг с 15 по 54–56 день жизни. Эффективность десимпатизации определяли по отсутствию специфической флюоресценции аддуктов глиоксиловой кислоты и катехоламинов в срезах легочных вен и предсердий.

(1) Регистрация биоэлектрической активности в тканевых препаратах легочных вен крысы. Биоэлектрическую активность регистрировали с помощью стандартной микроэлектродной техники. Для получения многоклеточных препаратов животных декапитировали, вскрывали грудную клетку, извлекали сердце вместе с легкими и помещали в емкость с перфузионным раствором Тироде стандартного состава комнатной температуры. Сердце промывали раствором, выделяли многоклеточные препараты, включающие левое предсердие и легочную вену левой доли легкого. Затем делали разрез вдоль продольной оси легочной вены. Препарат переносили в экспериментальную камеру, разворачивали и фиксировали эндокардиальной стороной вверх. Перфузию осуществляли раствором Тироде при 37С и скорости потока 10мл\мин.

В ЛВ крыс всех возрастных групп биоэлектрическую активность регистрировали на 1-2 мм дистальнее области первой бифуркации легочной вены, а в левом предсердии (ЛП) – в основании трабекуляризированной части (ушка) предсердия. Для регистрации электрически-вызванных потенциалов действия осуществляли ритмическую непрерывную (стационарную) стимуляцию изолированных препаратов прямоугольными импульсами длительностью 2 мс (ЭСЛ-2, Россия), следующими с интервалом 300 мс и амплитудой, равной двум пороговым значениям (1-3 В). В части серий экспериментов регистрировали ПД, возникающие самопроизвольно (автоматически) в контрольных условиях, либо в ответ на аппликацию

адреномиметиков и других соединений. Такие ПД, в отличие от электрически вызванных, называли спонтанными. Спонтанные потенциалы действия, либо колебания уровня потенциала покоя (ПП) регистрировали в «покоящемся» миокарде легочных вен, то есть без электрической стимуляции.

Для анализа характеристик биоэлектрической активности в препаратах ЛВ и ЛП, таких как уровень ПП, максимальная скорость нарастания переднего фронта ПД ($dV/dt_{\max}$), а также характеристик спонтанной активности в легочных венах (частота следования спонтанных ПД, длительность залпов спонтанной активности, количество ПД за один период спонтанной активности, длительность интервалов между периодами спонтанной активности) использовали программу «Power Graph 3.3.8» («ДИСофт», Россия). Для анализа ПД использовали программу MiniAnalysis (Synaptosoft, США), с помощью которой измеряли длительность ПД на уровне 50% и 90% реполяризации (ДПД50%, ДПД90%).

(2) Выявление катехоламин-содержащих волокон в стенке легочных вен и левого предсердия. Для выявления симпатических нервных волокон использовали метод гистохимического окрашивания при помощи глиоксиловой кислоты, основанный на взаимодействии катехоламинов и глиоксиловой кислоты с образованием флюоресцентных аддуктов (Axelsson et al., 1972; De la Torre, 1980). Многоклеточные препараты из области первой бифуркации легочной вены левой доли легкого помещали в препаровальную камеру, разрезали вдоль продольной оси и промывали раствором Тироде. Затем 30 мин инкубировали в фосфатно-солевом растворе (NaCl 0,09 М; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 0,01М) с добавлением глиоксиловой кислоты (2%), сахарозы (10%) при pH = 7,4. Расправленные на предметном стекле препараты сушили в течение 30 мин струей воздуха при 50°C, а затем в сушильном шкафу при 100°C в течение 5 мин, после чего заключали в вазелиновое масло. Окрашенные препараты ЛВ фотографировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия), используя воздушный объектив Plan-Apochromat 20x/0,8 M27. Флюоресценцию возбуждали фотодиодным лазером с длиной волны 405 нм; регистрировали флюоресценцию в диапазоне 420-440 нм. С помощью ПО Carl Zeiss ZEN 7.0 получали стековые изображения в конфокальном режиме. Анализ распределения катехоламин-позитивных волокон в стековых изображениях осуществляли в программе ImageJ (ImageJ 1.50i).

(3) Иммунофлюоресцентное выявление рецепторов норадреналина в миокардиальной ткани легочных вен. Для иммунофлюоресцентного выявления адренорецепторов использовали тканевые образцы легочных вен крыс возрастом 1-, 7-, 14 и 60 суток (взрослые животные). Для идентификации α_{1A} -адренорецепторов использовали первичные моноклональные кроличьи антитела к α_{1A} адренорецепторам (Thermo Fisher Scientific, PA1-047), вторичные - кроличьи Cy3-конъюгированные антитела (максимум

абсорбции 555 нм, максимум эмиссии – 570 нм). Для идентификации β_1 -адренорецепторов использовали первичные поликлональные кроличьи антитела к β_1 адренорецепторам (Thermo Tisher Scientific, PA1-049), вторичные - кроличьи Alexa Fluor -конъюгированные антитела (максимум абсорбции 488 нм, максимум эмиссии – 519 нм).

Тканевые образцы ЛВ фиксировали в 10%-ном формалине с нейтральным рН (рН=7.2) в течение 24 часов при комнатной температуре. Затем образцы были обезвожены с помощью стандартного протокола проводки материала и залиты в парафин. С помощью микротомы Leica RM2125RTS делали поперечные срезы легочных вен толщиной 4 мкм. Далее проводили стандартную процедуру окрашивания срезов. Окрашенные препараты ЛВ и левого предсердия фотографировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия) с объективом Plan-Apochromat 20x/0,8 M27. Фотографии получали для области, соответствующей первой бифуркации легочной вены левой доли легкого. Для возбуждения флюоресценции антител, конъюгированных с флюорофором AlexaFluor использовали диодный лазер с длиной волны 488 нм; для возбуждения флюоресценции антител, конъюгированных с флюорофором Cy3 использовали диодный лазер с длиной волны 555 нм. Анализ изображений, включающий идентификацию областей специфической флюоресценции, осуществляли в программе ImageJ (ImageJ 1.50i).

Протоколы экспериментов. Эффекты выявляли в электрически стимулируемых либо в покоящихся миокардиальных препаратах. В последнем случае, перфузию агонистами и/или блокаторами, ингибиторами осуществляли после прекращения электрической стимуляции и стабилизации ПП, которая занимала 5 мин. Многоклеточные препараты ЛВ перфузировали раствором, содержащим 10 мкМ агонистов адренорецепторов (норадреналин, фенилэфрин, изопротеренол) либо пуриновые котрансмиттеры АТФ, НАД⁺, диаденозинтетрафосфат (ДАТФ) в течение 10 минут. Эксперименты по изучению внутриклеточных каскадов адренорецепторов, выполняли с использованием ряда ингибиторов ферментов соответствующих каскадов.

Статистическая обработка результатов. Статистически значимые различия выявляли при помощи программы статистической обработки данных «GraphPad Prism 7». Использовали, в зависимости от необходимости, парный t-тест Стьюдента, точный тест Фишера, однофакторный либо двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений (ANOVA) и его аналог для непараметрических выборок (Критерий Краскела — Уоллиса) с последующим применением апостериорных тестов с использованием поправки на множественные сравнения (поправка Тьюки). Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Данные в группах представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. n – количество экспериментов в группе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Биоэлектрическая активность миокардиальной ткани легочных вен крыс на разных этапах постнатального онтогенеза

В миокардиальной ткани легочных вен новорожденных крыс (1Д), крыс в возрасте 7Д, 14Д, 21Д, 60Д, длительность электрически вызванных ПД на уровне 50% и 90% реполяризации составила: ДПД90% - 37 ± 11 (n=9), 20 ± 5 (n=6), 22 ± 4 (n=6), 27 ± 3 (n=5) и 55 ± 6 мс (n=5), соответственно; ДПД50% - 14 ± 4 (n=9), 8 ± 2 мс (n=6), 6 ± 2 мс (n=6), 8 ± 1 мс (n=5), 19 ± 2 мс (n=5), соответственно (Рис.1). Таким образом, за исключением 1-х сут постнатальной жизни, длительность ПД по мере постнатального развития в легочных венах увеличивается.

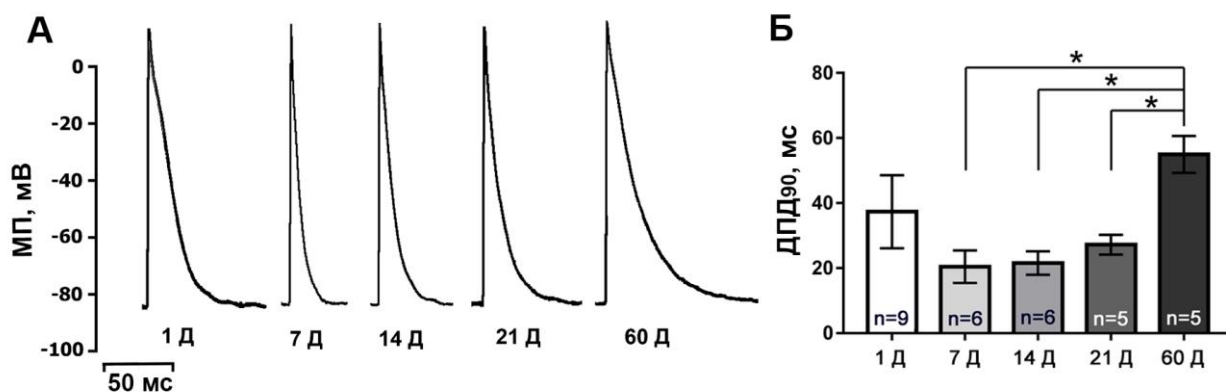


Рис. 1. А. Репрезентативные примеры ПД в миокарде легочных вен крыс разных возрастных групп. **Б.** Длительность ПД на уровне 90% реполяризации в миокардиальной ткани ЛВ у крыс разного возраста. 1Д - новорожденные, 7Д, 14Д, 21Д, 60Д – крысы возрастом 7, 14, 21 и 60 суток. * - $p < 0,05$ (ANOVA).

В условиях ритмической электрической стимуляции в ЛВ новорожденных крыс ПП составил -88 ± 4 мВ (n=5), а в отсутствие стимуляции -87 ± 4 мВ (n=5). В стимулируемых препаратах ЛВ крыс 7, 14, 21 и 60 суток ПП составлял -86 ± 6 (n=9), -87 ± 3 (n=6), -83 ± 10 (n=10), -83 ± 6 (n=10) мВ, соответственно. В покое миокарде ЛВ (без стимуляции) крыс, возрастом 7, 14, 21 и 60 суток ПП составлял -83 ± 6 (n=12), -81 ± 6 (n=6), -68 ± 6 (n=6) и -62 ± 5 (n=7) мВ, соответственно (Рис.2). Таким образом, в ходе постнатального развития в легочных венах ПП становится все менее негативным. Феномен спонтанного сдвига (деполяризации) ПП в покое миокарде ЛВ формируется начиная с 2-3 недели постнатальной жизни.

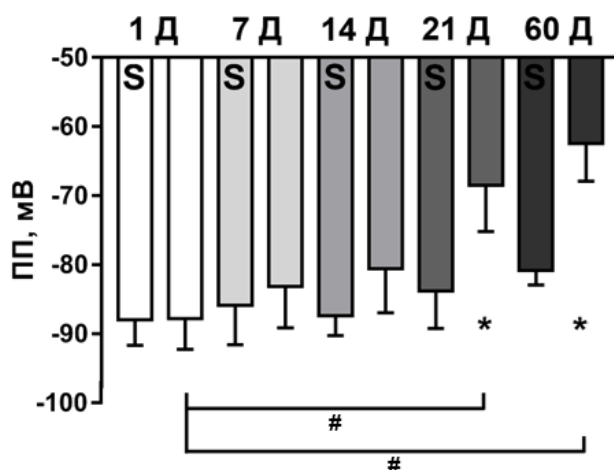


Рис. 2. Потенциал покоя в стимулируемых (S) и покоящихся (нестимулируемых) тканевых препаратах миокардиальной ткани легочных вен крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза. 1Д - новорожденные, 7Д, 14Д, 21Д, 60Д – крысы возрастом 7, 14, 21 и 60 суток. * - $p < 0,05$ (парный t-тест Стьюдента). # - $p < 0,05$ (ANOVA).

Влияние агонистов адренорецепторов на биоэлектрическую активность миокардиальной ткани легочных вен у крыс на разных этапах онтогенеза

Влияние норадреналина на биоэлектрическую активность в легочных венах на разных этапах постнатального онтогенеза. В контрольных условиях спонтанных ПД в миокардиальных препаратах ЛВ крыс возрастом 7-60 суток не наблюдали. Исключение составляли новорожденные животные, в 80% препаратов которых наблюдали автоматическую активность регулярного характера. В ЛВ новорожденных крыс норадреналин (10 мкМ) не вызвал значимого изменения характера свойственной им автоматии.

В ЛВ крыс возрастом 7 суток НА вызывал редкие спонтанные ПД, с частотой не более 0,9 Гц (Рис.3.А, верхняя панель) только в 20% случаев (2 препарата из 10). В миокарде ЛВ крыс возрастом 14 суток НА вызывал регулярную спонтанную активность в 33% (2 из 6) случаев: частота следования ПД составляла 6 и 3 Гц. В препаратах ЛВ крыс в возрасте 21 суток и взрослых крыс (60 суток) НА вызывал спонтанную активность уже в 100% случаев. Спонтанная активность в этих двух возрастных группах имела как залповый, так и регулярный характер (Рис.3.А). У взрослых крыс частота ПД при регулярной спонтанной активности составляла $3 \pm 0,5$ Гц ($n=17$). В случае залповой активности спонтанные ПД чередовались с периодами покоя, а максимальная частота ПД в залпе составляла $4 \pm 0,3$ Гц.

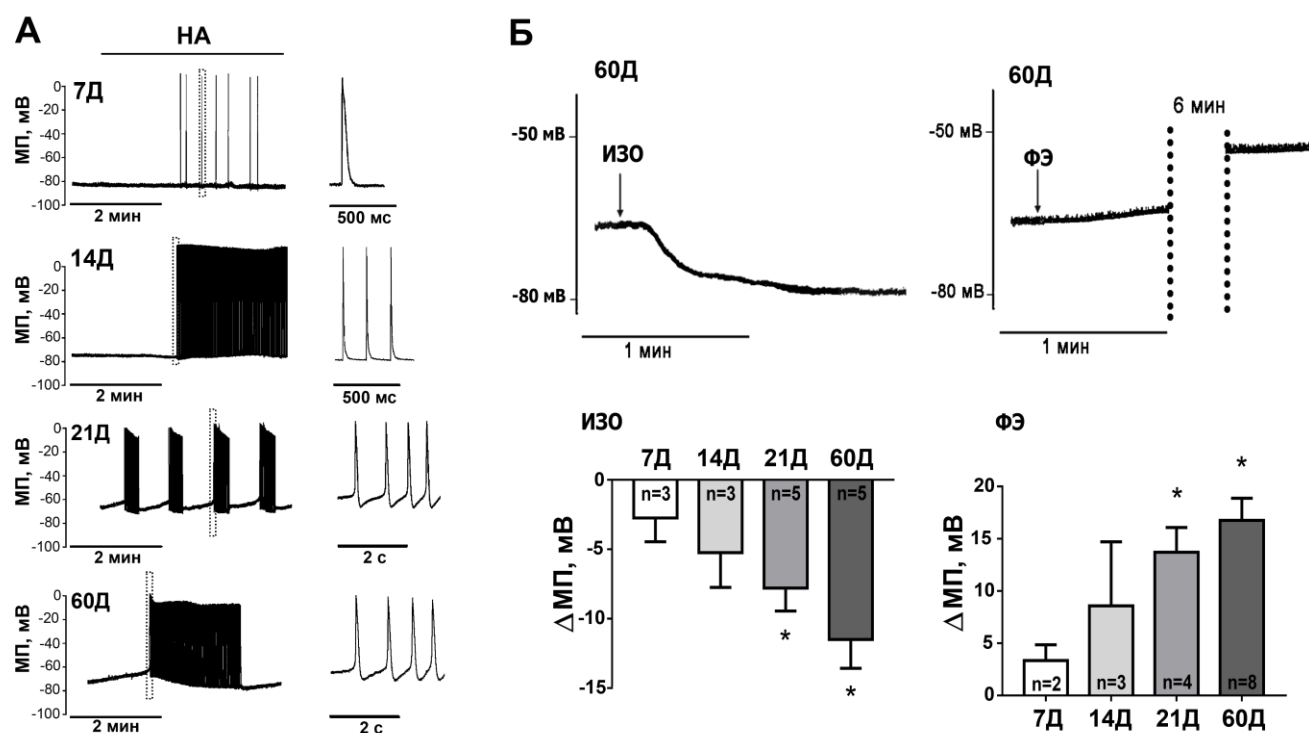


Рис. 3. А. Репрезентативные примеры спонтанной активности, возникающей при действии норадреналина (НА, 10 мкМ) в ЛВ крыс на разных этапах постнатального онтогенеза. Влияние агониста β -адренорецепторов изопроterenола (**Б**, ИЗО, 10 мкМ) и α_1 -адренорецепторов фенилэфрина (**В**, ФЭ, 10 мкМ) на потенциал покоя в миокарде ЛВ крыс на разных этапах постнатального онтогенеза. Сверху - репрезентативные примеры изменения ПП в ЛВ взрослых крыс; снизу - изменение мембранного потенциала покоя (Δ МП) в ЛВ крыс разных возрастов. 7Д, 14Д, 21Д, 60Д - крысы возрастом 7, 14, 21 и 60 суток. * - $p < 0,05$ (парный t-тест).

Влияние фенилэфрина и изопротеренола на биоэлектрическую активность в легочных венах на разных этапах постнатального онтогенеза. В миокарде ЛВ новорожденных крыс агонист β -адренорецепторов изопротеренол (ИЗО, 10 мкМ) и α_1 -адренорецепторов фенилэфрин (ФЭ, 10 мкМ) не оказывали заметного действия на ПП и спонтанную активность, характерную для первых суток жизни. У крыс возрастом 7 суток ИЗО вызывал гиперполяризацию ПП на 3 ± 2 мВ (эффект наблюдали в 60% случаев), в ЛВ крыс возрастом 14 суток - на 5 ± 3 мВ (в 80% случаев), а в ЛВ крыс возрастом 21 суток - уже на 8 ± 2 мВ ($n=5$, $p<0,05$) в 100% случаев. У взрослых крыс ИЗО вызывал гиперполяризацию на 11 ± 2 мВ ($n=5$, $p<0,05$) во всех препаратах (Рис.3.Б).

Фенилэфрин в миокарде ЛВ вызывал обратный ИЗО эффект – деполяризацию ПП, которая у крыс возрастом 7 суток составляла 3 ± 1 мВ (в 50% случаев); у крыс возрастом 14 суток деполяризация, вызванная ФЭ, составляла 9 ± 6 мВ (в 75% случаев), у крыс возрастом 21 суток - 14 ± 2 мВ ($p<0,05$, наблюдали во всех экспериментах); у взрослых крыс - 17 ± 2 мВ ($n=8$, $p<0,05$ наблюдали во всех экспериментах, Рис.3.В). Ни ИЗО, ни ФЭ не вызывали спонтанной активности ни в одном из препаратов ЛВ, полученных от крыс возрастом 7-60 суток.

Таким образом, влияние ИЗО и ФЭ на ПП, как и действие НА усиливалось с возрастом: наибольший эффект данных соединений наблюдался у взрослых крыс и у крыс 21-дневного возраста. Эксперименты с агонистами адренорецепторов позволяют предположить, что для инициации спонтанной активности норадреналином в ЛВ требуется одновременная стимуляция как α_1 -, так и β_1 -адренорецепторов, при этом роль α_1 -адренорецепторов может заключаться в смещении ПП до порогового уровня инициации спонтанных ПД.

Эксперименты, направленные на выяснение механизмов электрофизиологических эффектов активации адренорецепторов в миокарде легочных вен

Эксперименты, направленные на выяснение механизмов деполяризации, вызванной активацией α_1 -адренорецепторов в легочных венах крысы. Ингибиторы фосфолипаз С (U-73122, 0,5 мкМ, $n=6$) и D (FIP1, 0,1 мкМ, $n=5$), протеинкиназы С (хелеритрин, 1 мкМ, $n=5$) не оказывали значимого влияния на уровень ПП ($p>0,5$ во всех случаях), а также не подавляли деполяризацию, вызванную ФЭ в легочных венах взрослых крыс. Фенилэфрин, в контрольных условиях вызывал деполяризацию ПП на $20 \pm 2,3$ мВ; ФЭ на фоне U-73122 - на 18 ± 1 мВ ($n=6$, $p>0,5$), а на FIP1 - на 19 ± 2 мВ ($n=5$, $p>0,5$). В другой серии экспериментов, ФЭ в контрольных условиях вызывал деполяризацию ПП на 19 ± 3 мВ; деполяризация ПП, вызванная ФЭ на фоне хелеритрина, составляла 23 ± 2 мВ ($n=5$, $p>0,5$). Таким образом, деполяризация ПП в легочных венах крыс при активации α_1 -адренорецепторов не связана с классическим фосфатидил-инозитольным внутриклеточным сигнальным каскадом.

Эксперименты, направленные на выяснение механизмов, вызванной активацией β -адренорецепторов гиперполяризации в легочных венах крысы. Активатор аденилатциклазы (АЦ) форсколин вызывал гиперполяризацию ПП в легочных венах взрослых крыс на 11 ± 2 мВ (5 мкМ, $n=6$, $p<0,01$, Рис.4.А.). Неспецифический ингибитор фосфодиэстераз IBMX гиперполяризовал ПП на 6 ± 3 мВ ($n=6$, $p<0,05$, Рис.4.Б.). Функционально, действие форсколина имитирует активацию β -адренорецепторов, а IBMX - активацию АЦ, так как приводит к накоплению в цитоплазме цАМФ. Эксперименты с форсколином и IBMX указывают на то, что гиперполяризация ПП, вызванная в ЛВ активацией β -адренорецепторов, обусловлена накоплением цАМФ. Ингибиторы протеинкиназы А Н-89 (5 мкМ), KT5720 (0,1 мкМ) и Rp-adenosine-cAMP (5 мкМ) существенно подавляли гиперполяризацию, вызванную изопротеренолом. Наиболее сильный эффект наблюдали при действии KT5720, который вызывал снижение эффекта ИЗО на $67 \pm 4\%$ ($n=5$, $p<0,05$); Н-89 подавлял эффект ИЗО на $42 \pm 5\%$ ($n=6$), а Rp-adenosine-cAMP на $30 \pm 3\%$ ($n=6$, во всех случаях $p<0,05$, Рис.4.Б.). Таким образом, гиперполяризация ПП при активации β -адренорецепторов в легочных венах обусловлена, большей частью, сигнальным каскадом протеинкиназы А.

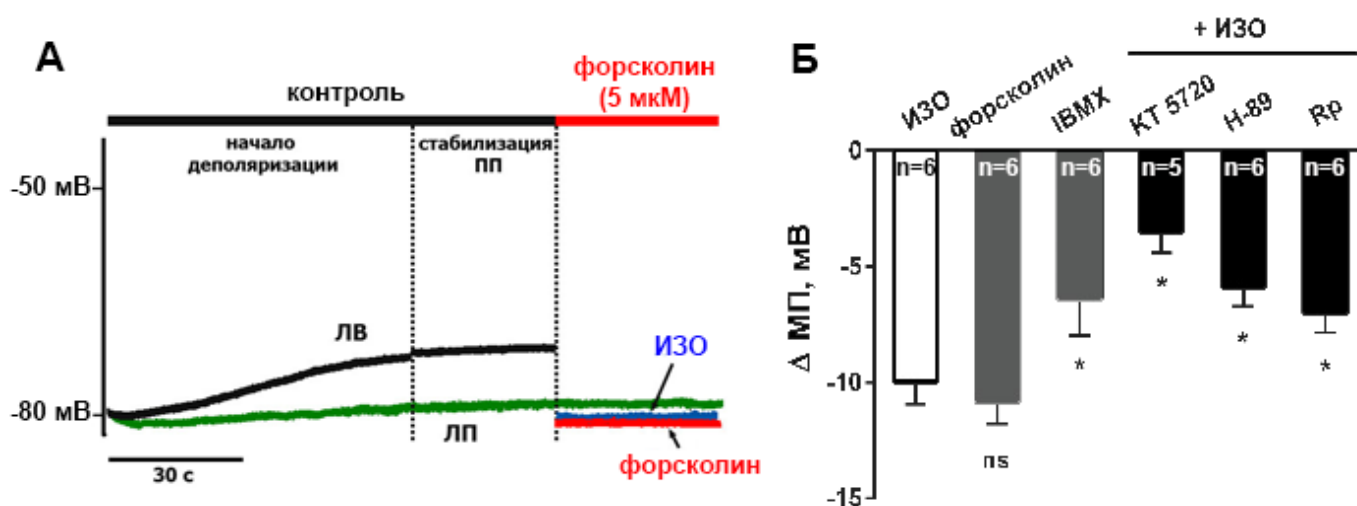


Рис. 4. А. Пример записи ПП в миокарде легочных вен (ЛВ, черный) и левого предсердия (ЛП, зеленый) в контроле, при действии форсколина, а также при действии изопротеренола (ИЗО) на фоне форсколина. **Б.** Гиперполяризация мембранного потенциала (Δ МП) в легочных венах, вызванная изопротеренолом, форсколином, IBMX или изопротеренолом на фоне ингибиторов протеинкиназы А (РКА). * - $p<0,05$ (парный t-тест), ns – нет статистически значимых различий (по сравнению со значением при действии изопротеренола).

Биоэлектрическая активность миокардиальной ткани легочных вен крыс при действии пуриновых комедиаторов симпатической трансмиссии на разных этапах постнатального онтогенеза

Действие НАД⁺, АТФ и ДАТФ на потенциал действия, потенциал покоя и спонтанную активность легочных вен на разных этапах онтогенеза. Такие пуриновые комедиаторы симпатической нейротрансмиссии, как НАД⁺, АТФ и диаденозинтетрафосфат (ДАТФ) в

миокарде легочных вен крыс на всех этапах постнатального развития действовали одинаково: снижали длительность электрически вызванных ПД как на уровне 50, так и 90% реполяризации (Рис.5, А, Б). Величина снижения ДПД90%, вызываемая НАД⁺ и АТФ, по мере взросления животных изменялась: наибольший эффект НАД⁺ наблюдали у новорожденных животных, а наименьший – у взрослых. При действии АТФ наибольший эффект наблюдали у взрослых животных. При действии ДАТФ ДПД90% в легочных венах новорожденных животных снижалась на $32 \pm 12\%$ (n=4); в миокарде ЛВ крыс возрастом 7, 14, 21 и 60 суток - $31 \pm 4\%$ (n=5), $31 \pm 2\%$ (n=5), $28 \pm 4\%$ (n=4) и $29 \pm 3\%$ (n=6), соответственно. При действии ДАТФ снижение ДПД было статистически значимо во всех возрастных группах ($p < 0,05$), однако, не различалось между ними (Рис.5, В, Г).

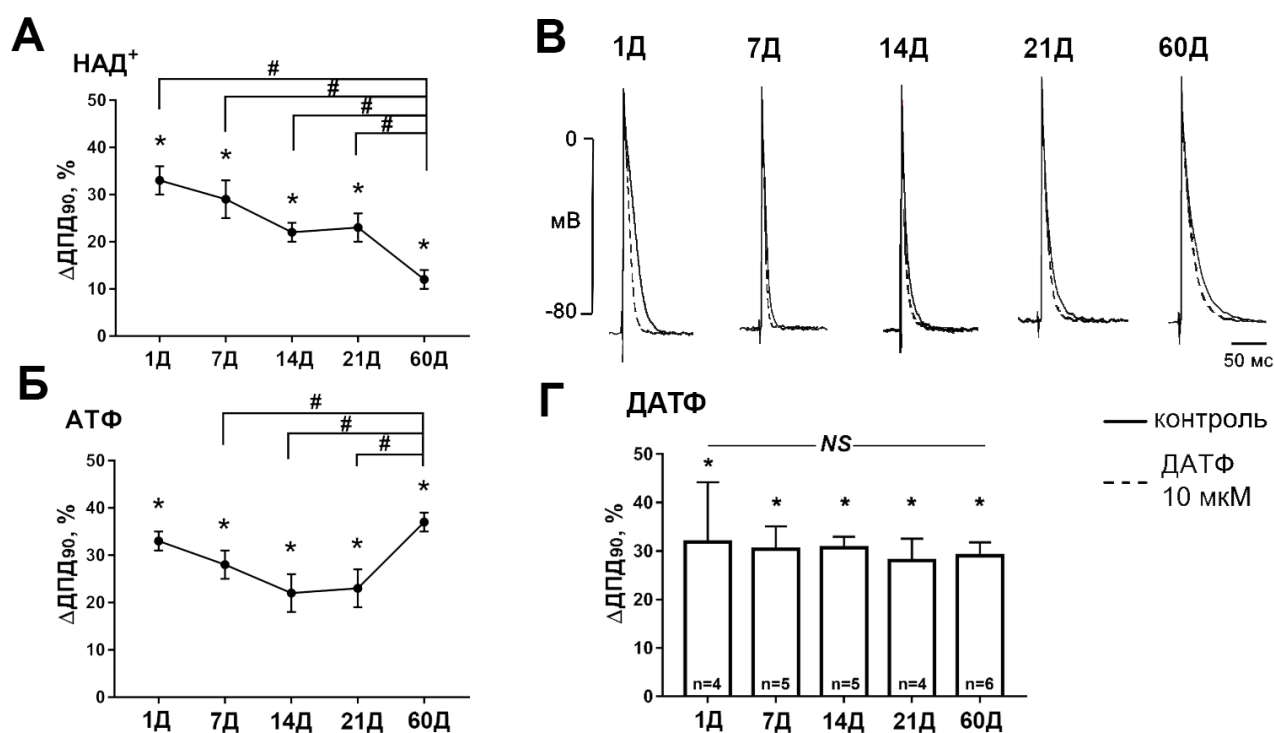


Рис. 5. Снижение длительности ПД на уровне 90% реполяризации при действии 10 мкМ НАД⁺ (А) или АТФ (Б) в миокардиальной ткани ЛВ крыс на разных этапах постнатального онтогенеза. В. Репрезентативные примеры ПД в контрольных условиях (сплошная линия) и при действии ДАТФ (пунктирная линия). Г. Изменение длительности ПД на уровне 90% реполяризации при действии ДАТФ в препаратах ЛВ крысы на разных этапах постнатального онтогенеза. * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольными значениями, # - $p < 0,05$, сравнение между возрастными группами (one-way ANOVA), NS – статистически незначимо. Д1, Д7, Д14, Д21, Д60 – крысы, возрастом 1, 7, 14, 21 и 60 суток.

У новорожденных крыс ни НАД⁺, ни АТФ не вызывали изменений ПП в покое миокарде легочных вен. В миокарде ЛВ крыс возрастом 7, 14, 21 и 60 суток при действии НАД⁺ наблюдали гиперполяризацию ПП на 3 ± 2 (n=5), 5 ± 2 (n=4), 10 ± 2 (n=5, $p < 0,05$) и 9 ± 3 мВ (n=6, $p < 0,05$), соответственно. При действии АТФ также наблюдали гиперполяризацию ПП, которая составила в ЛВ крыс возрастом 7, 14, 21 и 60 суток 3 ± 1 (n=5), 4 ± 3 мВ (n=4), 9 ± 2 (n=5,

$p < 0,05$) и 10 ± 2 мВ ($n=6$, $p < 0,05$), соответственно. При действии ДАТФ в миокарде ЛВ 14-, 21- и 60-дневных крыс также наблюдали статистически значимую гиперполяризацию ПП, которая составила 6 ± 2 , 9 ± 1 , $9 \pm 1,5$ мВ, соответственно (Рис.6, А, Б). Таким образом, все три пуриновых соединения приводили к гиперполяризации ПП в легочных венах начиная со 2-3-ей недели постнатальной жизни.

Внеклеточный НАД⁺ ($n=6$), АТФ ($n=6$), а также ДАТФ ($n=8$, Рис.6, В) никакого заметного действия на частоту спонтанной автоматической активности в легочных венах новорожденных крыс не оказывали ($2,9 \pm 1$, $3 \pm 0,6$ и $3,3 \pm 1$ Гц при действии НАД⁺, АТФ и ДАТФ, соответственно, $p > 0,5$).

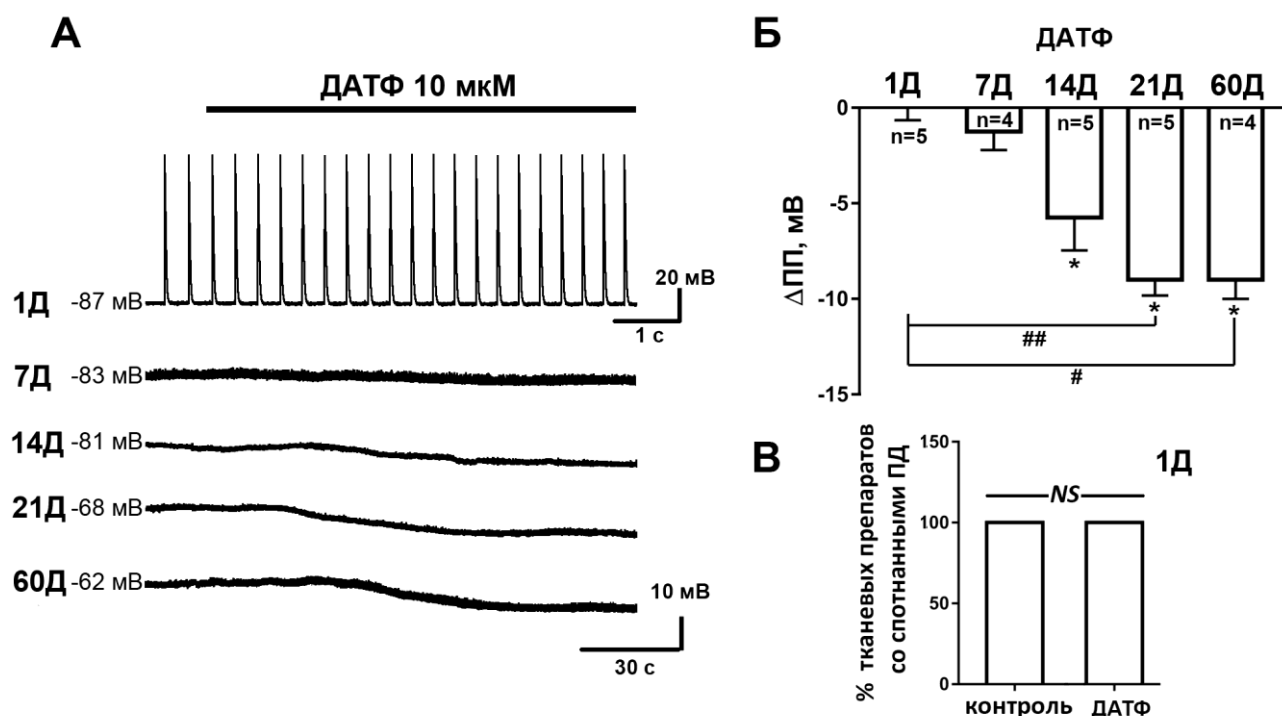


Рис. 6. А. Оригинальные записи ПП при действии ДАТФ (10 мкМ) в миокарде легочных вен крыс разных возрастных групп. Б. Увеличение гиперполяризующего действия ДАТФ в ЛВ крыс в ходе постнатального развития. В. ДАТФ не влияет на спонтанную активность в ЛВ новорожденных крыс. * - $p < 0,05$ (относительно контроля); # – $p < 0,05$, (относительно ПП, наблюдаемого в конце 1-х сут развития, ANOVA); NS – статистически незначимо. Д1, Д7, Д14, Д21, Д60 – крысы, возрастом 1, 7, 14, 21 и 60 суток.

Влияние НАД⁺, АТФ и ДАТФ на электрофизиологические эффекты норадреналина в миокарде легочных вен крыс на разных этапах постнатального развития. Как НАД⁺, так и АТФ на фоне норадреналина не приводили к значимым изменениям автоматии в легочных венах у новорожденных крыс (4 ± 1 Гц в контроле в данной серии ($n=7$); $4,5 \pm 2$ ($n=5$) и 4 ± 1 Гц ($n=5$) при действии НАД⁺ и АТФ, соответственно, $p > 0,1$). Так как в легочных венах крыс 7-дневного возраста НА не вызывал спонтанную активность, то эффекты НАД⁺ и АТФ на ее параметры оценить было невозможно. В ЛВ крыс возрастом 14 суток НАД⁺ и АТФ на фоне НА вызывали либо урежение спонтанных ПД (НАД⁺ на 80%, АТФ на 60%), либо полное

прекращение спонтанной активности. У 21-дневных крыс НАД+ и АТФ действовали сходно: подавляли автоматию, вызванную НА. В отличие от экспериментов с препаратами от 21-дневных животных, у взрослых крыс НАД+ и АТФ никогда не приводили к полному прекращению спонтанной активности, вызванной НА (Рис.7), однако, существенно изменяли ее параметры, уменьшая частоту спонтанных ПД, либо длительность залпов ПД.

Диаденозинтетрафосфат на фоне НА не вызывал сколь либо заметное изменение частоты автоматической активности в препаратах ЛВ новорожденных крыс ($3,9 \pm 1$ Гц ($n=6$) в контроле и $4,2 \pm 1$ Гц ($n=5$) при действии ДАТФ, соответственно, $p > 0,1$). Во всех экспериментах в препаратах ЛВ, полученных от животных на 21-е ($n=8$) и 60-е ($n=8$) сутки постнатального развития, ДАТФ вызывал быстрое подавление активности, индуцированной норадреналином. Этот эффект был статистически значимым: прекращение спонтанной активности происходило в 100% препаратов, полученных от крыс указанных возрастных групп (Рис.8). Во всех случаях, спустя 0,5-1 мин после начала действия ДАТФ происходила гиперполяризация ПП на $7 \pm 1,5$ мВ, в то время как очередного залпа спонтанных ПД не возникало.

Таким образом, пуриновые комедиаторы в легочных венах, начиная с 3-ей недели постнатальной жизни, подавляют норадреналиновую спонтанную активность. Влияние ДАТФ на автоматию легочных вен, вызванную НА, оказалось гораздо более выраженным, чем действие других пуриновых соединений – АТФ и НАД+.

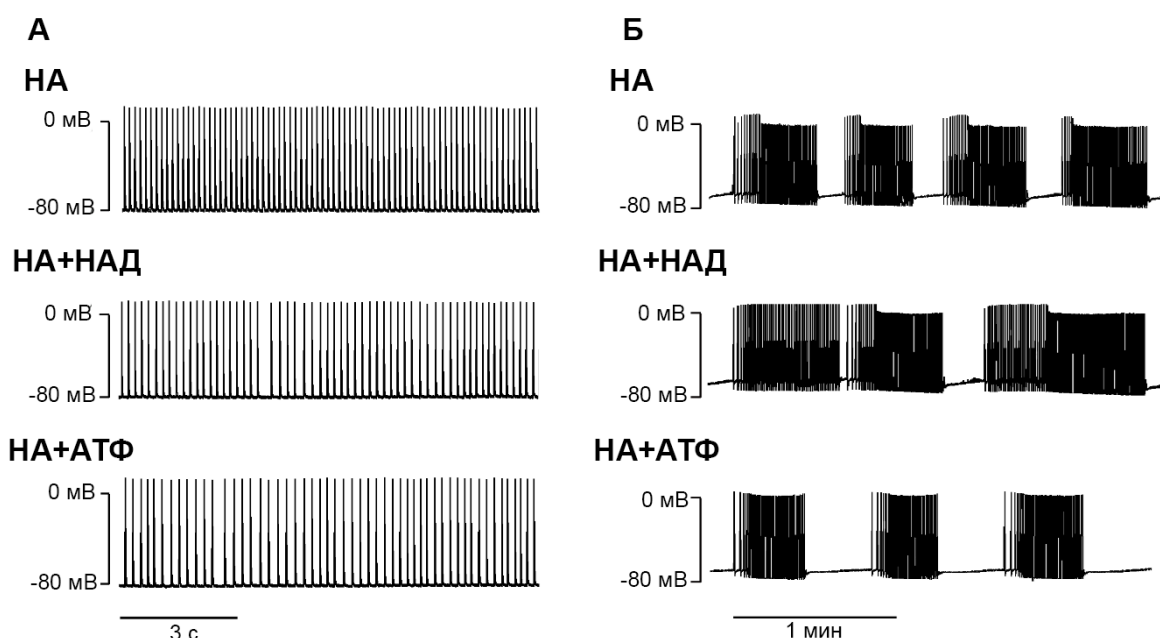


Рис. 7. Репрезентативные примеры спонтанной активности (спонтанных ПД), возникающей в миокарде легочных вен взрослых крыс при действии 10 мкМ норадреналина (НА, сверху), а также при действии 10 мкМ НАД+ или АТФ на фоне НА. **А** – регулярный тип спонтанной активности, **Б** – залповый тип спонтанной активности, вызываемая НА. Как НАД+, так АТФ вызывают либо снижение частоты спонтанных ПД, либо уменьшение длительности залпов спонтанных ПД.

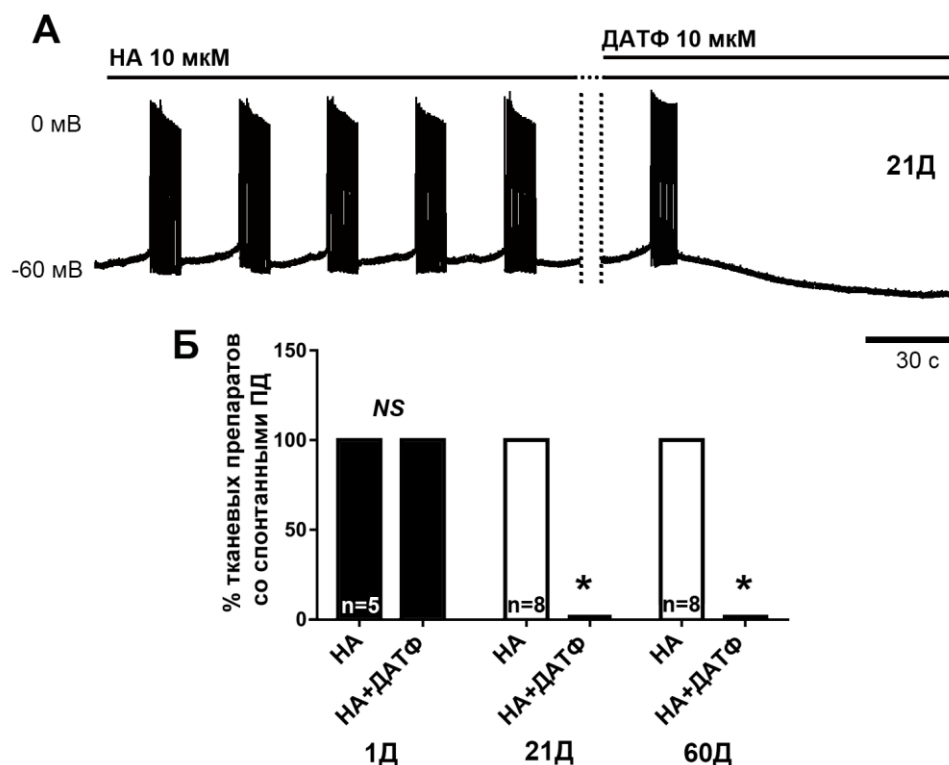


Рис. 8. Влияние диаденозинтетрафосфата на спонтанную активность, вызванную норадреналином (НА) в многоклеточных препаратах легочных вен, полученных от крыс на разных этапах постнатальной жизни. **А.** Репрезентативная запись спонтанной активности (периодические спонтанные залпы ПД), возникающей при действии НА в миокардиальной ткани ЛВ крысы возрастом 21 сут, а также ее подавление ДАТФ. **Б.** Подавление ДАТФ спонтанной активности, вызванной НА в препаратах ЛВ крыс на разных стадиях постнатального развития. Черным цветом отмечены препараты, полученные в конце первых сут развития, где спонтанная активность наблюдалась в контрольных условиях. В таких препаратах ни НА, ни ДАТФ не вызывали изменений спонтанной активности. * - $p < 0,05$; NS – незначимо.

Особенности симпатической иннервации и адренергической рецепции миокардиальной ткани легочных вен на разных этапах постнатального онтогенеза

Формирование симпатической иннервации миокарда легочных вен у крыс в ходе постнатального развития. Специфическую флюоресценцию аддуктов глиоксиловой кислоты и катехоламинов в препаратах легочных вен, выявляемую в виде цепочек флюоресцентных пятен или ветвящихся волокон, считали признаками присутствия симпатических постганглионарных норадреналинсодержащих нервных окончаний. В легочных венах новорожденных крыс во всех препаратах ($n=6$) признаков симпатических волокон обнаружено не было. В части препаратов ЛВ крыс возрастом 7 суток обнаруживаются единичные волокна. В образцах ЛВ крыс возрастом 14 суток катехоламин-содержащие (симпатические) волокна были обнаружены в 100% случаев, но общая площадь специфической флюоресценции и общая длина катехоламин-позитивных волокон была статистически значимо меньше, чем у взрослых животных (Рис.9, А и Б). Симпатические волокна, имеющие высокую степень ветвления, были обнаружены в 100% образцов легочных вен, полученных от крыс возрастом 21 суток и взрослых крыс. Общая

площадь специфической флюоресценции и общая длина катехоламин-позитивных волокон в этих группах были одинаковы (Рис.9).

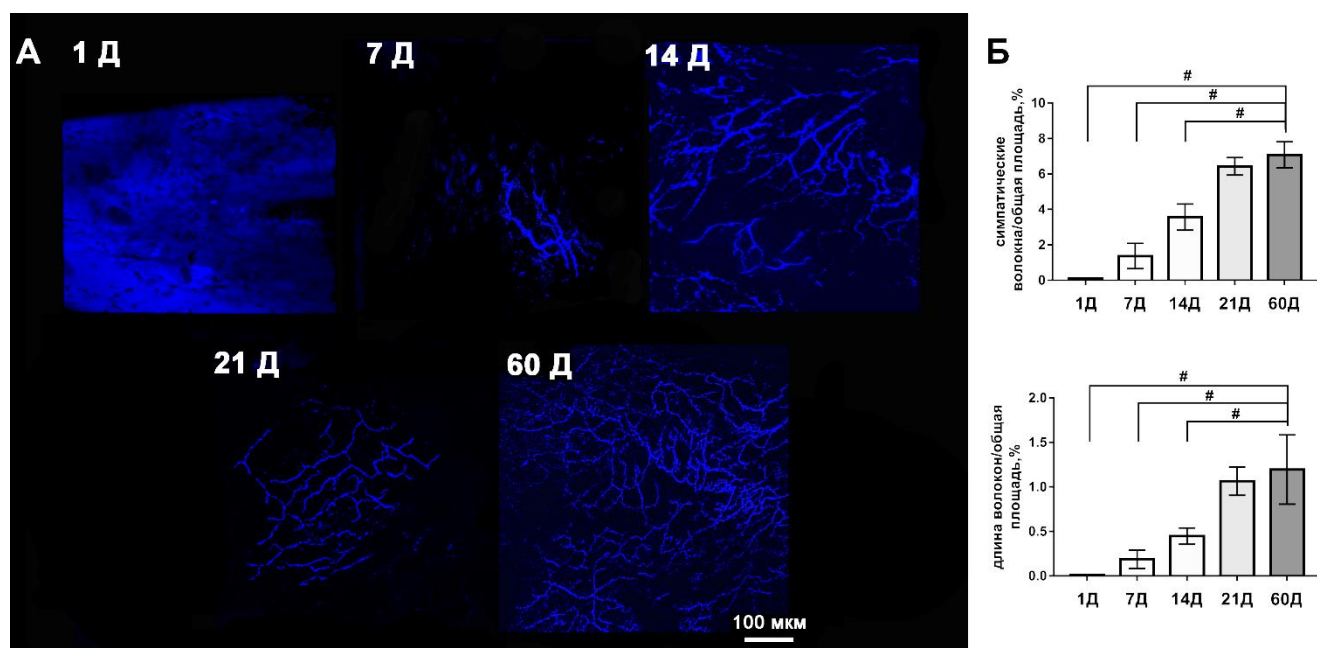


Рис. 9. А. Конфокальные изображения, отражающие распределение катехоламин-содержащих (симпатических) волокон в препаратах легочных вен крыс разных возрастов. **Б.** Показатели, характеризующие плотность катехоламин-содержащих волокон в легочных венах крыс возраста 1-60 суток (1Д-60Д). сверху - общая площадь катехоламин-положительной флуоресценции (общая площадь симпатических волокон). снизу - общая протяженность катехоламин-содержащих нервных волокон в. # - $p < 0,05$ (one-way ANOVA). 1Д - новорожденные, 7Д, 14Д, 60Д – крысы, возрастом, 7, 14 и 60 суток.

Таким образом, симпатическая иннервация легочных вен у крыс начинает формироваться в период с 7-го по 14 день постнатальной жизни. Структурно, сеть симпатических волокон становится неотличимой от таковой у взрослых животных к 21 дню постнатального развития. Таким образом, период формирования симпатической иннервации в легочных венах у крыс совпадает с таковым в предсердном и желудочковом миокарде. Также, период формирования симпатической иннервации совпадает с этапом постнатального онтогенеза, в ходе которого в ЛВ изменяются электрофизиологические характеристики и ЛВ приобретают способность генерировать спонтанные ПД при действии норадреналина.

Экспрессия α_{1A} - и β_1 -адренорецепторов в миокардиальной ткани легочных вен крысы в ходе постнатального онтогенеза. Специфическая флюоресценция, указывающая на наличие α_{1A} -адренорецепторов, обнаруживается в миокардиальном слое всех препаратов ЛВ, полученных как от новорожденных крыс ($n=5$), так и от крыс возрастом 7 ($n=5$), 14 ($n=5$), 60 ($n=5$) суток (Рис.10, А). Количество α_{1A} -адренорецепторов, исходя из данных иммунофлюоресцентного анализа, в легочных венах крыс 1-х суток лишь незначительно меньше, чем крыс 14-х, 21-х суток и взрослых животных (Рис.10, Б). α_{1A} -адренорецепторы в ЛВ

всех возрастов демонстрируют кластерное распределение, однако, у взрослых крыс количество крупных кластеров α_{1A} -адренорецепторов значительно больше, чем на более ранних этапах постнатального онтогенеза (Рис. 10, В).

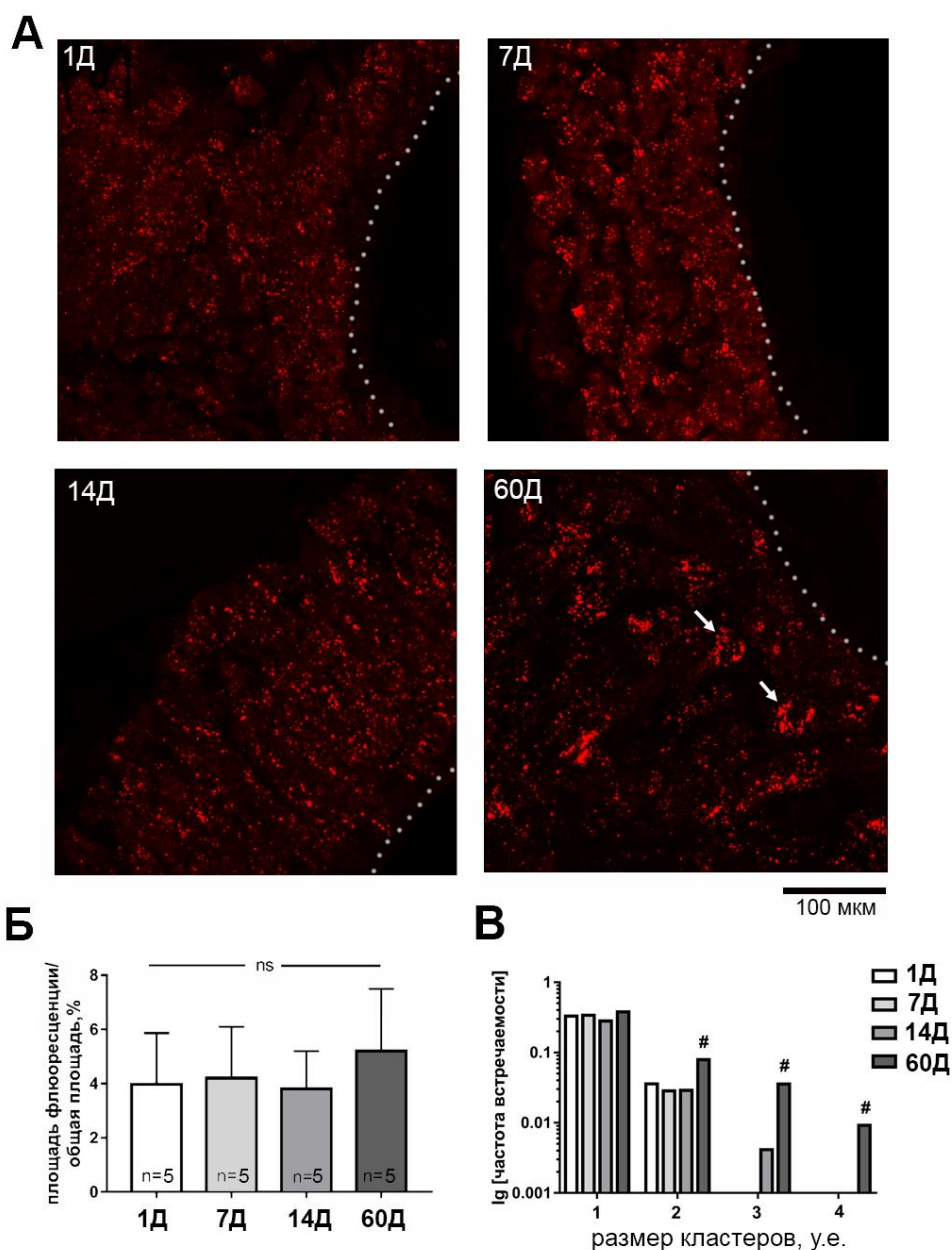


Рис.10.А. Фотографии, отражающие распределение α_{1A} -адренорецепторов в миокардиальной ткани легочных вен крыс на разных этапах онтогенеза. Пунктир - эндокардиальная поверхность, стрелками обозначена ядерная локализация адренорецепторов. **Б.** Общая площадь флуоресценции в ЛВ крыс разного возраста, пропорциональная количеству α_{1A} -адренорецепторов. **В.** Изменение размера кластеров α_{1A} -адренорецепторов в миокарде ЛВ крысы в ходе постнатального онтогенеза. 1Д - новорожденные, 7Д, 14Д, 60Д - крысы, возрастом, 7, 14 и 60 суток. # - $p < 0,05$ (ANOVA)

Специфическая флуоресценция, соответствующая β_1 -адренорецепторам была также обнаружена во всех образцах легочных вен, полученных как от новорожденных животных ($n=5$), так и от крыс возрастом 7 ($n=5$), 14 ($n=5$), 60 ($n=5$) суток (Рис.11, А). Общая площадь флуоресцентных пятен, соответствующих рецепторам, в образцах, полученных от крыс разных возрастов меняется незначительно (Рис.11, Б). Также, нами не было обнаружено существенных изменений характера распределения β_1 -адренорецепторов в ЛВ в ходе постнатального онтогенеза. Таким образом, экспрессия адренорецепторов α_{1A} - и β_1 -типа в ходе постнатального онтогенеза у

крыс слабо коррелирует с изменением электрофизиологических свойств и формированием симпатической иннервации в легочных венах.

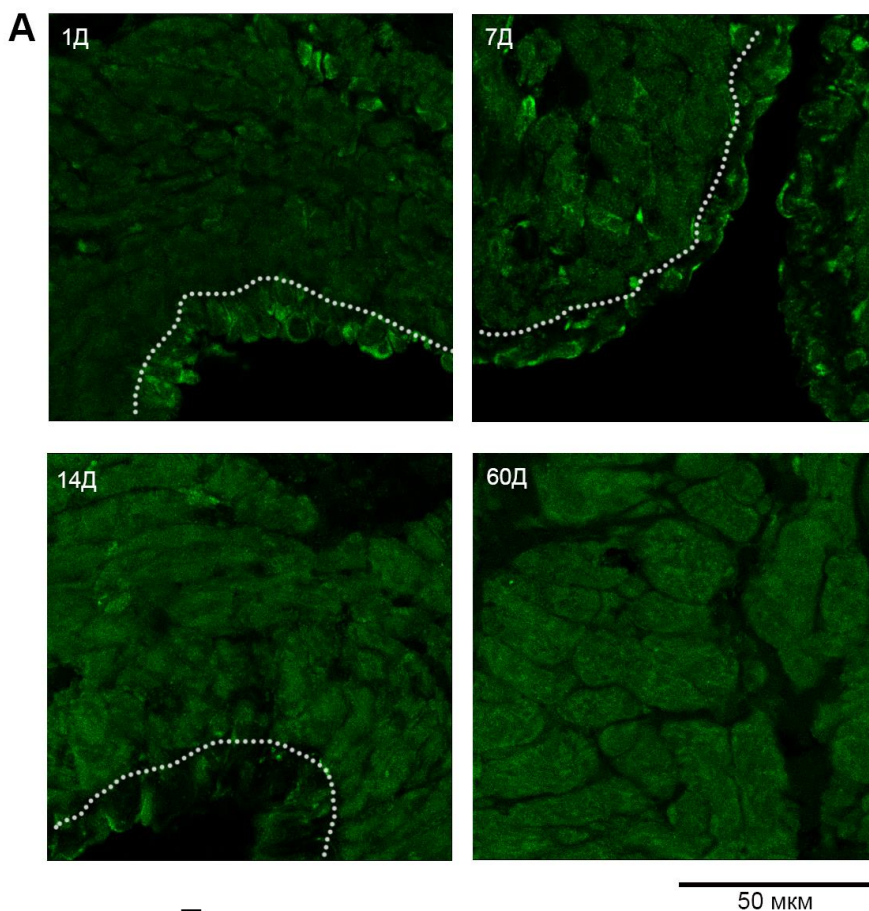
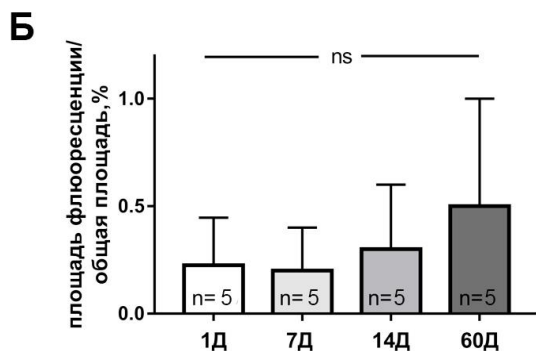


Рис. 11. А. Конфокальные фотографии, отражающие распределение β_1 -адренорецепторов в миокардиальной ткани легочных вен крыс на разных этапах постнатального онтогенеза. Пунктиром обозначена эндокардиальная сторона. Б. Общая площадь флуоресценции в препаратах легочных вен от крыс разного возраста, пропорциональная количеству β_1 -адренорецепторов. 1Д - новорожденные, 7Д, 14Д, 60Д – крысы, возрастом, 7, 14 и 60 суток. NS – статистически незначимо (one-way ANOVA).



Электрофизиологические свойства миокарда легочных вен у десимпатизированных животных

В миокарде легочных вен десимпатизированных крыс возрастом 7, 14, 21 и 60 суток длительность электрически вызванных ПД (ДПД90%) составила 25 ± 5 , 23 ± 2 , 29 ± 3 и 42 ± 10 мс, соответственно (Рис.12, А, $n=4$ для каждой из групп), что статистически не отличалось от длительности ПД у контрольных животных.

У крыс возрастом 7, 14, 21 и 60 суток в миокарде ЛВ в условиях ритмической стимуляции ПП составлял -86 ± 5 ($n=5$), -79 ± 5 ($n=6$), -80 ± 5 ($n=5$) и -81 ± 3 мВ ($n=5$), соответственно. В

покоящемся миокарде ЛВ значения ПП для тех же возрастных групп были следующими: -85 ± 5 (n=5), -74 ± 4 (n=5), -66 ± 3 (n=4) и 71 ± 5 мВ (n=4). У крыс возрастом 21 суток и у взрослых крыс спонтанная деполяризация ПП была статистически значимой и составляла 14 ± 5 и 10 ± 5 мВ. Значения потенциала покоя у десимпатизированных крыс, зарегистрированные в двух разных режимах работы (ритмически возбуждаемые, покоящиеся), статистически значимо не отличались от ПП у контрольных крыс для соответствующих возрастных групп (Рис.12, Б). Таким образом, постнатальное увеличение длительности вызванных ПД, а также появление феномена спонтанной деполяризации ПП в миокарде легочных вен происходит у контрольных и десимпатизированных животных сходно.

В миокарде легочных вен десимпатизированных крыс возрастом 7 (n=6) и 14 суток (n=7) норадреналин никогда не вызывал спонтанной активности, у 21-дневных и взрослых животных – только в 50% экспериментов (Рис.12, В). Таким образом, миокард легочных вен десимпатизированных крыс отличается от такового у контрольных животных по способности генерировать спонтанные ПД в ответ на адренергическую стимуляцию: десимпатизация приводит к тому, что миокардиальная ткань ЛВ становится не способна вовсе к адренергической автоматии до конца второй недели постнатальной жизни, а в более позднем онтогенезе эта способность снижается вдвое. Эти данные позволяют предположить, что формирование симпатической иннервации, происходящее в легочных венах на 2-3-й неделе постнатальной жизни, способствует такому изменению свойств ткани, в результате которого становится возможной адренергическая «проаритмическая» активность.

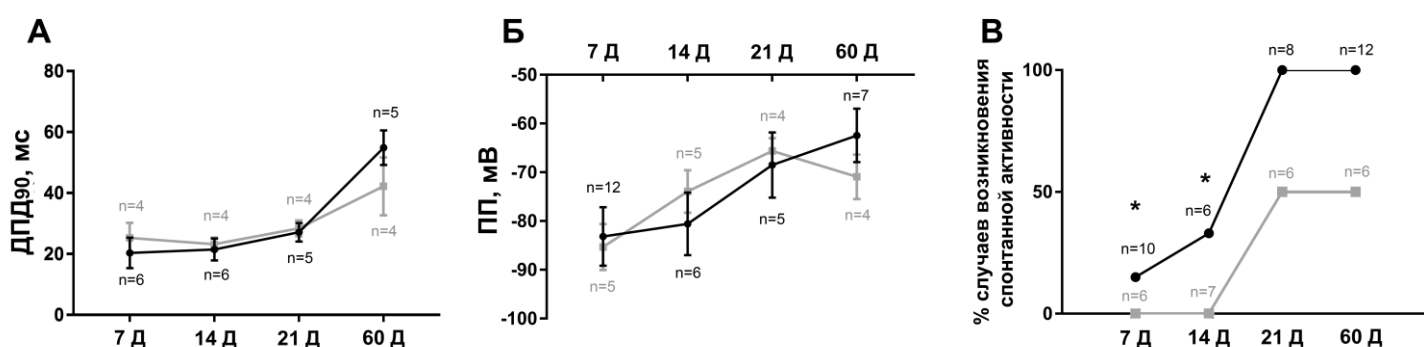


Рис. 12. Длительность ПД на уровне 90% реполяризации (А) потенциал покоя (Б) в миокардиальной ткани легочных вен у десимпатизированных (серый цвет) и контрольных (черный цвет) крыс разных возрастов. В. Процент случаев возникновения спонтанной активности при действии норадреналина (10 мкМ) в миокарде легочных вен контрольных (черный цвет) и десимпатизированных (серый цвет) крыс (* - $p < 0,05$, точный тест Фишера). 7Д, 14Д, 21Д, 60Д – крысы возрастом 7, 14, 21 и 60 суток, соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа посвящена исследованию возрастных изменений биоэлектрической активности в миокардиальной ткани легочных вен, преобразованию чувствительности данной ткани к адренергической стимуляции, изучению внутриклеточных механизмов адренергических эффектов, роли симпатической иннервации в контроле электрической активности ЛВ. Кратко, перечень вопросов, затрагиваемый в данной работе, направлен на изучение онтогенетических аспектов эктопической проаритмической активности легочных вен.

Нами показано, что электрофизиологические свойства миокарда ЛВ на ранних стадиях постнатального развития, за исключением первых 1-2 суток постнатальной жизни, сходны с таковыми в рабочем миокарде предсердий. В ходе дальнейшего онтогенеза электрическая активность миокарда ЛВ крыс претерпевает существенные изменения: меняются такие показатели как длительность потенциалов действия, значения потенциала покоя. По мере развития животных значения потенциала покоя становятся менее негативными, достигая наиболее «деполяризованного» значения у взрослых животных. Несомненно, что наблюдаемые постнатальные электрофизиологические перестройки обусловлены изменением мембранных проводимостей, экспрессии молекул, обуславливающих трансмембранный перенос ионов (каналов, обменников, АТФаз). Основываясь на современных литературных данных, касающихся регуляции транскрипции генов и регуляции экспрессии белков, можно предположить, что в основе наблюдаемых явлений лежит изменение уровня транскрипционных факторов (Tbx3, Tbx5, Tbx18, GATA, Nkx2-5) или перестройка их сетевого взаимодействия.

Как известно, симпатические воздействия играют центральную роль в инициации предсердных аритмий, однако согласно литературным данным окончательное формирование симпатической иннервации сердца крысы происходит ко 2-3 неделе постнатального развития. Мы показали, что в миокарде легочных вен крыс катехоламин-содержащие волокна также начинают формироваться только в конце первой недели жизни, а к третьей неделе сеть волокон имеет такую же выраженность, как и у взрослых животных. Также выраженность эффектов агонистов адренорецепторов на биоэлектрическую активность и способность норадреналина индуцировать спонтанную активность возрастает по мере развития животных, достигая максимальных значений у взрослых крыс. Эти результаты позволяют предположить, что формирование иннервации связано с изменением электрофизиологических свойств легочных вен в ходе онтогенеза.

При «активации» симпатической иннервации в онтогенезе нервные окончания начинают высвобождать везикулы с нейромедиатором и котрансммиттерами. Пуриновые комедиаторы синаптической нейротрансмиссии могут оказывать модулирующее влияние на эффекты основного медиатора. Пуриновые комедиаторы, оказывая влияние на биоэлектрическую

активность легочных вен, могли бы являться фактором, стимулирующим проаритмическую активность. Однако, как показали наши эксперименты, НАД⁺, АТФ, диаденозинтетрафосфат, не являются такими факторами и, в целом, способствуют подавлению эктопической автоматии в легочных венах крыс, по крайней мере при кратковременном воздействии.

Хорошо известно, что симпатические нервы оказывают трофическое и программирующее влияние в целом ряде тканей организма. Возможно, что соединения, высвобождаемые симпатическими нервными окончаниями, оказывают регуляторное воздействие на сеть транскрипционных факторов и на экспрессию белков ионного транспорта в миокарде легочных вен. Предположение о роли симпатической иннервации подтверждается экспериментами, проведенными на крысах с хронической неонатальной десимпатизацией: эффекты активации адренорецепторов у таких животных были сниженными не только на ранних стадиях постнатального онтогенеза, но и у взрослых животных. Таким образом, подавление формирования симпатической иннервации предотвращает аритмогенные изменения электрофизиологических свойств миокарда легочных вен. Можно заключить, что результатом данной работы является установление одного из факторов, способствующих проаритмическому преобразованию электрофизиологических свойств легочных вен в ходе онтогенеза. Таким фактором, является развивающаяся симпатическая иннервация легочных вен. Данная работа открывает возможность для выяснения молекулярных механизмов и мишеней, которые должны лежать в основе «программирующего» действия симпатической иннервации в легочных венах, и которые остались за пределами представленного исследования.

ВЫВОДЫ

1. Электрофизиологические характеристики миокарда легочных вен крысы изменяются в ходе постнатального онтогенеза: на самых ранних стадиях развития кардиомиоциты ЛВ по своим характеристикам сходны с предсердными кардиомиоцитами, а специфические свойства – деполяризованный уровень потенциала покоя, увеличенная длительность потенциалов действия (ПД), проявляются только после второй недели постнатальной жизни.

2. Эндогенный агонист адренорецепторов норадреналин, в отличие от селективных агонистов α_1 -адренорецепторов и β -адренорецепторов, в легочных венах взрослых крыс всегда приводит к возникновению спонтанной активности в виде периодических залпов либо ритмических, перманентных спонтанных потенциалов действия.

Способность легочных вен к формированию спонтанной активности при адренергической активации не характерна для миокарда ЛВ новорожденных крыс и появляется только по мере развития животных, начиная со второй недели постнатальной жизни.

3. Гиперполяризация ПП в миокарде ЛВ, наблюдаемая при активации β -адренорецепторов, преимущественно обусловлена внутриклеточным сигнальным каскадом протеинкиназы А и повышением цитоплазматической концентрации кальция, в то время как α_1 -адренорецепторзависимая деполяризация скорее всего не связана с активацией фосфатидил-инозольного внутриклеточного сигнального каскада.

4. Пуриновые комедиаторы симпатической нейротрансмиссии НАД⁺, АТФ, диаденозинтетрафосфат оказывают влияние на биоэлектрическую активность легочных вен, начиная с первого дня жизни; пуриновые комедиаторы подавляют эффекты норадреналина, заключающиеся в индукции эктопической активности, в миокарде легочных вен начиная со второй недели постнатальной жизни.

5. Симпатическая иннервация легочных вен развивается постнатально на протяжении первых трех недель жизни, а изменения характера биоэлектрической активности совпадают с периодом формирования иннервации. α_{1A} - и β_1 -адренорецепторы обнаруживаются в миокарде легочных вен крысы, начиная с первого дня постнатальной жизни, а количество адренорецепторов в легочных венах обоих типов незначительно меняется в ходе онтогенеза.

6. Хроническая неонатальная десимпатизация снижает способность норадреналина индуцировать спонтанные ПД в легочных венах крысы, начиная со второй недели постнатальной жизни. Таким образом, развитие симпатической иннервации способствует формированию проаритмического электрофизиологического фенотипа в легочных венах в ходе постнатального онтогенеза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, Web of Science, RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.03.06 по специальности 03.03.01 – Физиология:

1. Pustovit K.B., **Potekhina V.M.**, Ivanova A.D., Petrov A.M., Abramochkin D.V., Kuzmin V.S. Extracellular ATP and β -NAD alter electrical properties and cholinergic effects in the rat heart in age-specific manner // Purinergic Signalling. – 2019. – V. 15. - № 1. – P. 107-117. (Scopus, WoS, IF = 3.038)

2. **Potekhina V.M.**, Averina O.A., Razumov A.A., Kuzmin V.S., Rozenshtaukh L.V. The local repolarization heterogeneity in the murine pulmonary veins myocardium contributes to the spatial distribution of the adrenergically induced ectopic foci // The journal of physiological sciences: JPS. – 2019. – V. 69. - № 6. – P. 1041-1055. (Scopus, WoS. IF = 3.341)

3. **Потехина В.М.**, Кузьмин В.С., Абрамочкин Д.В. Внеклеточный диаденозинтетрафосфат подавляет эктопическую активность в миокардиальной ткани легочных вен у взрослых, но не у новорожденных крыс // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. - 2019. - Т. 74. - № 1. - С. 34-41. (РИНЦ, Google Scholar, IF=0,792)

4. Пустовит К.Б., **Потехина В.М.**, Пахомов Н.В., Кузьмин В.С. Влияние внеклеточного диаденозинтетрафосфата на биоэлектрическую активность предсердного и желудочкового миокарда крысы на ранних этапах постнатального онтогенеза // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. - 2018. - Т. 73. - № 1. - С. 52-59. (РИНЦ, Google Scholar, IF=0,792)

5. **Каримова (Потехина) В.М.**, Кузьмин В.С., Розенштраух Л.В. Внутриклеточные молекулярные механизмы адренергической регуляции мембранного потенциала миокарда легочных вен // Кардиология. - 2017. - Т. 57. - № 11. - С. 34-41. (WoS, Scopus, IF=0,760)

6. **Каримова (Потехина) В.М.**, Пустовит К.Б., Абрамочкин Д.В., Кузьмин В.С. Влияние пуриновых комедиаторов на автоматическую активность, вызванную норадреналином в миокардиальных рукавах легочных вен // БЭБиМ. – 2016. - Т. 162. - № 11. - С. 536-542. (РИНЦ, IF=0,656)

7. **Каримова (Потехина) В.М.**, Кузьмин В.С., Ундровинас Н.А., Розенштраух Л.В. Роль цитоплазматического кальция в регуляции потенциала покоя миокарда лёгочных вен крыс и мышей // ДАН. - 2016. - Т. 469. - № 2. - С. 260-263. (РИНЦ, IF=1,058)

Тезисы докладов в рецензируемых журналах

1. **Karimova (Potekhina) V.M.**, Kuzmin V.S. Mechanisms of beta-adrenergic regulation of bioelectric activity in murine pulmonary veins myocardium // Acta Physiologica. – 2017. – V. 221. – № S713. – P. 117-118. (Scopus, WoS, IF = 5.868)

2. Kuzmin VS, **Karimova (Potekhina) VM**, Rozenshtaukh LV. Adrenergic and rate control of excitation pattern in rat caval veins cardiac tissue. 2017. Acta Physiologica, V. 219, № S710, с. 4-4. (Scopus, WoS, IF = 5.868)

3. **Karimova (Potekhina) V.M.**, Kuzmin V.S. Action potentials alteration and arrhythmogenic conduction disturbances under alpha-1-adrenoreceptor activation in the murine pulmonary vein // Acta Physiologica. – 2017. – V. 219. - № S710. – P. 26-26 (Scopus, WoS, IF = 5.868).

4. **Karimova (Potekhina) V.M.**, Kuzmin V.S. Adrenergic regulation of bioelectrical activity of rat pulmonary veins myocardium // Acta Physiologica. – 2015. – V. 215. – № S706. – P. 66. (IF = 5.868)

Прочие тезисы докладов

1. **Потехина В.М.**, Аверина О.А. Особенности биоэлектрической активности и симпатической иннервации миокардиальной ткани легочных вен и левого предсердия мышей линии C57BL6/CBA // Материалы XIV международной конференции, посвященной 80-летию заслуженного деятеля науки РФ и РТ Ситдикова Фарита Габдулхаковича "Адаптация развивающегося организма". – 2018. – Казань, «Отечество». – С. 100-101

2. **Потехина В.М.**, Кузьмин В.С. Влияние внеклеточного никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺) на биоэлектрическую активность в миокарде легочных вен крыс на разных стадиях развития // Сборник материалов Второй молодежной школы-конференции «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций». - 2017. - Москва, «Университетская книга». - С. 20-21.

3. **Каримова (Потехина) В.М.**, Кузьмин В.С. Роль сигнального каскада бета-адренорецепторов и кальциевых каналов в индукции эктопической активности в миокарде легочных вен мышей // Сборник материалов XXIII съезда Физиологического общества имени И.П. Павлова. – 2017. – Воронеж, «ИСТОКИ». – С. 116-118.

4. **Каримова (Потехина) В.М.**, Кузьмин В.С. Влияние пуриновых комедиаторов на аритмогенную активность, вызванную норадреналином в миокардиальной ткани легочных вен // Материалы XIII международной школы-конференции, посвященной 65-летию кафедры охраны здоровья человека института фундаментальной медицины и биологии "Адаптация развивающегося организма". - 2016. - Казань - Яльчик, Вестфалика. – С. 60-61.

5. **Каримова (Потехина) В.М.**, Кузьмин В.С. Роль цитоплазматического кальция в регуляции потенциала покоя миокарда легочных вен крысы // сборник тезисов докладов VI Всероссийской с международным участием школы-конференции по физиологии кровообращения. – 2016. –Москва, МАКС Пресс. – С. 129.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат,
АЦ – аденилатциклаза,
ИЗО - изопротеренол,
ЛВ - легочные вены,
ЛП – левое предсердие,
НА - норадреналин,
НАД⁺ - никотинамидадениндинуклеотид,
ПД – потенциал действия,
ПП – потенциал покоя,
ФП – фибрилляция предсердий,
ФЭ – фенилэфрин.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность Кузьмину Владиславу Стефановичу за чуткое руководство, моральную поддержку и помощь на всех этапах исследования, за внимательное отношение и рекомендации к работе; Абрамочкину Денису Валерьевичу, Пустовит Ксении Борисовне, Филатовой Татьяне Сергеевне, Ивановой Александре Дмитриевне, Пахомову Николаю Владимировичу за техническую помощь и поддержку.

Автор выражает благодарность Розенштрауху Леониду Валентиновичу за рекомендации к работе, Нидасу Ундровинасу за помощь в освоении методики кальциевого имеджинга.

Автор сердечно благодарен Тарасовой Ольге Сергеевне за внимательное прочтение и рецензирование данной работы.

Автор глубоко признателен заведующему кафедрой физиологии человека и животных Каменскому Андрею Александровичу, а также всем сотрудникам кафедры за положительное отношение, интерес к работе и поддержку.

Автор чрезвычайно благодарен родным, близким и друзьям, в особенности Потехину Петру Алексеевичу, Каримову Марату Даутовичу и Каримовой Ольге Николаевне, Каримовой Марии Маратовне, Швецовой Анастасии Алексеевне, Бабкиной Ирине Игоревне, Абрамичевой Полине Александровне и Гончарову Алексею Игоревичу за участие и поддержку.