

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Кузьмин В.С.

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	8
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Общие представления о строении и свойствах миокардиальной ткани в легочных венах	14
1.2. Механизмы предсердных аритмий. Спонтанная и автоматическая активность в миокарде легочных вен как причины формирования нарушений ритма сердца.....	17
1.3. Формирование легочных вен и их миокардиальной ткани в ходе эмбрионального развития	20
1.3.1. Морфогенез легочных вен и их миокардиальной обкладки	20
1.3.2. Потенциальные молекулярно-генетические механизмы, обуславливающие особенности электрической активности миокарда легочных вен	21
1.4. Иннервация и нервная регуляция биоэлектрической активности миокардиальной ткани легочных вен	25
1.5. Рецепторные механизмы адренергической регуляции	27
1.5.1. Общие сведения о структуре адренорецепторов, их свойствах и основных внутриклеточных механизмах передачи сигнала.....	28
1.5.2. Дополнительные внутриклеточные сигнальные каскады, сопряженные с адренорецепторами	31
1.5.3. Адренорецепторы в сердце.....	33
1.6. Конфигурация ПД и потенциал покоя при адренергических воздействиях в рабочем миокарде млекопитающих	34
1.7. Пуриновые соединения как медиаторы симпатической нейротрансмиссии и их роль в регуляции биоэлектрической активности миокарда	37
1.7.1 Мембранные рецепторы пуриновых соединений	37
1.7.2. Эффекты внеклеточного АТФ в миокарде млекопитающих	38
1.7.3. Эффекты внеклеточного НАД ⁺ в миокарде млекопитающих	39
1.7.4. Эффекты внеклеточного ДАТФ в миокарде млекопитающих	40

1.8. Свойства некоторых ионных каналов и переносчиков, участвующих в регуляции потенциала покоя в кардиомиоцитах, и их адренергическая регуляция	41
1.8.1. Na/K-АТФаза	41
1.8.2. Натрий-кальциевый обменник	43
1.8.3. Калиевый реполярирующий ток аномального выпрямления I_{K1}	45
1.8.4. Са-зависимый К-ток - I_{KCa}	46
1.8.5. Калиевые каналы и токи утечки - I_{leak}	48
1.9. Формирование симпатической иннервации и адренергической рецепции в сердце в ходе онтогенеза	49
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	51
2.1. Экспериментальные животные	51
2.2. Регистрация биоэлектрической активности в препаратах легочных вен крысы	52
2.2.1. Выделение препаратов левого предсердия с участками легочных вен	52
2.2.2. Перфузия многоклеточных препаратов легочных вен крысы	53
2.2.3. Экспериментальная установка, регистрация потенциала покоя, потенциалов действия и спонтанной автоматической активности	54
2.2.4. Протоколы экспериментов	55
2.2.5 Анализ экспериментальных данных	57
2.3. Визуализация катехоламин-содержащих волокон в стенке легочных вен и левого предсердия	57
2.3.1. Приготовление и окрашивание тканевых образцов легочных вен	57
2.3.2. Обработка конфокальных изображений и анализ распределения катехоламин-позитивных волокон в легочных венах	58
2.4. Иммунофлюоресцентное выявление рецепторов норадреналина в миокардиальной ткани легочных вен	60
2.4.1. Получение тканевых образцов и приготовление парафиновых блоков	60
2.4.2. Приготовление и окраска срезов	60
2.4.3. Получение конфокальных изображений и анализ распределения адренорецепторов в миокарде легочных вен	61

2.5. Моделирование хронической неонатальной десимпатизации у крыс и верификация десимпатизации	62
2.5.1. Характеристика животных с хронической неонатальной десимпатизацией и контрольных к ним животных.....	62
2.5.2. Регистрация биоэлектрической активности в легочных венах у десимпатизированных животных	63
2.6. Реактивы и материалы.	63
2.7. Статистическая обработка результатов.....	66
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	67
3.1. Общая характеристика биоэлектрической активности в миокардиальной ткани легочных вен взрослых крыс	67
3.2. Изменение биоэлектрической активности миокардиальной ткани легочных вен крыс в ходе раннего постнатального онтогенеза	69
3.2.1. Потенциал действия и потенциал покоя в легочных венах крыс на разных этапах постнатального развития	69
3.2.2. Спонтанная (автоматическая) активность в легочных венах крыс на разных этапах постнатального развития	73
3.3. Влияние агонистов адренорецепторов на биоэлектрическую активность миокардиальной ткани легочных вен крыс на разных этапах онтогенеза	74
3.3.1. Влияние норадреналина на биоэлектрическую активность в легочных венах на разных этапах постнатального онтогенеза	74
3.3.2. Влияние фенилэфрина и изопротеренола на биоэлектрическую активность в легочных венах на разных этапах постнатального онтогенеза.....	78
3.4 Эксперименты, направленные на выяснение механизмов электрофизиологических эффектов активации адренорецепторов в миокарде легочных вен.....	81
3.4.1. Эксперименты, направленные на выяснение механизмов деполяризации, вызванной активацией α_1 -адренорецепторов в легочных венах	81
3.4.2. Эксперименты, направленные на выяснение механизмов гиперполяризации, вызванной активацией β -адренорецепторов в легочных венах	85
3.4.3. Роль цитоплазматического кальция в гиперполяризации, вызываемой активацией β -адренорецепторов в легочных венах.....	88

3.4.4. Роль натрий-кальциевого обменника в регуляции спонтанной активности, вызванной норадреналином в миокарде легочных вен	92
3.4.5. Роль I_{K1} в регуляции потенциала покоя и индукции спонтанной активности, вызванной норадреналином в миокард легочных вен	94
3.5. Биоэлектрическая активность миокардиальной ткани легочных вен крыс при действии пуриновых комедиаторов симпатической трансмиссии на разных этапах постнатального онтогенеза.....	96
3.5.1. Действие НАД ⁺ и АТФ на потенциал действия, потенциал покоя и спонтанную активность легочных вен на разных этапах онтогенеза	96
3.5.2. Влияние диаденозинтетрафосфата на потенциал действия, потенциал покоя и спонтанную активность крыс в ходе онтогенеза	98
3.5.3 Влияние НАД ⁺ и АТФ на электрофизиологические эффекты норадреналина в миокарде легочных вен крыс на разных этапах постнатального развития	101
3.5.4. Влияние диаденозинтетрафосфата на электрофизиологические эффекты норадреналина в миокарде легочных вен крыс на разных этапах постнатального онтогенеза .	105
3.6. Особенности симпатической иннервации и адренергической рецепции миокардиальной ткани легочных вен на разных этапах постнатального онтогенеза	106
3.6.1. Формирование симпатической иннервации миокарда легочных вен у крыс в ходе постнатального развития	107
3.6.2. Экспрессия α_{1A} - и β_1 -адренорецепторов в миокардиальной ткани легочных вен крысы в ходе постнатального онтогенеза.....	110
3.7. Электрофизиологические свойства миокарда легочных вен у десимпатизированных животных	115
3.7.1. Потенциал покоя и потенциал действия в легочных венах десимпатизированных животных на разных этапах постнатального развития	116
3.7.2. Влияние норадреналина на биоэлектрическую активность миокарда легочных вен у десимпатизированных животных на разных этапах онтогенеза	119
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	121
4.1. Особенности биоэлектрических свойств миокардиальной ткани легочных вен крыс в ходе постнатального онтогенеза.....	121

4.1.1. Особенности электрофизиологических свойств, характерных для зрелого миокарда легочных вен.....	121
4.1.2. Изменение основных электрофизиологических свойств миокардиальной ткани легочных вен крыс в ходе постнатального онтогенеза	123
4.2. Эффекты агонистов адренорецепторов на биоэлектрическую активность миокардиальной ткани легочных вен у крыс на разных этапах онтогенеза	126
4.2.1. Действие норадреналина, фенилэфрина и изопротеренола на миокард легочных вен взрослых крыс.....	126
4.2.2. Действие норадреналина, фенилэфрина и изопротеренола на миокард легочных вен в ходе раннего постнатального развития.....	128
4.3. Возможные механизмы действия агонистов адренорецепторов в миокарде легочных вен крыс	130
4.3.1. Возможные механизмы деполяризации, вызываемой фенилэфрином в миокарде легочных вен крысы.....	130
4.3.2. Возможные механизмы гиперполяризации, вызываемой изопротеренолом в миокарде легочных вен.....	132
4.3.3. Роль Na/K-АТФазы в сдвиге потенциала покоя, вызываемого адренергическими воздействиями	134
4.3.4. Роль NCX в сдвиге потенциала покоя, вызываемого адренергическими воздействиями в легочных венах.....	135
4.3.5. Роль цитоплазматического кальция в гиперполяризации, вызываемой β -адренергической стимуляцией в легочных венах	137
4.3.6. Роль тока Са-зависимых К-каналов (I_{KCa}) в гиперполяризации, вызываемой β -адренергической стимуляцией в легочных венах	139
4.3.7. Иные возможные механизмы регуляции биоэлектрической активности в легочных венах	139
4.4. Пуриновые комедиаторы не способствуют адренергической спонтанной активности в миокарде легочных вен крыс	140
4.4.1. Действие НАД ⁺ , АТФ и диаденозинтетрафосфата на основные электрофизиологические характеристики миокарда легочных вен крыс в ходе онтогенеза	140

4.4.2. Влияние НАД ⁺ , АТФ и диаденозинтетрафосфата на электрофизиологические эффекты норадреналина в миокарде легочных вен крыс в ходе постнатального развития	141
4.5. Связь формирования симпатической иннервации и паттерна рецепторов адреналина в ходе онтогенеза с формированием проаритмического фенотипа в легочных венах.....	143
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	146
ВЫВОДЫ	148
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	149
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	151

ВВЕДЕНИЕ

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; Maupoil 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 нервного контроля 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.

Задачи исследования

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 вскармливающих 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. Апробация результатов

По материалам работы было опубликовано 16 работ: 7 статей 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.

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 работы

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.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие представления о строении и свойствах миокардиальной ткани в легочных венах

Легочные вены млекопитающих являются частью малого круга кровообращения, который, как известно, обеспечивает газообмен между кровью легочных капилляров и воздухом легочных альвеол. По легочным венам кровь, обогащенная в легких кислородом, притекает к сердцу. Кровь попадает в левое предсердие через устья легочных вен, располагающиеся в дорзолатеральном участке («крыше») стенки левого предсердия. Анатомически можно выделить два отдела легочных вен: внутрилегочные участки – то есть участки сосудов, располагающиеся внутри легочной ткани долей легких, а также «свободные» участки – то есть отрезки сосудов, начинающиеся от места выхода вен из долей легких (хилума легочных долей) до места их слияния с левым предсердием. Свободные участки легочных вен имеют одну или две бифуркации, так что в долю легкого может входить несколько ветвей легочной вены.

Стенки легочных вен дистальных отделов (то есть отделов, располагающиеся дистальнее бифуркаций) свободных участков и внутрилегочных участков у крупных млекопитающих, в том числе у человека, имеют типичное для венозных сосудов строение: внутренняя поверхность сосуда выстлана эндотелием, снаружи от которого располагается базальная пластинка и тонкий слой гладкомышечных клеток, который покрыт соединительной тканью (адвентиция) (Hashizume et al., 1998). Однако, проксимальные отделы стенки легочных вен – то есть отделы, прилегающие к левому предсердию, имеют ряд особенностей строения.

В настоящее время показано, что у человека и большинства млекопитающих проксимальные участки ЛВ включают слои миокардиальной ткани. Это, так называемые, «миокардиальные рукава», «миокардиальные муфты» или «миокардиальная обкладка» легочных вен (Masani, 1986). Миокардиальная ткань в легочных венах была обнаружена более 100 лет назад (Favaro, 1910; Marshall, 1850; Stieda, 1877). Важно отметить, что в месте перехода миокарда предсердий в миокардиальную ткань ЛВ нет четкой границы. Миокардиальная обкладка легочных вен имеет непрерывную связь с предсердным миокардом. Миокардиальные клетки в легочных венах залегают снаружи от гладкомышечного слоя стенки вен, однако, под адвентицией. Наибольшую толщину миокардиальная ткань ЛВ имеет в месте атриовенозного соединения, и как правило, постепенно истончается по направлению к дистальным участкам ЛВ. Следует отметить, что у разных видов животных количество слоев кардиомиоцитов в ЛВ, а также протяженность миокардиальных рукавов различна. У человека миокардиальные рукава охватывают только свободные внелегочные участки ЛВ, протяженность их достигает

нескольких сантиметров, но эта величина сильно варьирует как среди индивидов, так и между венами одного предсердия. У лабораторных грызунов – крыс и мышей – миокардиальные рукава охватывают полностью не только свободные участки легочных вен, но и внутрилегочные участки, вплоть до внутрилегочных бифуркаций второго порядка (Hosoyamada et al., 2010).

Кардиомиоциты в миокардиальных рукавах ЛВ могут быть организованы в продольные, поперечные и диагональные тяжи относительно продольной оси вен. Пучки миокардиальных волокон в легочных венах могут образовывать как сплошную обкладку (у грызунов), так и формировать ячеистую или сетчатую структуру, разделяясь и смыкаясь друг с другом (у человека). Наиболее часто в миокардиальных рукавах ЛВ имеются два выраженных миокардиальных слоя: слой, состоящий из кольцевых волокон, который как правило является наружным, и слой, состоящий из продольных пучков волокон, который является внутренним (Saito et al., 2000; Verheule et al., 2002).

Существует несколько гипотез относительно эмбрионального происхождения кардиомиоцитов миокардиальной обкладки ЛВ. Ранее считалось, что по меньшей мере некоторые кардиомиоциты ЛВ имеют то же происхождение, что и кардиомиоциты синоатриального узла сердца, так как было найдено их сходство по ультраструктурным и электрофизиологическим характеристикам (способности спонтанно генерировать потенциалы действия) с пейсмекерными клетками (Р-клетками) синоатриального узла (Masani, 1986). В настоящее время данная точка зрения не поддерживается. При изоляции клеток из миокардиальной ткани ЛВ различных лабораторных животных явных их морфологических и гистологических отличий от кардиомиоцитов рабочего миокарда предсердий не обнаруживается. Кардиомиоциты легочных вен имеют размер, сходный с таковым в предсердиях (либо незначительно меньше), типичную цилиндрическую форму (“rod shaped cells”), выраженную поперечную исчерченность. В ряде работ указывается, что кардиомиоциты ЛВ и предсердий “приблизительно одинаковы” или “неразличимы” по размерам и форме (Verheule et al., 2002). Более того, кардиомиоциты легочных вен, проявляющие спонтанную автоматическую активность, не отличаются от кардиомиоцитов, не обладающих такой активностью (Hamabe et al., 2003).

Тем не менее, согласно наиболее подтвержденной в настоящее время гипотезе, кардиомиоциты предсердий и легочных вен имеют разное эмбриональное происхождение. После того, как на определенном этапе эмбриогенеза первичная легочная вена сливается со стенкой эмбрионального предсердия, клетки-предшественники начинают мигрировать из (второго) внекардиального мезенхимального поля и, дифференцируясь в кардиомиоциты, формировать миокардиальную обкладку. Рабочий миокард левого предсердия формируется

клетками-предшественниками первого кардиогенного поля (Douglas et al., 2011; Postma et al., 2009).

Показано, что исходно кардиомиоциты легочных вен экспрессируют транскрипционные факторы, характерные для «нормального» рабочего миокарда (Tbx5, Tbx20, Nkx2-5, Gata4) (Postma et al., 2009). Миокардиальная ткань ЛВ в целом обладает свойствами, характерными для обычного рабочего миокарда: все кардиомиоциты ЛВ электрически сопряжены, миокард ЛВ способен генерировать ПД с быстрым «натриевым» фронтом и проводить возбуждение со скоростью, характерной для рабочего миокарда.

Тем не менее, биоэлектрические свойства миокардиальных рукавов ЛВ отличаются от таковых для предсердий как на клеточном, так и на тканевом уровне. Различия на тканевом уровне связаны в основном со сложной цитоархитектоникой миокардиальных рукавов: «слоистостью» ткани, гетерогенностью ориентации миокардиальных тяжей, ячеистостью структуры, наличием фиброзных включений. Имеются сведения о нарушении электрической сопряженности кардиомиоцитов в ЛВ (King et al., 2013). Вышеуказанные особенности приводят к нарушению нормального проведения возбуждения в легочных венах. Различия на клеточном уровне, в первом приближении, проявляются в том, что кардиомиоциты ЛВ взрослых животных могут в определенных условиях проявлять свойства, характерные для пейсмекерного миокарда. Благодаря таким свойствам миокардиальная ткань ЛВ может служить источником (триггером) эктопической (т.е. проявляющейся за пределами естественного пейсмекера сердца – синоатриального узла) автоматии и приводить к возникновению предсердных аритмий (Chard and Tabrizchi, 2009).

Причины, в результате действия которых, кардиомиоциты, демонстрирующие фенотип и биоэлектрическую активность рабочего предсердного миокарда, становятся способными генерировать автоматическую активность до конца не выяснены. Существует несколько гипотез, касательно данного явления. Согласно одной из гипотез предполагается, что в результате действия ряда факторов в кардиомиоцитах легочных вен происходит сдвиг в сторону фенотипа, характерного для пейсмекерного миокарда. В настоящее время, действительно, показано, что в легочных венах уровень транскрипционных факторов, отвечающих за формирование и поддержание фенотипа «рабочего» кардиомиоцита оказывается сниженным.

Также для кардиомиоцитов ЛВ показана отличная от рабочего предсердного миокарда выраженность (экспрессия) определенных мембранных ионных каналов, трансмембранных ионных переносчиков, определяющих тип биоэлектрической активности. Изменен характер регуляции работы этих молекул (Postma et al., 2009). Тем не менее, в настоящее время остается неизвестным, что служит сигналом или причиной, приводящей к изменению паттерна

транскрипционных факторов и последующему изменению биоэлектрических свойств кардиомиоцитов ЛВ. Также не известно, происходят ли такие изменения всегда либо только при развитии определенных сердечно-сосудистых патологий. Кроме того, остается неизученным, в какой период в ходе онтогенеза преимущественно происходят такие изменения.

1.2. Механизмы предсердных аритмий. Спонтанная и автоматическая активность в миокарде легочных вен как причины формирования нарушений ритма сердца

История вопроса, касающегося такой формы тахикардии как фибрилляция предсердий (ФП), насчитывает более ста лет (Allessie et al., 1990; Moe et al., 1964; Wiener et al., 1946; Winterberg, 1906). За это время разработана теория, описывающая общие механизмы возникновения, поддержания и прекращения фибрилляции предсердий, накоплен огромный экспериментальный опыт. Разработаны математические модели, отражающие изменение биоэлектрической активности миокарда при возникновении данного типа аритмий (Kneller et al., 2002; Wiener and Rosenblueth, 1946). Доказано, что сама по себе фибрилляция связана, или по меньшей мере, сопровождается циркуляцией одной или нескольких волн возбуждения в ткани предсердий, однако возникать ФП может на основе разных механизмов и субстратов. Источники, приводящие к ФП, могут располагаться в самых разнообразных участках суправентрикулярной области сердца (устях полых вен, структурах правого предсердия, коронарном синусе, ушках предсердий, предсердно-желудочковых клапанах и проч.). Однако, в огромном количестве исследований, начиная с работ 1998 года (Haïssaguerre et al., 1998), было показано, что источники активности, приводящей к фибрилляции предсердий, наиболее часто располагаются именно в миокардиальных обкладках легочных вен (Schotten et al., 2011). Ниже будут рассмотрены некоторые возможные механизмы возникновения ФП в связи с биоэлектрическими свойствами миокарда легочных вен. Следует подчеркнуть, что рассмотрение легочных вен, как источника ФП, является только частью широкой проблемы возникновения предсердных аритмий.

В основе аритмогенности миокардиальных рукавов ЛВ могут лежать два явления. Первое явление заключается в формировании контура циркуляция возбуждения («re-entry») в пределах и/или с участием миокардиальной обкладки ЛВ (Arora et al., 2003; Schneider, 2003); второе - с образованием в пределах миокардиальной обкладки ЛВ локального очага, для которого характерна высокочастотная спонтанная автоматия, либо триггерная активность (аномальные потенциалы действия). Иначе такой очаг называют «эктопическим фокусом», «эктопической активностью», «фокальной активностью», что подчеркивает его ограниченный размер и расположение вне пределов естественного пейсмекера сердца. Существуют разногласия относительно того, какой из данных двух механизмов с большей вероятностью

приводит к возникновению ФП. Вероятно, что оба механизма вносят вклад в формирование ФП, усиливают друг друга.

Формирование контура циркуляции возбуждения в ЛВ и, в последующем, фибрилляции предсердий возможны благодаря нарушению нормальной последовательности и характера распространения возбуждения в суправентрикулярной части сердца. Участки миокардиальной ткани, которые в определенные моменты сердечного цикла не могут быть охвачены возбуждением, способствуют формированию «блоков проведения». Огибая такой участок, волна возбуждения может сформировать самоподдерживающийся круговой контур. Циркуляция возбуждения в таком контуре может распространяться на предсердия, взаимодействуя с «синоатриальной» волной возбуждения (Arentz et al., 2007; Kumagai et al., 2004), привести к формированию ФП. В настоящее время описано несколько механизмов, благодаря которым возникают блоки проведения в миокардиальной ткани: они могут быть обусловлены структурными особенностями участка миокарда (гетерогенностью миокардиальных структур), а также её биоэлектрическими свойствами (электрическим разобщением кардиомиоцитов, сдвигу потенциала покоя в положительную сторону). Обе этих особенности характерны для легочных вен, что делает их восприимчивым субстратом на формирование нарушений проведения возбуждения и контуров циркуляции. Важно отметить, что образование самоподдерживающихся контуров циркуляции в легочных венах возможно без каких-либо дополнительных факторов (внеочередных стимулов, внеочередных спонтанных потенциалов действия, и проч.), только лишь благодаря особенностям строения этой миокардиальной ткани (Cherry et al., 2007).

Второй механизм аритмогенности легочных вен связан с возникновением в этой ткани «эктопических фокусов». Эктопические фокусы могут формироваться в результате изменения биоэлектрических свойств групп клеток, которые сопровождаются, например, снижением уровня мембранного потенциала покоя, появлением диастолической деполяризации или спонтанных постдеполяризаций (нарушение нормального процесса реполяризации потенциалов действия; осцилляции мембранного потенциала в ходе 2-й и 3-й фазы ПД). Для кардиомиоцитов ЛВ характерны все перечисленные изменения. Однако, для установления ФП недостаточно просто возникновения эктопической активности в определенном (небольшом) участке миокарда ЛВ. Необходимо, чтобы возбуждение, возникшее в локальной области миокарда легочных вен, активно распространилось и охватывало миокардиальную ткань левого предсердия. В некоторых случаях возбуждение, генерируемое в "эктопическом фокусе" не выходит за пределы миокардиальных рукавов ЛВ и тогда никаких нарушений возбуждения предсердий не возникает (Dixit et al., 2004). Однако, как показано в литературе, в большинстве случаев при наличии эктопического фокуса в ЛВ возбуждение действительно охватывает

предсердную ткань. При этом происходит сложное взаимодействие волны возбуждения, распространяющейся из эктопического очага и из синоатриального узла. Как правило, такое взаимодействие приводит к нарушению нормальной последовательности распространения возбуждения, образованию односторонних блоков проведения и формированию контуров циркуляции возбуждения – то есть инициации ФП.

Понимание того факта, что в большинстве случаев возникновение ФП связано с активностью в миокардиальных рукавах легочных вен, которая распространяется на предсердный миокард, привело к внедрению и распространению хирургического подхода к лечению суправентрикулярных аритмий. Этот подход основан на изоляции (иначе «абляции») легочных вен. При данной процедуре каким-либо способом (как правило путем разрушения миокарда по периметру устья легочной вены с помощью крио- или радиочастотной абляции) проводят разобщение электрической взаимосвязи миокарда предсердий и миокарда ЛВ, в результате чего распространение волны возбуждения из эктопического фокуса миокардиальных рукавов в предсердия становится невозможным (Zhao et al., 2015).

Значительное количество экспериментальных работ направлено на выяснение механизмов и условий, в которых участки ткани, либо отдельные кардиомиоциты в ЛВ становятся способными к спонтанной эктопической активности, а также на установление условий, в которых возбуждение, возникающее в ЛВ оказывается способным вызвать фибрилляцию предсердий. Тем не менее, данный вопрос остается не решенным. Использование различных лабораторных животных и множественных экспериментальных подходов (работы на изолированных клетках или многоклеточных препаратах) служит причиной существенных противоречий в интерпретации результатов исследований. Обобщая имеющиеся данные, можно сказать, что ЛВ становятся источником аритмогенной активности в результате действия совокупности системных, тканевых и внутриклеточных факторов, а также особенностей нервной регуляции ЛВ. Возможно, что нервная регуляция, а именно симпатический отдел вегетативной нервной системы, является основным фактором, определяющим аритмогенность миокарда ЛВ (Бернгардт, 2011).

Как известно, вегетативная нервная система (ВНС) играет важную роль в регуляции биоэлектрической активности кардиомиоцитов посредством воздействия на мембранные рецепторы нейромедиаторов и котрансммиттеров, внутриклеточные сигнальные каскады и множественные мишени, включая ионные проводимости. Помимо прочего, вегетативные нервы, благодаря высвобождаемым ими нейротрансмиттерам и факторам, могут оказывать долговременное, трофическое влияние на миокардиальную ткань, приводя к изменению ее гистологического и электрофизиологического фенотипа в онтогенезе и при патологиях. Поэтому, следующие разделы, после более подробного рассмотрения эмбриональных аспектов

формирования миокарда легочных вен, будут посвящены механизмам влияния симпатического отдела ВНС на биоэлектрическую активность рабочего миокарда предсердий и миокарда легочных вен.

1.3. Формирование легочных вен и их миокардиальной ткани в ходе эмбрионального развития

1.3.1. Морфогенез легочных вен и их миокардиальной обкладки

Легочные вены млекопитающих образуются из общего предшественника – первичной легочной вены. Первичная легочная вена имеет внекардиальное происхождение: она формируется в результате преобразования проэндотелиальных клеток мидфаренгиального эндокардиального тяжа, который расположен дорзально относительно сердца (DeRuiter et al., 1993). Начиная с самых ранних этапов развития эмбриона, эндокардиальный тяж легочной вены связан с эндокардиальными тяжами сердечных закладок. Соединение будущей легочной вены с полостью предсердия возможно только благодаря тому, что мезенхимальная ткань, окружающая вену, проникает сквозь всю толщу стенки сердца. Постепенно, за счет увеличения количества клеток в тяже легочной вены образуется канал, который соединяется с полостью формирующегося предсердия (Snarr et al., 2007). На описанных этапах развития первичная легочная вена не имеет миокардиальной обкладки - она появляется позже, одновременно с формированием межпредсердной перегородки (Mommersteeg et al., 2009).

Согласно современным литературным данным место впадения первичной легочной вены в полость общего предсердия определено заранее: в сердечной трубке есть выпячивание, которое называется «пульмонарным» бугорком и является будущим устьем первичной легочной вены, справа от него формируется первичная межпредсердная перегородка.

Развитие предсердия и межпредсердной перегородки происходит одновременно с развитием легочных вен. Формирующиеся синоатриальный клапан и межпредсердная перегородка сдвигают устье легочной вены в левую часть предсердия. Как известно, предсердия у млекопитающих (в том числе и левое) можно разделить на две части: трабекулярную и гладкую. Трабекулярная часть левого предсердия представлена ушком левого предсердия и имеет исходно «сердечное» происхождение, тогда как гладкая часть стенки ЛП формируется за счет ткани врастающей в нее первичной легочной вены. Таким образом внутренняя поверхность гладкой части левого предсердия содержит компоненты сосудистой стенки: гладкомышечные клетки и соединительнотканную прослойку, только снаружи от которой располагается миокардиальная ткань (Douglas et al., 2006; Но, 2001). Увеличение площади стенки левого предсердия происходит за счет клеток легочной вены. Показано, что в

гладкой части взрослого левого предсердия миокардиальный слой может быть сильно редуцирован или вовсе отсутствовать. Первичная легочная вена «врастает» в стенку предсердия вплоть до бифуркаций ветвей второго порядка, которые, в итоге формируют четыре отдельных устья вен в зрелом сердце человека.

В эмбриогенезе сначала формируется миокардиальная обкладка первичной легочной вены, а затем, благодаря её включению в стенку левого предсердия, кардиомиоциты исходно миокардиальной обкладки формируют стенку гладкой (но не трабекулярной) части левого предсердия. Таким образом, миокардиальная обкладка легочных вен и миокард части левого предсердия действительно имеют общее происхождение.

Существует несколько гипотез относительно происхождения миокардиальной обкладки легочных вен. Согласно первой гипотезе предполагалось, что в процессе развития сердечно-сосудистой системы кардиомиоциты или их предшественники мигрируют из предсердия в проксимальные и дистальные участки мезенхимальной стенки формирующихся легочных вен (Millino et al., 2000). Данное предположение в настоящее время представляется маловероятным.

Вторая гипотеза предполагает «рекрутинг» кардиомиоцитов. Согласно данной концепции, мезенхимальные клетки мигрируют в область стенки общей легочной вены и её ветвей, где дифференцируются в кардиомиоциты. Третья гипотеза, в наибольшей степени подтвержденная, предполагает, что мезенхимальные предшественники кардиомиоцитов мигрируют в стенку легочных вен, там дифференцируются в кардиомиоциты, а также пролиферируют, в результате чего миокардиальная ткань разрастается в направлении дистальных участков вен. Источником мезенхимальных предшественников кардиомиоцитов являются участки второго кардиогенного поля (Douglas et al., 2009).

Важно отметить, что кардиомиоциты легочных вен не происходят и не мигрируют непосредственно из венозного синуса или его производных, таких как синоатриальный узел или коронарный синус (Moorman et al., 2011). Также, кардиомиоциты легочных вен не имеют отношения к миокардиальной ткани сердечной трубки (т.е. к производным первого кардиогенного поля) и, соответственно, рабочим кардиомиоцитам правого предсердия, ушка левого предсердия.

1.3.2. Потенциальные молекулярно-генетические механизмы, обуславливающие особенности электрической активности миокарда легочных вен

Формирование сердца сопровождается транскрипцией множества генов, специфичных для мышечной ткани и миокарда определенных отделов сердца, которые необходимы для реализации сократительной и электрической активности сердца. Активация и транскрипция генов регулируется так называемыми транскрипционными факторами (ТФ, активаторами или

репрессорами транскрипции). Транскрипционные факторы представляют собой белки, которые контролируют синтез мРНК, связываясь со специфическими участками ДНК. Целый спектр транскрипционных факторов играет критическую роль в формировании сердца, и регуляции его работы (Sylva et al., 2014). Наиболее важными ТФ в аспекте морфогенеза сердца являются факторы семейств GATA, Tbx, Nk, Isl. Транскрипционные факторы играют важную роль также и в формировании электрического фенотипа кардиомиоцитов: именно ТФ определяют, какие именно ионные каналы, переносчики, транспортеры и электрические контакты будут экспрессированы на мембране кардиомиоцитов.

Например, определенный набор транскрипционных факторов способствует формированию электрического фенотипа, характерного для рабочих кардиомиоцитов. К этой группе относят такие ТФ, как Tbx5, Tbx20, Nkx2-5, GATA4. Их также называют «камерообразующими», так как они способствуют пролиферации кардиомиоцитов и разрастанию камер предсердий и желудочков. Так, экспрессия Nkx2-5, GATA4 и их связывание с ДНК приводит к дифференциации миокарда сердечной трубки в рабочий миокард камер зрелого сердца. Активаторы транскрипции Tbx5, Tbx20 стимулируют факторы Nkx2-5, GATA4. В тех клетках-предшественниках или участках миокарда, где велик уровень Tbx5, Tbx20, (и соответственно, Nkx2-5 и GATA4) будет наблюдаться электрическая активность, свойственная для рабочего миокарда как в пренатальном, так и в постнатальном периоде.

Набор «камерообразующих» факторов, вызывает экспрессию генов белков щелевых контактов высокой проводимости - Cx40, Cx43, генов *Scn5a* α -субъединицы натриевых потенциалчувствительных каналов – Nav1.5, генов калиевых каналов Kir2.x (каналов токов аномального выпрямления, формирующих стабильный потенциал покоя), характерных для зрелого рабочего миокарда, гена *Nppa* (ген предшественника натрийуретического пептида, маркера предсердного рабочего миокарда). Данные каналы и щелевые контакты характерны для рабочих кардиомиоцитов.

Другой набор транскрипционных факторов способствует формированию электрического фенотипа, характерного для пейсмекерной ткани («пейсмекерный» фенотип). Одновременно этот набор ограничивает пролиферацию кардиомиоцитов, подавляет образование рабочего миокарда и рост камер сердца.

Репрессоры транскрипции Tbx2, Tbx3, Tbx18, относятся к тому набору, который подавляет пролиферацию и подавляет формирование камер. Указанные факторы действуют как антагонисты «камерообразующих» факторов Nkx2-5, GATA4. В грубом приближении, те участки формирующегося и зрелого сердца, где наблюдается высокий уровень Tbx2, Tbx3, Tbx18 будут иметь «пейсмекерный» электрический фенотип и не будут «разрастаться» в рабочий миокард. Tbx2/Tbx3 физически конкурируют за связывание с комплексом Nkx2-

5/GATA4 с транскрипционным фактором Tbx5. Комплекс Nkx2-5/GATA4/(Tbx2, Tbx3) делает невозможным транскрипцию генов «рабочего миокарда».

Набор факторов, ингибирующих формирование камер сердца, подавляет экспрессию генов Cx40, Cx43, NaV1.5, но активирует гены щелевых контактов низкой проводимости (Cx30.2, Cx45), генов ионных каналов HCN1, HCN4 (каналов пейсмекерного тока If).

Ранее предполагалось, что клетки предшественники, формирующие миокардиальную обкладку легочных вен, исходно характеризуются высоким уровнем, «пейсмекерных» транскрипционных факторов (Tbx3/2) и отсутствием Nkx2-5. Предполагалось, что ходе эмбрионального и плодного этапов развития миокардиальная обкладка ЛВ приобретает «мозаичность» в контексте экспрессии генов и уровня белков транскрипционных факторов: среди клеток Tbx3/2⁺/Nkx2-5⁻ появляются Nkx2-5-позитивные клетки. Так как миокард легочных вен характеризуется высокой пролиферативной активностью, то к моменту созревания сердечно-сосудистой системы большинство кардиомиоцитов легочных вен становятся Tbx5/Nkx2-5 позитивными и демонстрируют, соответственно, биоэлектрические свойства рабочего миокарда.

Однако в настоящее время показано, что кардиомиоциты легочных вен происходят из предшественников второго кардиогенного поля и исходно являются Tbx5/Nkx2-5-позитивными (соответственно, Tbx18 негативными) у млекопитающих и человека (Sizarov et al., 2010). Соответственно, кардиомиоциты легочных вен с самого начала начинают экспрессировать гены и содержат белки рабочего миокарда (Cx40, Cx45, Kir2.x), и должны проявлять электрический фенотип «нормального» рабочего миокарда, лишённого какой-либо пейсмекерной или автоматической активности. Следует отметить, что кардиомиоциты ЛВ все же отличаются от миокарда трабекуляризированной части левого предсердия, поскольку не экспрессируют ген предсердного натрийуретического пептида (*Nppa*), в них отсутствует и сам ANP.

Тем не менее, известно, что именно миокард легочных вен в наибольшем количестве случаев является источником активности, которая служит причиной предсердных аритмий. Одной из таких причин является повышенная способность к различным формам автоматии. Несмотря на происхождение из мезенхимальных клеток, служащих предшественниками рабочего миокарда, по каким-то причинам, ткань легочных вен не может функционировать как «нормальный» рабочий миокард.

Существует несколько гипотез, объясняющих повышенную аритмогенную активность миокардиальной ткани легочных вен.

Изначально считалось, что миокардиальная ткань легочных вен сформирована рабочими кардиомиоцитами, среди которых встречаются пейсмекерные, аналогичные кардиомиоцитам синоатриального и атриовентрикулярного узлов (Masani, 1986; Perez-Lugones et al., 2003). То

есть, предполагалось, что механизм автоматии в ЛВ такой же, как и в пейсмейкерах сердца. Однако, в настоящее время данная гипотеза не является актуальной, так как с помощью методов, позволяющих проследить судьбу клеток в эмбриогенезе, показано, что миокарде ЛВ не может быть узловых кардиомиоцитов: клетки предшественники миокарда легочных вен не относятся к той группе, которая формирует САУ или АВ-узел.

В настоящее время предложено несколько более актуальных гипотез о повышенной аритмогенности миокарда ЛВ, которые основаны на изменении соотношения тех или иных транскрипционных факторов.

С одной стороны, было выдвинуто предположение, что в зрелых кардиомиоцитах ЛВ (то есть у взрослых животных) по каким-то причинам увеличивается экспрессия ТФ пейсмейкерного миокарда (Tbx2/3/18). В данном случае ключевую роль играет появление тока I_f , за счет которого в кардиомиоцитах ЛВ может формироваться спонтанная автоматия. Однако в современной литературе имеются противоречивые данные насчет наличия данного тока в миокарде ЛВ различных животных. В ряде работ показано, что данный ток имеется, но не играет существенной роли в обеспечении аритмогенности миокардиальной ткани легочных вен, в других работах отмечено, что в миокарде ЛВ данного тока нет (Yamamoto et al., 2006).

С другой стороны, считается, что к повышенной аритмогенности миокарда ЛВ может приводить снижение уровня ТФ, характерных для рабочего миокарда (Tbx5/20, Nkx2-5) (Mahida, 2014). В этом случае облегчение формирования спонтанной автоматии может происходить за счет снижения количества каналов тока I_{K1} , который отвечает за стабильный потенциал покоя, близкий к калиевому равновесному потенциалу, в рабочих кардиомиоцитах. Спонтанная активность, в данном случае, облегчается за счет увеличения сопротивления мембраны, уменьшения реполяризирующих токов, а также деполяризации потенциала покоя.

Наконец, было сделано предположение, что в зрелом миокарде ЛВ может происходить как увеличение экспрессии «пейсмейкерных» ТФ, так и снижение экспрессии «рабочих» ТФ. Однако, ключевым моментом является то, что миокард ЛВ является более чувствительным именно к изменению соотношения транскрипционных факторов, в сравнении с миокардом предсердий и желудочков (Moorman and Anderson, 2011). В таком случае, незначительное изменение баланса транскрипционных факторов может вызывать существенное изменение характера биоэлектрической активности ткани. Так, было показано, что даже незначительное снижение Nkx2-5 приводит к изменению электрической активности в ЛВ (Mommersteeg et al., 2007, 2009; Ye et al., 2015). Последняя гипотеза находит наибольшее экспериментальное подтверждение.

Согласно трем описанным гипотезам способность миокарда легочных вен к спонтанной активности не может быть объяснена специфическим происхождением его клеток

предшественников. Соответственно, склонность к спонтанной активности не является присущей кардиомиоцитам легочных вен изначально в эмбриональном развитии (Moorman and Anderson, 2011). Миокард легочных приобретает проаритмический фенотип вен в результате изменения уровня экспрессии и соотношения определенных транскрипционных факторов. Вегетативная нервная система может быть одним из факторов, влияющих на экспрессию транскрипционных факторов в легочных венах. Симпатический отдел ВНС может оказывать проаритмическое влияние на миокард легочных вен двояким образом: оказывая быстрое прямое действие на биоэлектрическую активность, а также оказывая долговременный «программирующий» эффект на экспрессию транскрипционных факторов и ионных каналов.

1.4. Иннервация и нервная регуляция биоэлектрической активности миокардиальной ткани легочных вен

Как известно, работа сердца регулируется вегетативным отделом нервной системы. Иннервация сердца осуществляется так называемыми, сердечными нервами, среди которых имеются как симпатические, так и парасимпатические нервные волокна. Существует большое количество исследований, в которых установлена важность нервной регуляции сердца в связи с развитием нарушений ритма сердца, и, в частности, суправентрикулярных аритмий (Linz et al., 2019; Sharifov et al., 2004).

Важными структурными элементами вегетативной иннервации в суправентрикулярном миокарде являются так называемые ганглионарные (иначе, ганглиозные) плексусы, располагающиеся в эпикардиальных жировых подушках (Sun et al., 2014). Ганглионарные плексусы содержат парасимпатические постганглионарные нейроны, а также симпатические волокна и нейроны, демонстрирующие тирозингидроксилазную активность (Rysevaite et al., 2011; Rysevaite et al., 2011(1)). Часть ганглионарных плексусов окружает устья легочных вен в левом предсердии (Batulevicius et al, 2004, 2005; Stavrakis et al., 2015). Эти плексусы у большинства млекопитающих объединены в кольцо соединительными волокнами и имеют проекции в миокардиальную обкладку вен (Zarzoso et al., 2013). Таким образом, миокардиальная обкладка имеет богатую парасимпатическую и симпатическую иннервацию. Плотность адренергических и холинергических нервных волокон в легочных венах приблизительно одинакова. Терминали как холинергических, так и адренергических немиелинизированных нервных волокон залегают между гладкомышечным слоем и миокардиальной тканью, а также трансмурально в толще миокардиальной ткани легочных вен (Tan et al., 2006; Hashizume, 1998). При этом нервные окончания прилегают достаточно тесно к поверхности кардиомиоцитов (Ludatscher, 1968). В стенке легочных вен имеются также чувствительные (свободнолежащие, лишенные варикоз) окончания висцеральных афферентных

нервов. Установлено, что по крайней мере у человека, они располагаются преимущественно субэндотелиально (Vaitkevicius et al., 2009).

Показано, что стимуляция интрамуральных нервных постганглионарных волокон в основании миокардиальных рукавов легочных вен может приводить к возникновению ФП в экспериментальных условиях (Lu et al., 2009; Patterson et al., 2005). Источники эктопической активности при этом располагаются в легочных венах (Schauerte et al., 2001). Разрушение (абляция) ганглионарных плексусов в области устьев миокардиальных рукавов ЛВ приводит к тому, что в ответ на стимуляцию нервов триггерная активность в миокардиальных рукавах и ФП не развивается (Lu et al., 2009).

Экспериментально показано, что активация парасимпатических нервов увеличивает число эпизодов фибрилляции предсердий, источником которой являются легочные вены (Liu et al., 2009). Активация парасимпатических нервов, приводит к выбросу ацетилхолина и укорочению длительности ПД, что в свою очередь вызывает снижение рефрактерности в миокарде предсердий и легочных вен. Это происходит, в первую очередь, за счет активации калиевого ацетилхолинзависимого тока ($I_{K_{ACh}}$) посредством $\beta\gamma$ -субъединицы G_i -белка (Iwasaki et al., 2011). Снижение рефрактерности в различных участках ткани увеличивает функциональную гетерогенность миокарда и облегчает возникновение контуров циркуляции возбуждения (так как уменьшается размер минимального участка ткани, в котором может «уместиться» циркулирующее возбуждение) (Sharifov et al., 2004).

Активация симпатических нервных волокон способствует возникновению разных форм эктопической активности в легочных венах. Стимуляция симпатических нервов приводит к возникновению ранних (EAD – early afterdepolarisation) или задержанных постдеполяризаций (DAD – delayed afterdepolarisation), лежащих в основе триггерной активности (Heijman et al., 2014). Показано, что, при прочих равных условиях частота возникновения постдеполяризаций выше в миокарде ЛВ, чем в предсердиях (Rudy, 2008). В ряде экспериментальных работ показано, что симпатическая стимуляция приводит к возникновению спонтанной активности (или автоматической активности) в изолированных кардиомиоцитах, либо многоклеточных препаратах легочных вен (Ehrlich et al., 2003). Симпатическая стимуляция приводит к формированию в легочных венах эктопических очагов.

Таким образом, холинергическая стимуляция, снижая рефрактерность, создает благоприятные условия для существования контуров циркуляции возбуждения. Однако, именно адренергические воздействия делают возможным инициацию циркуляции возбуждения (за счет индукции автоматической и/или триггерной активности) (Sharifov et al., 2004).

Установлено, что норадреналин вызывает сдвиг потенциала покоя, автоматическую и триггерную активность в многоклеточных препаратах легочных вен крысы посредством

активации мембранных рецепторов адреналина α - и β -типа. Автоматическая активность в легочных венах не возникает тогда, когда отсутствует деполяризация потенциала покоя. Вероятно, что нестабильность мембранного потенциала покоя и возможность его изменения в ответ на симпатические воздействия являются критически важными факторами, определяющими аритмогенность миокарда легочных вен (Doisne et al., 2009).

Каковы механизмы возникновения "эктопических фокусов" при адренергической стимуляции в миокарде предсердий и легочных вен? Несомненно, что возникновение автоматической и триггерной активности, деполяризация потенциала покоя связаны с изменением работы целого спектра ионных каналов и переносчиков, формирующих биоэлектрическую активность кардиомиоцитов.

Как указано выше, активация ВНС способствует развитию предсердных тахикардий не только за счет "быстрого" влияния на биоэлектрическую активность миокарда. Перманентная, длительная активация симпатического отдела ВНС приводит к ремоделированию миокардиальной ткани ЛВ. Одним из, вероятно, многих механизмов симпатического ремоделирования является длительная перегрузка цитоплазмы клеток кальцием. Кальций, выбрасываемый из саркоплазматического ретикулума и накапливающийся в цитоплазме при β -адренергической стимуляции, связывается с кальмодулином, и в такой форме приводит к активации протеин-фосфатазы 3 типа (PP3), известной также как кальциневрин. Данный фермент дефосфорилирует ядерные факторы, регулирующие транскрипцию генов, в результате чего изменяется экспрессия ряда белков. При хронической активации симпатических нервов и PP3 наблюдается гипертрофия миокарда и запуск, т.н. «профибротических программ» (Chen et al., 2014), что приводит к изменению тканевой организации миокарда. В частности, в легочных венах увеличивается количество соединительной ткани, что ухудшает проведение возбуждения, способствует возникновению блоков проведения и циркуляции волн возбуждения. Хроническая симпатическая активация может приводить и к т.н. «электрическому» ремоделированию, в результате чего изменяются не морфологические и гистологические, а электрофизиологические свойства миокарда. Однако, механизмы электрического ремоделирования миокарда легочных вен малоизучены. Адренергическая (симпатическая) регуляция биоэлектрической активности миокарда легочных вен остается малоизученной также в онтогенетическом аспекте. Понимание механизмов адренергического влияния на биоэлектрические свойства миокарда невозможно без подробного рассмотрения известных мембранных и внутриклеточных элементов симпатической регуляции, а также особенностей формирования самой симпатической иннервации сердца в ходе онтогенеза.

1.5. Рецепторные механизмы адренергической регуляции

1.5.1. Общие сведения о структуре адренорецепторов, их свойствах и основных внутриклеточных механизмах передачи сигнала

Симпатические эффекты в сердце реализуются посредством высвобождения постганглионарными нервными окончаниями нейромедиатора норадреналина, и нескольких котрансмиттеров. Норадреналин является эндогенным агонистом нескольких мембранных рецепторов (адренорецепторов). Геном человека включает в себя 9 различных генов адренорецепторов, которые сгруппированы в три семейства: гены α_1 -, α_2 -, β -адренорецепторов, по три члена в каждой группе (α_1A -, α_1B -, α_1D -; α_2A -, α_2B -, α_2C -; β_1 -, β_2 -, β_3 -адренорецепторы) (Bylund et al., 1994). Все гены кодируют функциональные рецепторы.

Адренорецепторы относятся к классу G-белок-связанных мембранных рецепторов (GPCRs), экспрессируются в клетках большинства типов тканей человека. Структурная организация адренорецепторов хорошо изучена и описана в литературе. Молекулы рецепторов представляют собой трансмембранные белки с N-концевым внеклеточным и C-концевым внутриклеточным доменами. Все адренорецепторы содержат по семь трансмембранных доменов. Специфичность связывания агонистов определяется различиями в строении пятого и шестого трансмембранных доменов. Аминокислотная последовательность пятого и седьмого доменов определяет сопряжение рецепторов с G-белками, чем и определяются эффекты при их активации (Latek et al., 2012).

Эндогенными агонистами адренорецепторов у млекопитающих, включая человека, являются катехоламины: адреналин и норадреналин. Адреналин в основном продуцируется мозговым веществом надпочечников. Норадреналин является медиатором центральной нервной системы, а также медиатором симпатического отдела вегетативной нервной системы.

α_1 -адренорецепторы

α_1 -адренорецепторы экспрессируются во многих тканях и органах, включая гладкие мышцы, печень, различные железы, центральную нервную систему, а также сердце. Кроме того, α_1 -адренорецепторы широко представлены на пресинаптической мембране в различных отделах головного мозга, где они регулируют высвобождение других медиаторов (Piascik et al., 2001). α_1 -адренорецепторы играют центральную роль в регуляции кровяного давления, тонуса сосудов (Badino et al., 2005).

Все три подтипа α_1 -адренорецепторов (α_{1A} -, α_{1B} -, α_{1D} -) связаны с $G_{q/11}$ -белком. В настоящее время есть сведения, что в сердце α_{1B} -адренорецепторы могут быть также ассоциированы с G_i -белком (Snabaitis et al., 2005). Внутриклеточные механизмы передачи сигнала при активации мембранных α_1 -адренорецепторов хорошо изучены. Согласно общей классической схеме, $G_{q/11}$ -субъединица активированного адренорецептора связывается с

фосфолипазой C (PLC- β) и стимулирует ее, что ведет к гидролизу фосфолипидного компонента клеточной мембраны фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (PIP₂) на инозитолтрифосфат (IP₃) и диацилглицерол (DAG), которые известны как вторичные посредники.

IP₃ связывается со специфическими рецепторами на мембране саркоплазматического ретикулума, так называемыми рецепторами инозитолтрифосфата (IP₃R). Активация IP₃R ведет к выбросу кальция из СПР и увеличению его уровня в цитоплазме (Ahles et al, 2014; Pierpont et al., 1985). Известно, что IP₃R, в основном, содержатся в гладкомышечных клетках. Данные об IP₃R в сердце противоречивы. Однако в некоторых исследованиях показано, что IP₃R локализуются на мембране СПР в предсердных и желудочковых кардиомиоцитах млекопитающих (Domeier et al., 2008; Lipp et al., 2000; Yamda et al., 2001). IP₃R обнаружены в кардиомиоцитах легочных вен крыс (Okamoto et al., 2012).

DAG, как вторичный посредник, имеет ряд мишеней, однако в кардиомиоцитах основной его мишенью является семейство DAG-зависимых протеинкиназ C (PKC). Протеинкиназа C относится к классу серин/треониновых киназ, экспрессируется во многих тканях и органах млекопитающих. Выделяют три группы PKC: кальцийзависимые, активируемые DAG и фосфатидилсерином (PS); кальций-независимые и активируемые DAG и PS; атипичные, независимые от кальция и DAG, но активируемые PS. Показано, что в сердце имеются все три группы PKC (Puc  at et al., 1996). Изоферменты PKC могут локализоваться в клетке в различных компартментах в непосредственной близости от их субстратов. Локализацию PKC обеспечивают белки семейства RACKs (Receptors for activated C kinase), которые заякоривают молекулу PKC в определенном компартменте клетки (Mochly-Rosen, 1995).

Мишенями PKC являются множество ионных каналов и транспортеров. Действие PKC не ограничивается только быстрыми (обусловленными фосфорилированием субстратов) эффектами. PKC может определять отставленные эффекты в сердце, в частности, регулировать рост и пролиферацию миоцитов, влияя на транскрипцию генов (Steinberg, 2012).

α_2 -адренорецепторы

α_2 -адренорецепторы экспрессируются во многих тканях и органах. Данный подтип рецепторов участвует в регуляции множества физиологических процессов. (Ahles et al., 2014). Наиболее известной физиологической функцией данного подтипа адренорецепторов является ингибирование выброса норадреналина за счет отрицательной обратной связи, в случае, когда α_2 -адренорецепторы расположены на пресинаптической терминали (Levick, 2000).

Также α_2 -адренорецепторы принимают участие в регуляции тонуса сосудов. Рецепторы присутствуют на мембранах гладкомышечных клеток; их активация приводит к вазоконстрикции (Badino et al., 2005).

Все три подтипа α_2 -адренорецепторов (α_{2A} -, α_{2B} -, α_{2C} -) связаны с G_i -белком. Активированная G_{α_i} -субъединица ингибирует работу аденилатциклазы (АЦ), в следствие чего снижается цитоплазматический уровень цАМФ и, соответственно, уровень активации протеинкиназы А (РКА). Каталитическая субъединица РКА фосфорилирует различные белки, включая ферменты, ионные каналы и рецепторы.

В литературе имеются противоречивые данные относительно локализации α_2 -адренорецепторов в сердце. Известно, что пресинаптические α_2 -адренорецепторы присутствуют в симпатических нервных окончаниях, иннервирующих сердечную мышцу. Преобладает точка зрения, что в мембране кардиомиоцитов млекопитающих данный тип адренорецепторов не экспрессируется (Badino et al., 2005). Однако, в некоторых исследованиях говорится о наличии всех трех подтипов α_2 -адренорецепторов в эндокарде, но количество этих рецепторов примерно в 30 раз меньше, чем α_1 -адренорецепторов (Berkowitz et al., 1994). Таким образом, функциональные исследования сердечных изоформ α_2 -адренорецепторов сфокусированы в основном на пресинаптическом ингибировании выброса норадреналина из симпатических терминалей (Likungu et al., 1996). Вероятно, α_2 -адренорецепторы играют незначительную роль в прямой регуляции электрической и сократительной активности кардиомиоцитов, поэтому особенности внутриклеточных каскадов данных рецепторов, далее рассмотрены не будут.

β -адренорецепторы

Все три подтипа β -адренорецепторов присутствуют в большом количестве тканей. Эндогенным агонистом β -адренорецепторов, помимо норадреналина и адреналина, является дофамин. Адреналин активирует β_2 -адренорецепторы в большей степени, чем норадреналин. Все подтипы β -адренорецепторов связаны с G_s -белком. Их активация приводит к диссоциации субъединиц G-белка, при этом $G_{s\alpha}$ -субъединица активирует АЦ и увеличивает образование цАМФ. Последний активирует РКА за счет диссоциации молекулы на регуляторную и каталитическую субъединицы.

В настоящее время показано, что β_2 -адренорецепторы могут быть связаны не только с G_s -, но и с G_i -белком. Механизм, лежащий в основе способности β_2 -адренорецепторов связывать различные типы G-белков, не вполне ясен (Ahles et al., 2014). В литературе присутствуют данные о возможности переключения β_2 -адренорецептора с G_s - на G_i -белок при фосфорилировании данного типа рецепторов РКА (Daaka et al., 1997). Переключение β_2 -адренорецепторов на ингибиторный подтип G-белка происходит при длительной адреностимуляции (Lymperopoulos, 2013). Возможно, что такое переключение играет кардиопротекторную, а точнее, антиапоптотическую роль.

1.5.2. Дополнительные внутриклеточные сигнальные каскады, сопряженные с адренорецепторами

βγ-зависимые эффекты адренорецепторов

Как известно, гетеротримерный G-белок состоит из трех субъединиц: α, β и γ. При активации рецептора происходит гидролиз G-белка на α- и βγ-субъединицу. α-субъединица, в соответствии с семейством G-белка, может относиться к 4 типам: $G\alpha_s$, $G\alpha_i/G\alpha_o$, $G\alpha_q/G\alpha_{11}$, и $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$. А βγ-составляющая комплекса у млекопитающих может формироваться из 7 типов β-субъединиц и 12 типов γ-субъединиц (Wettschureck et al., 2005).

Первоначально считалось, что основная роль βγ-субъединицы состоит только в инактивации α-субъединицы (Hamm, 1998). Однако, в большинстве случаев, и βγ-субъединица вносит существенный вклад в регуляцию внутриклеточных каскадов и мембранных белков. В настоящее время известно, что βγ-субъединица может напрямую воздействовать на различные ионные каналы. Например, мишенью действия βγ-субъединицы являются калиевые каналы Kir3.x, которые проводят ток I_{KACh} . βγ-субъединица связывается с N- и C-концами внутриклеточных участков канала и напрямую активирует его. Также βγ-субъединица влияет на потенциалзависимые кальциевые каналы L-типа ($I_{Ca,L}$), некоторые типы аденилатциклазы (активирует АЦ-II, -IV, и -VII, однако ингибирует АЦ-I) (Taussig et al., 1994) и фосфолипазы C (PLCβ2 и -β3) (Dupré et al., 2009; Zhang et al., 1996). $G_{\beta\gamma}$ -субъединица также активирует некоторые типы фосфоинозитид-3-киназы (PI₃K). (Hamm, 1998; Tang and Downes, 1997) и MAPKs (митоген-активируемые протеинкиназы).

Ядерная локализация α₁-адренорецепторов

Представления о функционировании адренорецепторов сформированы на том несомненном факте, что молекулы рецепторов располагаются в плазматической мембране клетки. Однако, в целом ряде исследований показано, что α₁-адренорецепторы могут быть встроены в ядерную мембрану в различных типах клеток (нейроны, гепатоциты, кардиомиоциты). Было показано, что до 80% α₁-адренорецепторов в кардиомиоцитах, по меньшей мере у мышей имеют ядерную локализацию: они располагаются на внутренней ядерной мембране и их C-конец обращен в сторону нуклеоплазмы (O'Connell et al., 2014; Wu et al., 2014). Ядерная локализация α₁-адренорецепторов была подтверждена с помощью мембран-проникающего флуоресцентного аналога антагониста α₁-адренорецепторов празозина (BODIPY-празозин) (Wright et al., 2008). Таким образом, при активации данного типа рецепторов сигнал распространяется в цитоплазму не со стороны плазматической мембраны, а со стороны мембраны ядра, то есть «изнутри-наружу» (inside-out).

Было замечено, что при действии α_1 -агонистов на сердечную ткань, латентный период проявления их действия больше, чем при действии, например, β -агонистов. В отличие от α -адренорецепторов, β -адренорецепторы локализованы исключительно в плазматической мембране кардиомиоцитов. Возможно, что α_1 -агонисту необходимо большее время для достижения рецептора, располагающегося в ядерной мембране. Кроме того, ядерную локализацию α_1 -адренорецепторов подтверждают эксперименты, проведенные на изолированных ярах: при действии фенилэфрина в них активируется PKC (Wu and O'Connell, 2014).

Ядерная локализация α_1 -адренорецепторов требует переноса агониста из внеклеточной среды в область ядерной мембраны. В настоящее время известно о существовании молекулы, называемой «вненейрональный транспортер моноаминов» или «транспортер органических катионов-3» (extraneuronal monoamine transporter/organic cation transporter-3 (EMT/OCT3)) (Schömig et al., 2006). Основной тканью, экспрессирующей EMT/OCT3, является миокард - EMT/OCT3 присутствует и в плазматической, и в ядерной мембране кардиомиоцитов.

Было показано, что нокаутированные мыши, у которых транспортер EMT/OCT3 не был функциональным, по фенотипическим признакам были похожи на мышей, нокаутированных по гену α_1 -адренорецепторов (Dahl et al., 2018; Zwart et al., 2001).

В случае ядерного расположения α_1 -адренорецепторов, их взаимодействие с лигандом должно приводить к активации неизученных "неклассических" схем передачи сигнала. Существует мнение, что при ядерной локализации рецепторов активируется PLC ϵ , которая помимо фосфоинозитол-4,5-бифосфат регулирует и малые G-белки (Rho, Ras, Rap), что приводит к активации каскада MAPK-киназы (Lopez et al., 2001).

Кроме того, в настоящее время показано, что большинство участников каскада, запускаемого активацией α_1 -адренорецепторов, также имеют ядерную локализацию: PLC β , PKC α , PKC δ , PKC ϵ найдены в ядре, также показано, что в состав ядерной мембраны водит PIP2 (Dahl et al., 2018; Wu and O'Connell, 2014). Однако до конца не выяснено, как происходит передача сигнала из ядра в цитоплазму и как происходит возможная регуляция транскрипции генов в ядре.

Функция α_1 -адренорецепторов заключается в кардиопротекторных свойствах, включая адаптивную/физиологическую гипертрофию, защиту от гибели клеток, положительную инотропию (O'Connell et al., 2014).

Известно, что регуляция транскрипции происходит в том числе и за счет ацетилирования/деацетилирования гистонов. Ацетилирование гистонов с помощью гистонацетилтрансфераз способствует транскрипции, тогда как деацетилирование гистонов с помощью гистондеацетилаз (HDAC) приводит к репрессии транскрипции (Vega et al., 2004).

Было показано, что при активации ядерных α_1 -адренорецепторов задействована HDAC5 – гистондеацетилаза II типа, которая относится к репрессорам гипертрофии сердца. Антигипертрофическая активность фермента HDAC5 нейтрализуется путем фосфорилирования специфических сериновых остатков. Фосфорилирование HDAC5 приводит к последующему ее связыванию с белком-шапероном 14-3-3 и экспорту данного комплекса из ядра (Grozingер and Schreiber, 2000).

Предполагается, что при активации α_1 -адренорецепторов, локализованных в ядерной мембране, запускается фосфатидил-инозитольный каскад. С одной стороны, через IP3-рецепторы происходит выброс кальция из перинуклеарного пространства в саркоплазму, а с другой, происходит активация PKC. Увеличение уровня кальция активирует CaMK, а PKC активирует PKD, и далее эти ферменты могут фосфорилировать HDAC5 (Vega et al., 2004; Wu and O'Connell, 2014). Таким образом, можно предположить, что инактивация и экспорт из ядра HDAC5 является ключевым регулирующим аспектом в развитии физиологической гипертрофии сердца.

Также предполагается, что белок-шаперон 14-3-3 может участвовать в передаче сигнала из ядра в цитоплазму, экспортируя PKC, где данный фермент будет работает по классической схеме, фосфорилируя соответствующие каналы и переносчики (Wu and O'Connell, 2014).

1.5.3. Адренорецепторы в сердце

α_1 -адренорецепторы

Литературные данные противоречивы в отношении экспрессии разных подтипов α_1 -адренорецепторов в сердце. Так показано, что мРНК α_{1A} , α_{1B} , и α_{1D} -подтипов адренорецепторов обнаруживается в сердечной ткани. Однако, исследования, проведенные на нокаутных животных, показали, что в кардиомиоцитах экспрессируются только α_{1A} - и α_{1B} -адренорецепторы. Скорее всего, α_{1D} -адренорецепторы присутствуют только в гладкомышечных клетках сосудов коронарной системы сердца (Chalothorn et al., 2003). У человека и многих других млекопитающих, включая мышей, морских свинок, кроликов, свиней и коров, наблюдается примерно одинаковый уровень экспрессии α_1 -адренорецепторов (примерно 12 фмоль/мг белка) и только у крыс уровень данного типа адренорецепторов в сердце оказался выше в 10 раз (около 114 фмоль/мг), чем у остальных животных (O'Connell et al., 2014).

Регуляция биоэлектрической активности сердца, обусловленная α_1 -адренорецепторами, связана, в основном, с действием активированных изоформ PKC на мембранные ионные каналы и переносчики, и рассмотрена ниже.

β -адренорецепторы

β –адренорецепторы присутствуют во всех отделах сердца – узлах автоматии (синусном и атриовентрикулярном), проводящей системе, предсердном и желудочковом рабочем миокарде. Основными β -адренорецепторами сердца являются рецепторы первого подтипа, хотя в кардиомиоцитах имеются и β_2 - и β_3 -адренорецепторы. Активация β_1 -адренорецепторов и β_2 -адренорецепторов приводит к увеличению частоты сердечных сокращений, сократимости миокарда, минутного объема кровообращения (Stadel, 1991). Активация β_1 -адренорецепторов также приводит к увеличению скорости расслабления желудочкового миокарда, скорости проведения возбуждения в атриовентрикулярном узле и рабочем миокарде (Colucci et al., 1986). В отличие, от β_1 -адренорецепторов, опосредующих быстрые эффекты в сердце, β_2 -рецепторы связывают с долгосрочной регуляцией миокарда (Brodde et al., 1999).

Предполагается, что β_3 -адренорецепторы вносят свой вклад в регуляцию сердечной деятельности только при патологических состояниях. Активация β_3 -адренорецепторов в сердце снижает сократимость желудочков за счет образования оксида азота (Brodde et al., 1999).

В предсердном миокарде уровень экспрессии β_1 -адренорецепторов составляет 75-80% от общего числа β -адренорецепторов. Плотность β_2 -подтипа адренорецепторов составляет 15-18% и, соответственно, 2-3% приходится на β_3 -адренорецепторы. В желудочковом миокарде количество β_2 -адренорецепторов незначительно по сравнению с β_1 -адренорецепторами. По этой причине эффекты β_2 -адренорецепторов в миокарде желудочка являются второстепенными по отношению к эффектам, опосредуемым β_1 -адренорецепторами (Xiao et al., 2006).

β_1 -адренорецептор-зависимые эффекты в сердце опосредованы действием активированной РКА, а также $\beta\gamma$ -субъединицы на множество мембранных ионных каналов и транспортеров и рассмотрены ниже.

1.6. Конфигурация ПД и потенциал покоя при адренергических воздействиях в рабочем миокарде млекопитающих

Известно, что ПД характеризуется такими параметрами как скорость нарастания фронта, длительность на определенном уровне реполяризации – как правило это 30, 50 или 90% реполяризации от наиболее положительного значения мембранного потенциала. В литературе можно встретить данные, касающиеся изменения всех этих параметров при адренергических воздействиях в различных отделах сердца (пейсмекерном миокарде, предсердном миокарде, волокнах Пуркинье, желудочковом миокарде) у разных видов животных (мышей, крыс, морских свинок, кошек, собак и пр.). При сопоставлении литературных данных становится очевидно, что эффекты адренергической стимуляции сильно зависят от условий эксперимента, являются ткане- и видоспецифичными. Например, в желудочковых кардиомиоцитах здорового человека адреналин не оказывает значимого влияния на ДПД₉₀ (Workman, 2010), однако, в

желудочковых кардиомиоцитах собаки аппликация адреналина приводит к ускорению конечной фазы реполяризации и соответственно уменьшению длительности ПД (Stengl et al., 2006). Длительность ПД в предсердном миокарде собаки увеличивается при действии норадреналина, тогда как у морской свинки и крысы уменьшается (Workman, 2010).

Известно, что при действии адреналина или норадреналина происходит активация как α -так и β -адренорецепторов, которые, через свои внутриклеточные сигнальные каскады могут приводить к разнонаправленному изменению большого числа ионных токов. Итоговое изменение ПД зависит от типа адренорецепторов, которые преимущественно активированы. Экспериментальных работ, направленных на выяснение влияния β -адренергической стимуляции на биоэлектрическую активность миокарда, принципиально больше, чем таковых, связанных с активацией α -адренорецепторов.

В целом, в нормальных физиологических условиях изменение конфигурации ПД при адренергической стимуляции связано со следующими явлениями, имеющими место в сердце *in vivo*: первое – это увеличение частоты сокращений, второе – увеличение силы сокращения. Увеличение частоты сокращений определяет необходимость снижения длительности ПД для поддержания нормальной биоэлектрической активности (осуществляется за счет β -адренергической активации ряда реполяризующих токов). Одной из причин увеличения силы сокращения сердца при адренергической стимуляции является усиление входящего кальциевого тока L-типа, приводящее к возрастанию концентрации цитоплазматического триггерного кальция. Усиление данного тока, может приводить к увеличению длительности ПД на уровне 30 или 50% реполяризации. Эти эффекты опосредованы, в основном, β_1 -адренорецепторами.

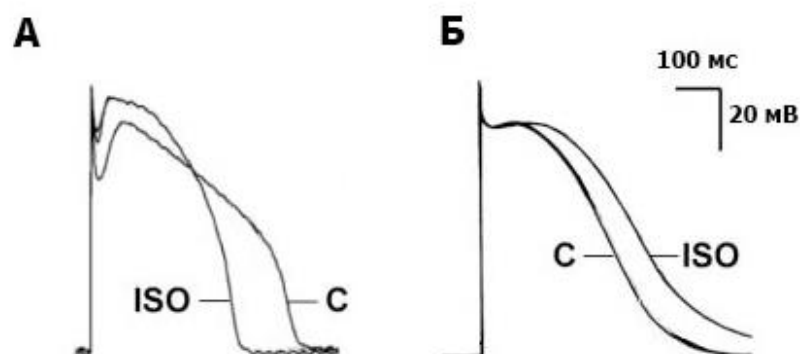


Рис. 1.1. Изменение конфигурации ПД в желудочковом миокарде при β -адренергической стимуляции у собаки (А) и у человека (Б). ISO – изопротеренол (1 мкМ), С – контроль. Приведено с изменениями по Workman, 2010.

В предсердном миокарде ток I_{CaL} выражен слабее, чем в желудочковых кардиомиоцитах. Поэтому при активации β -адренорецепторов предсердий преимущественно наблюдается укорочение ПД. В рабочем миокарде желудочков ток I_{CaL} выражен в большей степени, чем в предсердиях, поэтому при активации β -адренорецепторов, может наблюдаться увеличение длительности ПД (Рис.1.1.).

Селективная активация α -адренорецепторов приводит к увеличению ДПД₉₀ в различных отделах сердца и у разных видов млекопитающих (Рис.1.2.). Показано, что норадреналин в желудочковых кардиомиоцитах крысы в присутствии блокатора β -адренорецепторов вызывает увеличение ДПД₉₀. Действие фенилэфрина – селективного агониста α_1 -адренорецепторов – было аналогичным (Vogel, 1989). Также было показано, что фенилэфрин вызывает увеличение ДПД₉₀ в кардиомиоцитах волокон Пуркинье собаки (Robinson et al., 2000).

В предсердиях эффект, вызываемый α -адреностимуляцией, может быть обусловлен подавлением токов, специфичных для предсердий, например, I_{to} (транзиторный калиевый ток). В желудочках α -агонисты подавляют калиевые токи задержанного выпрямления, и, в частности у собаки, ток I_{Ks} . У крыс при активации α -адренорецепторов в желудочковых кардиомиоцитах может также происходить увеличение тока I_{CaL} (Robinson et al, 2000).

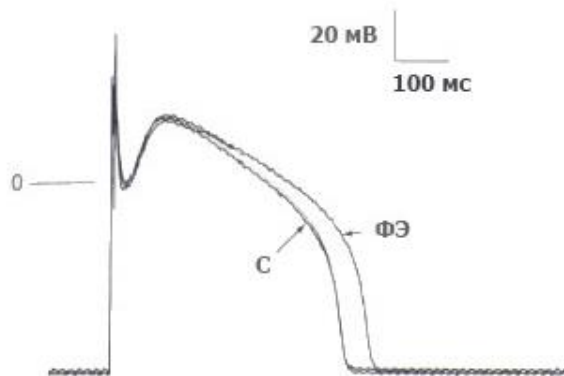


Рис. 1.2. Изменение конфигурации ПД в миокарде желудочка собаки при α -адренергической стимуляции. ФЭ – фенилэфрин (0,1 мкМ), С – контроль. Приведено с изменениями по Workman, 2010.

В рабочем миокарде желудочков и предсердий β -адренергическая стимуляция приводит к гиперполяризации ПП. Этот эффект наблюдается как при ритмически возбуждаемом, так и в покое миокарде (Tamargo, 2004). В литературе имеется крайне мало данных, касающихся изменения ПП в предсердном и желудочковом миокарде при α -адренергической стимуляции, так как предполагается, что α -адренергическая стимуляция не оказывает существенного влияния на уровень потенциала покоя.

1.7. Пуриновые соединения как комедиаторы симпатической нейротрансмиссии и их роль в регуляции биоэлектрической активности миокарда

Как указано выше, симпатические эффекты обусловлены высвобождением из нервных окончаний не только норадреналина – основного нейромедиатора, но и комедиаторов (котрансмиттеров), к которым относятся такие пуриновые соединения, как АТФ, никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺) и диаденозиновые полифосфаты. Содержание этих соединений в пресинаптических везикулах, высвобождение из пресинаптических окончаний вместе с катехоламинами показано в большом количестве исследований (Burnstock, 1990; Miras-Portugal et al., 1998; Tokunaga, 1995; Todorov et al., 1996). Показано что пуриновые комедиаторы симпатической нейротрансмиссии играют важную роль в регуляции тонуса гладкомышечных клеток (Burnstock, 2017; Burnstock and Ralevic, 2014), а также могут оказывать влияние на биоэлектрическую активность миокарда (Pustovit et al., 2019; Пустовит К.Б., Иванова А.Д., 2018). В следующих разделах будут рассмотрены некоторые рецепторные и внутриклеточные механизмы действия пуриновых комедиаторов, а также их известные эффекты в сердце.

Следует отметить, что в симпатической нейротрансмиссии помимо пуриновых, принимают участие пептидные комедиаторы, в частности, нейропептид Y - NPY (Nozdrachev and Masliukov, 2011). Однако, изучение роли NPY в регуляции активности миокарда легочных вен выходит за рамки данной работы, поэтому, эффекты, рецепторные и внутриклеточные механизмы действия этого пептидного медиатора не рассмотрены.

1.7.1 Мембранные рецепторы пуриновых соединений

Пуриновые соединения имеют свои собственные мембранные рецепторы, через которые реализуются эффекты данных соединений. Рецепторы пуриновых соединений или Р-рецепторы обнаружены в ЦНС, сердце, гладкомышечных клетках, семенниках, лимфоцитах, тимоцитах, тромбоцитах, пре- и постсинаптических мембранах нейронов и других клетках и тканях организма.

Согласно современной классификации пуринорецепторы делят на три основных класса: P1, P2X-рецепторы и P2Y-рецепторы (Boarder et al., 1994; Burnstock, 1976; Dalziel et al., 1994; Khakh., 2001), в соответствии с их разной чувствительностью к аденозину и АТФ (Burnstock, 1976, 1985, 1996).

P1-рецепторы с большим сродством связывают аденозин и слабо связывают АТФ, их также называют «аденозиновыми» пуринорецепторами. Выделяют четыре подтипа P1-рецепторов: A₁, A_{2A}, A_{2B} и A₃, все они присутствуют в сердце, как в рабочих кардиомиоцитах, так и в клетках синоатриального и атриовентрикулярного узлов автоматии, а также в

проводящей системе сердца. Различные подтипы P1-пуринорецепторов связаны с различными G белками (G_i , G_q , G_s) и при их активации запускаются соответствующие внутриклеточные каскады (см. раздел 1.5.1).

P2X-рецепторы представляют собой лиганд-активируемые трансмембранные неселективные каналы, которые пропускают ионы Na^+ , K^+ и Ca^{2+} . При связывании лиганда с P2X рецепторами возникает входящий неселективный катионный ток, который приводит к деполяризации мембранного потенциала и увеличению внутриклеточной концентрации кальция (North, 2002).

P2X рецепторы расположены в мембране кардиомиоцитов и обнаруживаются в различных отделах сердца (Hansen et al., 1999). Было показано, что в предсердиях крысы экспрессируются преимущественно P2X₁, P2X₂, P2X₄-пуринорецепторы, а в желудочках – P2X₄-рецепторы (Vassort, 2001). Агонистом P2X рецепторов является АТФ, однако есть предположение, что что НАД⁺ тоже может быть агонистом для некоторых P2X-рецепторов (Gerth et al., 2004).

Среди P2Y-рецепторов выделяют 8 подтипов (Von Kügelgen and Hoffmann, 2016), 7 из которых присутствуют в сердце млекопитающих как в рабочих кардиомиоцитах, так и в клетках проводящей системы сердца (P2Y₁, -2, -4, -6, -11, -13 и P2Y₁₄ (Kügelgen and Hoffmann, 2015; Vassort, 2001)).

P2Y рецепторы разделяют на два подсемейства (Abbracchio et al., 2006). К первому подсемейству относятся P2Y₁ -2 -4 -6 -11, они связаны с $G_{q/11}$ белками и при их активации запускается фосфотидилинозитольный сигнальный каскад, ко второму подсемейству относятся P2Y₁₂, -13, -14 рецепторы, которые связаны с $G_{i/o}$ (Briones et al., 2002). Помимо АТФ, агонистами P2Y адренорецепторов могут быть УДФ, диаденозиновые полифосфаты и НАД⁺. Диаденозинтетрафосфат (ДАТФ) и диаденозинпентафосфат (ДАПФ) являются агонистами преимущественно P2Y₄-рецепторов (Abbracchio et al., 2006), а НАД⁺ - P2Y₁ и P2Y₁₁ (Mutafova-Yambolieva et al., 2007).

1.7.2. Эффекты внеклеточного АТФ в миокарде млекопитающих

Первым пуриновым соединением, которое было описано как симпатический комедиатор, был АТФ (Burnstock, 1976). В настоящее время действие АТФ хорошо изучено, в особенности в гладкомышечных органах (Burnstock et al., 1990), однако АТФ также может регулировать и работу сердца. АТФ содержится в симпатических и парасимпатических нервных окончаниях сердца и высвобождается вместе с норадреналином или ацетилхолином (Boehm et al., 2002; Fredholm et al., 1982; Mihaylova-Todorova et al., 2001).

Эффекты АТФ на работу сердца могут быть связаны не только с его прямым действием (посредством активации P2-пуринорецепторов), но и с действием аденозина, образующегося при расщеплении АТФ, на P1- пуринорецепторы. При самостоятельном действии АТФ может вызывать как положительные, так и отрицательные хронотропный, инотропный дромотропный эффекты (Barnard et al., 1994; Belhassen et al., 1984). Так, было показано, что в низких концентрациях АТФ приводит к увеличению ритма и сократимости сердца (Burnstock, 2006), а в высоких концентрациях вызывает снижение автоматической активности, замедление ритма в САУ и АВУ (Szentmoklosi et al, 1980). Эффекты АТФ в значительной степени видоспецифичны, так как миокард разных млекопитающих различается набором и соотношением экспрессируемых рецепторов P2X и P2Y-типа.

АТФ обладает кардиопротекторными и антиишемическими свойствами, однако, скорее всего, это связано с действием аденозина, образующегося при гидролизе АТФ, а не с прямым действием АТФ (Neumann et al., 1999; Елисеев, 1987).

Помимо эффектов АТФ, опосредованных активацией пуринорецепторов, расположенных в мембране кардиомиоцитов, и описанных выше, есть данные об участии АТФ в регуляции высвобождения НА из симпатических терминалей. АТФ, действуя на P2Y- и P2X-рецепторы, расположенные на симпатических окончаниях, вызывает снижение секреции норадреналина (Sperla et al, 2000).

1.7.3. Эффекты внеклеточного НАД⁺ в миокарде млекопитающих

В современной литературе существует множество исследований, где НАД⁺ рассматривается в качестве полноценного, преимущественно тормозного, нейромедиатора, способного регулировать работу гладкомышечных органов и сосудов (Mutafova-Yambolieva et al., 2007; Mutafova-yambolieva and Durnin, 2014). Показано, что НАД⁺ выделяется при стимуляции вегетативных нервов сосудов целом ряде тканей и органов (Smyth et al., 2004), вызывает в них физиологические эффекты, активируя пуриновые P2Y-рецепторы различных подтипов. Например, НАД⁺, выделяющийся из симпатических нервных окончаний вызывает расширение сосудов (Ralevic et al., 1995) и расслабляет гладкие мышцы кишечника (Mutafova-Yambolieva et al., 2007). Также НАД⁺ участвует в регуляции адренергического ответа в гладкомышечных органах: при высокой частоте стимуляции симпатических нервов, регулирующих работу кровеносных сосудов НАД⁺ выделяется из терминалей вместе с норадреналином и АТФ и тем самым ограничивает чрезмерное возбуждение гладкомышечных клеток (Smyth et al., 2006). Однако только в последнее время появились исследования, направленные на изучение действия НАД⁺ на различные отделы сердца. Было показано, что НАД⁺ вызывает снижение длительности ПД как в рабочем, так и в пейсмекерном миокарде

уменьшает частоту спонтанных ПД и скорость медленной диастолической деполяризации в синоатриальном узле (Пустовит и др., 2015). Внеклеточный НАД⁺ способен ограничивать эффекты симпатической стимуляции в сердце, причем, в большей степени, чем АТФ (Pustovit et al., 2019).

1.7.4. Эффекты внеклеточного ДАТФ в миокарде млекопитающих

Диадензинтетрафосфат (ДАТФ) — это соединение, которое относится к группе динуклеотидполифосфатов. В молекуле ДАТФ два аденина соединены мостиком из четырех остатков фосфорной кислоты. Диаденозиновые полифосфаты, и, в частности, ДАТФ, являются эндогенно синтезируемыми молекулами. ДАТФ является продуктом работ специальной ферментной системы при утилизации АТФ. Установлено, что существует несколько специфических регулируемых механизмов высвобождения диаденозиновых полифосфатов (Pintor et al., 1992; Pintor and Miras-Portugal, 1995; Rodriguez del Castillo et al., 1988). Диаденозиновые полифосфаты, включая ДАТФ, содержатся в синаптических везикулах, и данные соединения выбрасываются при стимуляции из нервных окончаний в синаптическую щель, после чего воздействуют на пресинаптические мембранные рецепторы (Mutafova-yambolieva and Durnin, 2014; Pereira et al., 2000).

Внеклеточный ДАТФ, как и АТФ, оказывают существенное влияние на работу сердечно-сосудистой системы (Flores et al., 1999). Впервые их роль как комедиаторов симпатической нейротрансмиссии была описана на примере хромаффинных клеток надпочечников (Rodriguez del Castillo et al., 1988). Показано, что диаденозиновые полифосфаты вызывают расширение сосудов при действии в физиологических концентрациях. Также показана их способность вызывать вазодилатацию коронарных артерий у крыс, морских свинок, кроликов и собак (Flores et al., 1999; Sumiyoshi et al., 1997).

Помимо действия на коронарные артерии диаденозиновые полифосфаты оказывают влияние на рабочие кардиомиоциты, однако их действие видоспецифично. Так, было показано, что ДАТФ уменьшает сократимость изолированных папиллярных мышц морской свинки (Stavrou et al., 2001). Также показано, что у морских свинок и крыс ДАТФ вызывает снижение сократимости миокарда и цитоплазматической концентрации кальция в кардиомиоцитах, однако у человека ДАТФ оказывает положительное инотропное действие (Vahlensiek, et al., 1999). Предполагается, что эффекты ДАТФ опосредованы активацией P₂-рецепторов (Pustovit et al., 2015).

1.8. Свойства некоторых ионных каналов и переносчиков, участвующих в регуляции потенциала покоя в кардиомиоцитах, и их адренергическая регуляция

Цель данной работы заключается в исследовании механизмов адренергической регуляции ПП, а точнее сдвига ПП, приводящего к формированию в миокарде легочных вен спонтанной (автоматической) активности при адренергической стимуляции. Биоэлектрическая активность в предсердном миокарде определяется совокупностью более чем 20 ионных токов, которые активны в ту или иную фазу сердечного цикла. Только часть из всех известных ионных токов, ионных проводимостей определяют уровень мембранного потенциала в покое. Однако не вызывает сомнений, что функционирование всех ионных механизмов, задействованных в ходе сердечного цикла, тесно взаимосвязано. Поэтому сложно выделить группу токов, описание свойств которых было бы актуально в связи с данной работой.

Как отмечено выше, для миокарда ЛВ крысы характерен нестабильный уровень мембранного потенциала. Далее будут рассмотрены материалы, касающиеся свойств и особенностей регуляции ионных каналов, обменников и транспортеров, которые, согласно имеющимся литературным данным, могут вносить существенный вклад в поддержание и регуляцию ПП, инициацию спонтанной активности при активации внутриклеточных сигнальных каскадов, связанных с адренорецепторами.

1.8.1. Na/K-АТФаза

Физиологическая роль Na/K-АТФазы (NKA) заключается в формировании трансмембранного градиента ионов натрия и калия, что имеет решающее значение для поддержания ПП (Fuller et al., 2013).

Na/K-АТФаза является мембранным ферментом. Молекула Na/K-АТФазы состоит из двух субъединиц: α и β , первая из которых является каталитическим центром, содержит сайты связывания ионов Na^+ и K^+ , АТФ. Из четырех известных изоформ Na/K-АТФазы (α_{1-4}) в сердце были обнаружены первые три. Уровень экспрессии данных изоформ в миокарде разных видов млекопитающих различен. Так, у грызунов преобладающими являются α_1 - и α_2 -изоформы (Hensley et al., 1992), а в сердце человека наиболее распространенной является α_1 -изоформа (62% от общего числа молекул NKA), уровень экспрессии α_2 составляет 15%, α_3 - 23%.

В ходе одного цикла NKA осуществляет перенос 3 ионов Na^+ во внеклеточную среду в обмен на 2 иона K^+ , поступающих в цитоплазму. Таким образом, за один цикл работы NKA из цитоплазмы выводится один положительный заряд, следовательно, NKA генерирует гиперполяризующий ток (ток I_p). Вклад Na/K-АТФазы в значение мембранного потенциала составляет несколько милливольт. С использованием математических моделей было рассчитано, что данный вклад не может составлять более 10 мВ. В экспериментах на

кардиомиоцитах волокон Пуркинье собаки показано, что ток I_p гиперполяризует мембрану на 4,2 мВ (Cohen et al., 1987), в желудочковых кардиомиоцитах кур - на 6,5 мВ (Stimers et al., 1990), а в желудочковых кардиомиоцитах морской свинки - всего на 0,4 мВ (Levi, 1992). Ингибирование работы Na/K-АТФазы приводит к сдвигу мембранного потенциала в область более положительных значений.

Регуляция работы Na/K-АТФ-азы в сердце

Работа Na/K-АТФ-азы находится под влиянием множества регуляторных соединений (наиболее известными из которых, являются кардиотропные стероиды) и факторов, включая уровень внутриклеточного натрия, внеклеточного калия, цитоплазматической концентрации АТФ, а также значение мембранного потенциала.

Увеличение $[Na^+]_i$ и/или $[K^+]_o$ стимулирует Na/K-АТФ-азу (Shattock et al., 2015). Зависимость скорости работы Na/K-АТФ-азы (V) от концентраций натрия и калия, а также константа полуактивации ($K_{0.5}$) различны у разных видов животных. Сродство сайтов связывания Na^+ и K^+ Na/K-АТФ-азы зависит от мембранного потенциала, поэтому, скорость переноса ионов и амплитуда трансмембранного тока, генерируемого NKA (I_p) также являются потенциалзависимыми. Регуляторные факторы, оказывающие влияние на концентрации ионов в цитоплазме, значение мембранного потенциала также оказывают влияние и на Na/K-АТФ-азу. Таким образом, можно выделить два типа регуляции NKA: прямую регуляцию, заключающуюся в том, что помпа является конечной мишенью внутриклеточных регуляторных каскадов, а также опосредованную регуляцию, осуществляемую за счет изменения $[Na^+]_i$, $[K^+]_o$, E_m . Оба варианта реализуются при симпатических/адренергических воздействиях в сердце. Как правило, в экспериментальных условиях оказывается сложно разделить два вышеуказанных типа регуляции.

Адренергическая регуляция работы Na/K-АТФазы имеет важное значение для нормального функционирования сердца. Как известно, симпатическая регуляция, опосредованная адренорецепторами, осуществляется с участием внутриклеточных протеинкиназ, которые фосфорилируют свои мишени. Возможно два варианта реализации эффекта протеинкиназ: непосредственное фосфорилирование α -субъединицы NKA, либо фосфорилирование промежуточных молекул, взаимодействующих и регулирующих работу Na/K-АТФ-азы. В литературе представлено крайне мало данных о непосредственном действии PKA, PKC, либо других протеинкиназ на Na/K-АТФазу. В настоящее время общепринятой является точка зрения, согласно которой симпатическое влияние на NKA реализуется посредством фосфорилирования протеинкиназами А либо С белка фосфолеммана (PLM), который связан с α -субъединицей помпы (Fuller et al., 2013; Sweadner et al., 2000).

В отсутствие симпатической активации PLM находится в клетке в дефосфорилированном состоянии и его субъединицы ассоциированы с НКА таким образом, что он оказывает ингибиторное воздействие на работу Na/K-АТФ-азы посредством снижения чувствительности НКА к $[Na^+]_i$ и снижения максимальной скорости работы насоса. Фосфорилирование PLM приводит к изменению его конформации и снимает ингибирующее действие на Na/K-АТФ-азу.

Опосредованная регуляция Na/K-АТФ-азы в сердце

Регуляция работы Na/K-АТФазы при активации бета-адренорецепторов реализуется за счет изменения цитоплазматической концентрации ионов. При β -адреностимуляции происходит увеличение внутриклеточной концентрации натрия за счет увеличения частоты сердечных сокращений. Большее количество ПД за единицу времени приводит к увеличению суммарной длительности фаз деполяризации ПД, т.е. части времени сердечного цикла, когда ионы натрия поступают в клетку. Как было описано выше, Na/K-АТФаза чувствительна к уровню $[Na^+]_i$ и в результате таких изменений происходит ее активация.

Значение симпатической регуляции Na/K-АТФазы

Предполагается, что активация НКА при адреностимуляции имеет кардиопротекторный характер. Хорошо известно, что при симпатической стимуляции в сердце наблюдается положительный инотропный эффект, который развивается за счет увеличения $[Ca^{2+}]_i$. В кардиомиоцитах имеется ряд механизмов, направленных на удаление избыточного кальция из цитоплазмы. К таким механизмам относится Na/Ca-обменник (выкачивающий из клетки кальций в обмен ионы натрия). Активированная Na/K-АТФаза способствует более интенсивному выводу ионов натрия из цитоплазмы, так как увеличивает градиент по Na^+ , необходимый для работы NCX. Нарушение механизмов удаления кальция из цитоплазмы приводит к кальциевой перегрузке и гибели кардиомиоцитов (Fuller et al., 2013).

1.8.2. Натрий-кальцевый обменник

Существенную роль в формировании электрической активности всех отделов сердца играет натрий-кальцевый обменник (NCX). Физиологическая роль обменника заключается в удалении Ca^{2+} из цитоплазмы во время фазы плато и фазы поздней реполяризации ПД.

NCX представляет собой белок плазматической мембраны. Всего известно три изоформы обменника, из которых в сердце доминирует первая – NCX1 (Shattock et al., 2015). Молекула NCX содержит 10 трансмембранных доменов, между 5-м и 6-м доменами находится большая цитоплазматическая петля, содержащая сайты связывания различных регуляторных молекул (Nicoll et al., 1999). В структуре этого белка отсутствует трансмембранная пора, через

которую проходит поток ионов, вместо этого ионы попадают с одной стороны мембраны на другую за счет сложных конформационных изменений в молекуле обменника.

NCX может работать в двух противоположных режимах: выводить один ион Ca^{2+} наружу в обмен на перенос 3-х ионов Na^+ внутрь клетки (прямой режим), либо наоборот, выводить три Na^+ в обмен на один ион Ca^{2+} (обратный режим). Работая в прямом режиме, NCX генерирует входящий, деполяризующий ток. Наоборот, в обратном режиме NCX генерирует выходящий, гиперполяризующий ток. В ходе большей части ПД NCX работает в прямом режиме. Этот ток замедляет реполяризацию, увеличивает длительность ПД.

Регуляция работы Na/Ca-обменника в сердце

Ранее утверждалось, что изменение работы NCX в сердце при действии симпатических факторов является пассивным или вторичным процессом. В настоящее время показано, что NCX находится под непосредственным контролем симпатического отдела вегетативной нервной системы. Адренергическая регуляция работы Na/Ca-обменника осуществляется двумя способами: в результате воздействия на молекулу обменника протеинкиназ и других факторов, активированных через внутриклеточные каскады адренорецепторов, а также опосредовано, в результате изменения концентрации ионов в цитоплазме клетки, градиентов ионов и значения мембранного потенциала (Shattock et al., 2015).

Как известно, цитоплазматическая концентрация Na^+ и Ca^{2+} может изменяться. Увеличение уровня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ приводит к усилению прямого режима работы NCX и деполяризующего компонента тока I_{NCX} , так как обменник выводит избыточный кальций из цитоплазмы клетки. Высокий уровень $[\text{Na}^+]_i$ приводит к снижению интенсивности работы обменника в прямом режиме, активирует его работу в обратном режиме и усиливает реполяризующую компоненту тока I_{NCX} . При сдвиге мембранного потенциала интенсивность тока, генерируемого NCX, также будет изменяться. Величину тока I_{NCX} и его вклад в биоэлектрическую активность кардиомиоцита при симпатических воздействиях предсказать достаточно сложно.

Показано, что при α -адреностимуляции происходит увеличение активности сердечных изоформ NCX за счет прямого действия РКС на молекулу обменника (фосфорилирование по определенным аминокислотным остаткам серина) (Iwamoto, 1998). Однако, в настоящее время установлено, что РКС-зависимая активация NCX может происходить и без непосредственного фосфорилирования молекулы. В таком случае основную роль играют мембранные "вспомогательные" белки, взаимодействующие с обменником и регулирующие его активность. Несколько таких молекул выделено в настоящее время, и показано, что их фосфорилирование РКС приводит к увеличению скорости работы NCX (DiPolo et al., 1997). У грызунов (мышей и

крыс), активация α_1 -адренорецепторов приводит к существенной стимуляции прямого режима NCX и усилению деполяризующей компоненты тока I_{NCX} . Благодаря этому механизму при активации α_1 -адренорецепторов сократимость миокарда мышей и крыс снижается, а длительность ПД значительно увеличивается (Nishimaru et al., 2001; Okamoto et al., 2012).

Имеются противоречивые сведения о влиянии β -адренергических факторов на работу NCX в сердце. В ряде работ указывается, что активация β -адренорецепторов, стимуляция аденилатциклазы или применение аналогов цАМФ приводит к активации NCX, в то время как блокада PKA нивелирует эту активацию (Shigekawa, 2001). Соответственно, усиление скорости работы NCX при β -адренергической стимуляции происходит через классический АЦ/цАМФ/PKA-каскад. При активации β -адренорецепторов усиливается как входящая, так и выходящая компонента тока I_{NCX} (в кардиомиоцитах морских свинок) (Perchenet et al., 2000; Ruknudin et al., 2000). Однако, также имеются данные, что в кардиомиоцитах мышей, крыс, а также морских свинок β -адренергическая стимуляция не приводит к активации NCX и усилению тока I_{NCX} (Lin et al., 2006).

1.8.3. Калиевый реполярирующий ток аномального выпрямления I_{K1}

Основная физиологическая роль калиевого тока аномального (или входящего) выпрямления I_{K1} заключается в поддержании потенциала покоя в рабочем миокарде на уровне, близком к калиевому равновесному потенциалу (Anumonwo et al., 2010; Wang et al., 2001). Кроме того, ток I_{K1} вносит вклад в заключительную стадию фазы реполяризации ПД.

В миокардиальной ткани экспрессируются три изоформы каналов, проводящих ток I_{K1} : Kir2.1 и Kir2.2 и Kir2.3. В наибольшей степени ток I_{K1} выражен в желудочковом миокарде. В предсердном миокарде плотность тока I_{K1} в 6-10 раз меньше, а в центральной части синоатриального и атриовентрикулярного узла этот ток практически отсутствует. Отсутствие I_{K1} в САУ и АВ-узле является одной из основных причин низкого значения ПП в данном отделе сердца (Dhamoon et al., 2004; Shinagawa et al., 2000). В исследованиях, проведенных на изолированных кардиомиоцитах собаки, показано, что экспрессия каналов, переносящих ток I_{K1} в легочных венах ниже, чем в предсердном рабочем миокарде. (Calvo et al., 2010).

Уровень экспрессии каналов Kir2.x определяется транскрипционными факторами Tbx5, Nkx2-5. Как указано выше, уровень этих факторов ниже в миокардиальной ткани легочных вен. Снижение уровня Kir2.x и тока I_{K1} приводит к тому, что значение ПП устанавливается на более положительном уровне, а также к тому, что, при прочих равных условиях, будет легче происходить сдвиг ПП.

Регуляция тока I_{K1}

Известно, что эндогенными внутриклеточными регуляторами тока I_{K1} и каналов Kir2.x, является цитоплазматический кальций, pH, эндогенные полиамины. Медиаторы ВНС также оказывают влияние на I_{K1} . Показано, что активация как α - так и β -адренорецепторов приводит к подавлению тока I_{K1} , что вызывает увеличение длительности ПД и может приводить к сдвигу потенциала покоя.

В предсердных кардиомиоцитах человека активация α_1 -адренорецепторов приводит к значимому подавлению тока посредством активации РКС (Koumi et al., 1995; Reimann and Ashcroft, 1999). В кардиомиоцитах предсердий кролика РКС не оказывает ингибирующего действия на ток I_{K1} (Braun et al., 1992). Такие межвидовые различия могут быть объяснены разной чувствительностью изоформ Kir2.x каналов к α -адренергической стимуляции. Активация α_1 -адренорецепторов приводит к подавлению тока, через каналы, образованные субъединицами Kir2.2, но не Kir2.1. (Zitron et al., 2008).

Известно, что состояние каналов Kir2.x зависит от содержания фосфатидилинозитолфосфата в плазматической мембране клетки. Накопление PIP_2 в мембране способствует усилению тока. PIP_2 усиливает взаимодействие N- и C-концов молекулы канала, «привязывая» их к цитоплазматической стороне мембраны, тем самым способствуя пребыванию поры канала в открытом состоянии (Anumonwo et al., 2010). Расщепление мембранного PIP_2 фосфолипазами, приводит к подавлению I_{K1} . Как известно, стимуляция α -адренорецепторов приводит к активации фосфолипазы C и расщеплению PIP_2 , что лежит в основе РКС-независимого подавления I_{K1} . Показано также, что подавление тока I_{K1} , при α -адренергической стимуляции может быть обусловлено активацией SRC тирозинкиназы (Zitron et al., 2008).

Агонисты β -адренорецепторов (изопротеренол), активаторы аденилатциклазы (форсколин) подавляют активность Kir2.x каналов в желудочковых кардиомиоцитах человека посредством активации РКА. Синтетический аналог цАМФ также вызывает уменьшение тока I_{K1} (Koumi et al., 1995). Таким образом, РКА-зависимое фосфорилирование Kir2.x вызывает подавление тока I_{K1} .

Еще один механизм регуляции I_{K1} обусловлен $\beta\gamma$ -субъединицей. Показано, что $\beta\gamma$ -субъединица активированного G-белка прямо связывается с молекулами канала и вызывает подавление тока, однако $\beta\gamma$ -субъединица подавляет ток, формируемый только Kir2.3 каналом и не оказывает заметного влияния на Kir2.1 и Kir2.2 каналы (Cohen et al., 1996).

1.8.4. Са-зависимый К-ток - I_{KCa}

Семейство кальций-зависимых калиевых каналов объединяет разные группы трансмембранных белков, существенно отличающихся как по функциональным особенностям,

так и по молекулярной структуре. Единственным общим свойством данных каналов является чувствительность к цитоплазматической концентрации Ca^{2+} . К данному семейству относятся каналы большой (БК-каналы), средней (ИК-каналы) и малой проводимости (СК-каналы). Сведения об экспрессии и роли Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов и роли калиевых кальцийзависимых токов I_{KCa} в сердце противоречивы. В некоторых работах показано, что в сердце экспрессируются СК-каналы (Nilius et al., 2012).

Молекула СК-канала формируется четырьмя субъединицами, каждая из которых включает 6 трансмембранных сегментов. На С-концевом цитоплазматическом участке каждого домена расположен участок связывания молекулы кальмодулина (CaM). Именно CaM связывает ионы кальция, тем самым определяя чувствительность канала к внутриклеточному уровню Ca^{2+} . Кроме того, с каналом постоянно связаны регуляторные белки: протеинкиназа СК2 и протеинфосфатаза PP2A. Фосфорилирование связанного с каналом CaM протеинкиназой СК2 уменьшает чувствительность канала к Ca^{2+} , в то время как дефосфорилирование с помощью PP2A оказывает обратный эффект (Bildl et al., 2004).

Роль Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов в сердце может заключаться в регуляции длительности ПД и уровня ПП. Ток I_{KCa} может усиливаться в ходе 2 и 3 фаз ПД вследствие увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_i$, и, соответственно, приводить к ускорению реполяризации (Li et al., 2009).

В ряде работ, сделано предположение о функциональной значимости тока, формируемого СК-каналами в сердце. У мышей, нокаутных по гену СК2-канала длительность ПД на уровне 90% реполяризации в предсердных кардиомиоцитах значительно увеличивалась по сравнению с мышами дикого типа, в то время как в желудочковых кардиомиоцитах значимых различий выявлено не было (Li et al., 2009). Предполагается, что I_{KCa} значительно более выражен в рабочих кардиомиоцитах предсердий по сравнению с желудочковыми кардиомиоцитами (у человека, собаки и мыши) (Özgen et al., 2007; Qi et al., 2014). Показано, что I_{KCa} может играть определенную роль в развитии ФП. Так установлено, что ингибирование тока I_{KCa} приводит к возникновению ранних постдеполяризаций.

Регуляция Ca-зависимого K-тока

В настоящее время имеется лишь небольшое количество данных о роли I_{KCa} и функционировании Ca-зависимых калиевых каналов в миокарде, соответственно практически отсутствуют сведения о симпатической (или адренергической) регуляции этих токов в сердце. В наибольшей степени регуляция кальций-зависимых калиевых каналов изучена в гладкомышечной ткани, в которой в отличие от сердечной ткани присутствуют калиевые каналы большой проводимости (БК-каналы). В гладкомышечных клетках сосудов агонисты β -адренорецепторов приводят к усилению выходящего тока, переносимого кальций-зависимыми

калиевыми каналами посредством РКА, что способствует гиперполяризации миоцитов. α -адренергическая стимуляция в различных тканях приводит к подавлению тока I_{KCa} посредством РКС (Schubert et al., 2001).

1.8.5. Калиевые каналы и токи утечки - I_{leak}

В сердце различных видов млекопитающих экспрессируются так называемые каналы утечки (K_{2P}), которые в физиологическом диапазоне мембранного потенциала проводят выходящий калиевый ток. Выходящий ток, проводимый данными каналами, имеет приблизительно линейную вольт-амперную характеристику и является потенциал-независимым (Schmidt et al., 2014), поэтому обозначается как ток утечки - I_{leak} . Роль тока I_{leak} заключается в поддержании потенциала покоя на уровне, близком к калиевому равновесному потенциалу. Также данный ток вносит определенный вклад в реполяризацию ПД.

Каналы тока утечки относятся к большому семейству K_{2P} -каналов. Пора этих каналов образована двумя субъединицами, каждая из которых имеет 4 трансмембранных сегмента (S1-4). Каждая такая субъединица имеет по две порообразующие петли. В кардиомиоцитах обнаружено не менее 9 подтипов каналов, относящихся к семейству K_{2P} , но наиболее важное функциональное значение имеют каналы TREK-1 (или $K_{2P2.1}$) и TASK-1 (или $K_{2P3.1}$) (Schmidt et al., 2014).

Каналы утечки чувствительны к целому ряду факторов, включая температуру, растяжение мембраны, уровень pH, парциальное давление кислорода, также их проводимость подвержена регуляции целого ряда внутриклеточных протеинкиназ (Goldstein et al., 2001).

Каналы $K_{2P2.1}$ и $K_{2P3.1}$ обнаружены как в желудочковом, так и в предсердном миокарде. У человека в предсердном миокарде преобладают каналы $K_{2P3.1}$. Каналы K_{2P} могут играть определенную роль в формировании ФП. (Schmidt et al., 2014). Показано, что в некоторых случаях, у пациентов, страдающих ФП, были обнаружены генетические мутации в генах K_{2P} каналов. Утверждается, что как чрезмерная активация каналов, так и чрезмерное ингибирование I_{leak} приводит к нарушению реполяризации ПД и поддержания потенциала покоя.

Регуляция калиевых каналов утечки

Имеются сведения, что активация адренорецепторов (как α -, так и β -подтипа) приводит к подавлению калиевого тока утечки в сердце, по крайней мере, опосредованного TASK-1 каналами ($K_{2P3.1}$). Ингибирование происходит посредством фосфорилирования данного подтипа каналов протеинкиназами А и С (Szûts et al., 2012). В некоторых, более поздних исследованиях утверждается, что при активации α -адренорецепторов ингибирование TASK-1

каналов происходит за счет DAG. Данная молекула напрямую связывается с порообразующей субъединицей, тем самым ингибируя работу целого канала (Wilke et al., 2014). Показано, что α -адренорецептор-зависимое ингибирование данного тока приводит к увеличению длительности ПД, а также к деполяризации потенциала покоя (Charpentier, 2007).

1.9. Формирование симпатической иннервации и адренергической рецепции в сердце в ходе онтогенеза

Известно, что биоэлектрическая активность сердца новорожденных животных существенно отличается от таковой у взрослых. У крыс не только конфигурация потенциалов действия (Pucelik and Barták, 1982), а также выраженность всех ионных токов (кальциевого тока I_{CaL} , калиевого тока аномального выпрямления I_{K1} , калиевых токов задержанного выпрямления (I_{Kr} , I_{Ks} , I_{Kur}), калиевого транзиторного тока I_{to}) в неонатальном миокарде сильно отличаются от взрослого сердца (Gaughan, 1998; Kassiri, Zobel, et al., 2002; Kassiri, Hajjar, and Backx, 2002; Pignier et al., 2000; Wahler, 1992). Различия в конфигурации ПД и выраженности ионных токов в миокарде легочных вен на разных этапах онтогенеза к настоящему времени остаются неизученными. Однако, имеющиеся данные, касающиеся постнатальных изменений в рабочем миокарде предсердий и желудочков, позволяют предположить вышеуказанные различия с высокой вероятностью. Следует отметить, что помимо самой биоэлектрической активности существенно различается и ее нервная регуляция у взрослых и неонатальных животных. Онтогенетические различия в регуляции биоэлектрической активности обусловлены как свойствами самого миокарда, например экспрессией рецепторов вегетативных нейротрансмиттеров, так и тем фактом, что вегетативная, особенно симпатическая, иннервация сердца формируется и созревает в ходе постнатальной жизни постепенно. Поскольку данная работа отчасти посвящена адренергической регуляции электрической активности в онтогенезе, то ниже приведены сведения о развитии именно симпатической иннервации сердца.

Как известно, у различных видов млекопитающих, в том числе у крыс, в неонатальном периоде функциональные симпатические воздействия на сердце не развиты или отсутствуют вовсе из-за недостаточного развития эфферентных симпатических путей (Bareis and Slotkin, 1978; Bartolome et al., 1980; Gootman et al., 1979; Lau and Slotkin, 1979; Pappano, 1977; Robinson, 1996; Robkin et al., 1976): постганглионарные симпатические нервные терминалы могут отсутствовать в неонатальном миокарде вовсе, либо может наблюдаться незрелость нервных окончаний (Bareis et al., 1981; Bareis and Slotkin, 1980). У крыс подобные явления наблюдаются вплоть до начала третьей недели постнатального развития (Robinson, 1996). В этот период происходит созревание симпатических нервных терминалов и становится возможным высвобождение норадреналина симпатических окончаний, т.е. происходит «включение»

симпатической регуляции сердца (Bareis and Slotkin, 1980; Bartolome et al., 1978). Сведения о пре- и постнатальном развитии вегетативной иннервации миокарда легочных вен крайне скудны. Показано лишь только, что у человека холинергические нервы и ганглиозные плексусы в легочных венах уже присутствуют и демонстрируют зрелую морфологию уже на плодном этапе развития (Vaitkevicius et al., 2008). Данные о формировании симпатической иннервации отсутствуют вовсе.

Несмотря на отсутствие симпатической иннервации на ранних постнатальных стадиях онтогенеза, миокард предсердий и желудочков обладает чувствительностью к катехоламинам, вырабатываемым в надпочечниках и циркулирующим в крови, благодаря наличию функциональных адренорецепторов на мембране кардиомиоцитов. Кроме того, было показано, что катехоламины могут выделяться и в самом сердце – они синтезируются специализированными клетками (intrinsic cardiac adrenergic (ICA) cells) (Natarajan et al., 2004). «Внутрисердечные» катехоламины играют важную роль на пренатальных стадиях развития организма, оказывая непосредственное влияние на ритм сердца.

В литературе существует большое количество исследований, касающихся уровня и регуляции экспрессии адренорецепторов у новорожденных животных и человека (Kuznetsov et al., 1995; Robinson, 1996). Известно, что в ходе онтогенеза распределение адренорецепторов в различных отделах сердца изменяется. Показано, что в рабочем миокарде желудочков крысы, по крайней мере до 18-дневного возраста, α_1 -адренорецепторов в два раза больше, чем у взрослых животных (Schaffer et al., 1986). Считается, что такая повышенная экспрессия α_1 -адренорецепторов в развивающемся сердце связана с контролем синтеза белка в миокарде, необходимого для развития и роста мышечной ткани сердца.

Распределение типов адренорецепторов и изменение уровня их экспрессии в миокарде легочных вен в ходе онтогенеза практически не исследовано.

Как показано выше, формирование тахиаритмий, эктопическая, фокальная проаритмическая автоматия в миокарде легочных вен тесно связаны с активностью симпатического отдела вегетативной нервной системы. В связи с вышесказанным, данное исследование направлено на изучение симпатической иннервации легочных вен, адренергической рецепции, а также на установление взаимосвязи формирования симпатической иннервации и становления проаритмического электрофизиологического фенотипа миокарда легочных вен.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Экспериментальные животные

Электрофизиологические эксперименты проводили на изолированных многоклеточных перфузируемых препаратах легочных вен и левого предсердия (венозно-легочные препараты) крыс стока Wistar. Выявление катехоламин-позитивных волокон, иммунофлюоресцентное исследование распределения адренорецепторов в миокарде легочных вен также осуществляли в тканевых образцах, полученных от крыс стока Wistar.

Самцы и самки крыс массой 200-350 г (2-5 мес.) были получены из питомника ФГБУ "НЦ Биомедицинских технологий" ФМБА и были использованы как для получения тканевых препаратов легочных вен и левого предсердия, так и для получения потомства.

Эксперименты на животных выполнены в соответствии с актуальными требованиями по содержанию и использованию лабораторных животных. Животных содержали в стандартных условиях комнаты для передержки животных кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, при световом режиме 12:12 с доступом к воде и пище *ad libitum*. Экспериментальные протоколы были одобрены комиссией по биоэтике биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (National Academies Press (US), 2011).

Для получения потомства к половозрелым самкам подсаживали самцов в соотношении 3:2, через 14 дней самцов отсаживали, а самок помещали в индивидуальные клетки. После родов и до 21-х суток жизни потомство содержали с самками в индивидуальных клетках, крысят отбирали из всех помётов равномерно, что позволяло получать в каждой изучаемой нами возрастной группе животных сходной массы. В работе использовали препараты сердца, 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. Масса новорожденных крыс составила 6 ± 1 г, 7-суточных крыс 14 ± 2 г, 14-суточных 29 ± 4 г, 21-суточных 47 ± 8 г. Взрослыми считали крыс возрастом 60 суток. Тканевые препараты, полученные от взрослых крыс, относятся к группе 60Д.

В отдельной серии экспериментов, направленной на выявление роли симпатической иннервации в формировании аритмогенных свойств миокардиальной ткани ЛВ крыс использовали животных с хронической неонатальной десимпатизацией.

2.2. Регистрация биоэлектрической активности в препаратах легочных вен крысы

Биоэлектрическую активность регистрировали с помощью стандартной микроэлектродной техники.

2.2.1. Выделение препаратов левого предсердия с участками легочных вен

Животных декапитировали, вскрывали грудную клетку, извлекали сердце вместе с легкими и помещали в емкость с перфузионным раствором комнатной температуры. В аорту вводили канюлю, соединенную со шприцем, содержащим перфузионный раствор. Сердце промывали раствором, вытесняя кровь из коронарных сосудов предсердий и желудочков. Процедуру повторяли до полного удаления крови из сердца.

Затем, выделяли многоклеточные препараты, включающие левое предсердие и легочную вену левой доли легкого (Рис.2.1., далее – «препараты ЛВ». Общий вид суправентрикулярной области крысы представлен на Рис.2.2.). Для этого делали надрез в области границы левого желудочка и предсердия, далее вели разрез вдоль межпредсердной перегородки, отделяли левое предсердие вместе с легочными венами и долями легких от сердца. Отсекали доли легких дистальнее первой бифуркаций легочных вен. Затем делали разрез вдоль продольной оси легочной вены. Препарат переносили в камеру с перфузионным раствором комнатной температуры, разворачивали и фиксировали эндокардиальной стороной вверх.

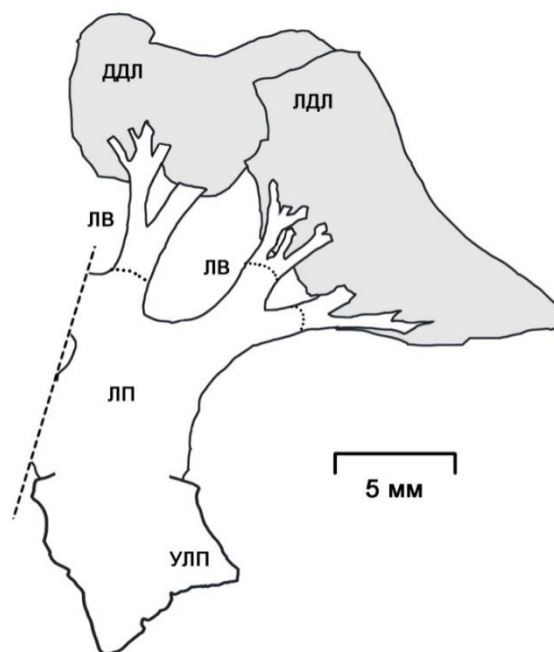


Рис. 2.1. Схема препарата суправентрикулярной области сердца крысы, включающая ушко левого предсердия (УЛП), свободную стенку левого предсердия (ЛП), легочные вены (ЛВ) левой (ЛДЛ) и добавочной (ДДЛ) долей легких. Пунктиром отмечены места разрезов при выделении препарата.

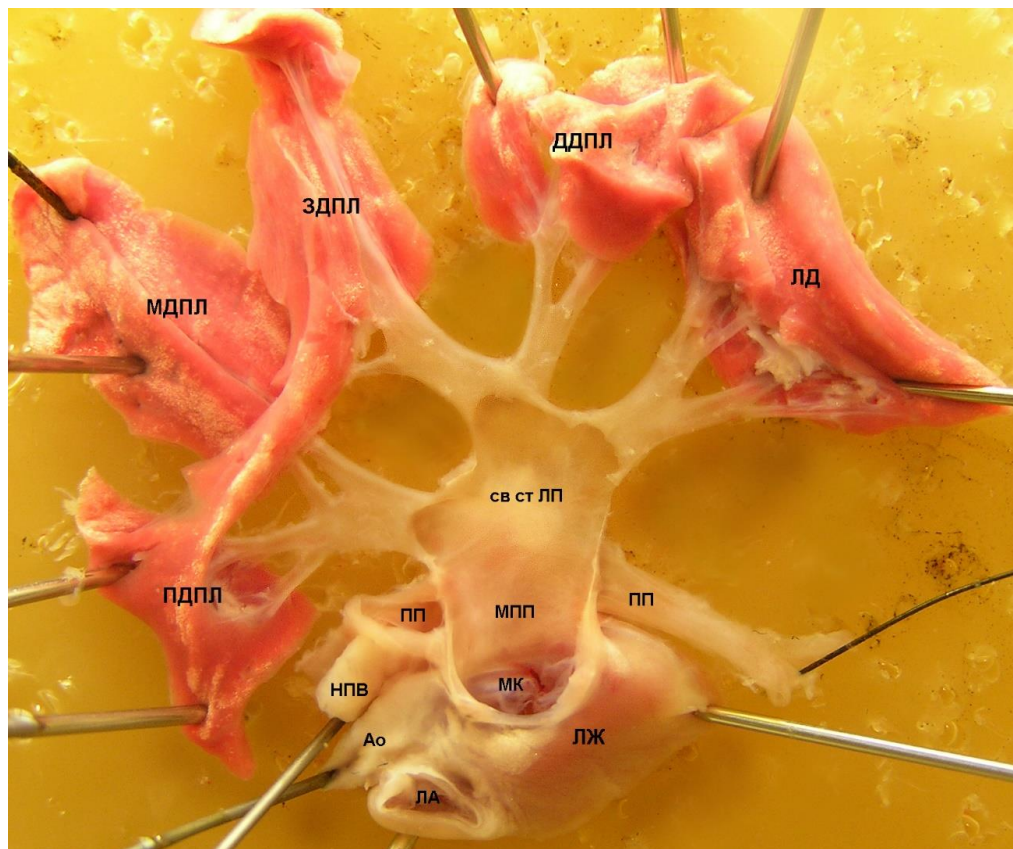


Рис. 2.2. Общий вид суправентрикулярной области сердца крысы, включая легочные вены. ЛД – левая доля легкого, ДДПЛ – добавочная доля правого легкого, ЗДПЛ – задняя доля правого легкого, МДПЛ – медиальная доля правого легкого, ПДПЛ – передняя доля правого легкого, ПП – правая полая вена, НПВ – нижняя полая вена, Ао – аорта, ЛА – легочная артерия, ЛЖ – левый желудочек, МК – митральный клапан, МПП – межпредсердная перегородка, св ст ЛП – свободная стенка левого предсердия

2.2.2. Перфузия многоклеточных препаратов легочных вен крысы

Изолированные препараты, включающие миокард левого предсердия и легочных вен, перфузировали при 37°C раствором Тироде следующего состава (ммоль/литр): NaCl - 129, KCl - 4, NaH_2PO_4 - 20,9, MgSO_4 - 0,5, NaHCO_3 - 20, CaCl_2 - 1,2, глюкоза - 5; pH 7,2 – 7,4.

Перфузионный раствор непрерывно оксигенировали смесью O_2 (95%) и CO_2 (5%). Скорость потока перфузионного раствора составляла 15 мл/мин, объем перфузионной камеры - 5 мл.

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). Биполярные серебряные

стимулирующие электроды размещали в области препарата, соответствующей устью легочной вены. 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 (СПД), либо колебания уровня потенциала покоя регистрировали в «покоящемся» миокарде легочных вен, то есть без электрической стимуляции.

Перед началом эксперимента препараты адаптировали в перфузионной камере в течение 30 - 60 мин. В течение всего периода адаптации изолированные препараты работали в навязанном ритме (3,3 Гц).

2.2.3. Экспериментальная установка, регистрация потенциала покоя, потенциалов действия и спонтанной автоматической активности

Для регистрации биоэлектрической активности использовали стеклянные микроэлектроды (сопротивлением 10-30 МОм), подключенные к усилителю (А-М system 1600, США). Усиленный сигнал поступал на АЦП (Е-154, L-card, Россия) и далее записывался и обрабатывался на компьютере с помощью программы «Power Graph 3.3». Потенциал покоя и ПД регистрировали с эндокардиальной стороны многоклеточных препаратов.

В различных участках предсердия (трабекулярная часть, «свободная» часть) и в различных отделах миокардиального рукава легочных вен конфигурация и длительность потенциалов действия различна. Также уровень потенциала покоя изменяется в направлении от проксимального к дистальному участку легочной вены, что является результатом разной экспрессии и соотношения ионных трансмембранных токов. Поэтому, во всех сериях экспериментов у взрослых животных, а также у животных возрастом 21 и 14 дней регистрацию потенциала покоя и ПД производили в сходных участках миокардиальных препаратов. В легочных венах ПД и потенциал покоя регистрировали 1-2 мм дистальнее области первой бифуркации легочной вены, а в левом предсердии – в основании трабекуляризированной части (ушка) предсердия. У новорожденных животных (1Д), а также у животных возрастом 7 дней электрическую активность регистрировали также в области первой бифуркации ЛВ. Таким образом, мы предприняли попытку снизить разброс, обусловленный гетерогенностью электрофизиологических свойств ткани при исследовании влияния различных соединений на ПП и спонтанную (автоматическую) активность.

2.2.4. Протоколы экспериментов

Эксперименты, направленные на выявление эффектов агонистов адренорецепторов на ПП и спонтанную активность в легочных венах, проводили по следующей схеме: после завершения периода адаптации в течение 1-2 мин регистрировали электрически-вызванные ПД, затем прекращали электрическую стимуляцию. Электрически вызванные ПД регистрировали с целью контроля состояния препаратов легочных вен и предсердий, а также для подтверждения регистрации электрической активности от кардиомиоцитов легочных вен. В том случае, если ПД имели «овершут» и максимальную скорость нарастания переднего фронта >100 В/с препарат считали пригодным для эксперимента. Непосредственно после прекращения стимуляции следовал период стабилизации потенциала покоя, который в легочных венах продолжался в течение 4-6 минут. По окончании периода стабилизации ПП миокардиальные препараты в течение 8-10 мин перфузировали раствором, содержащим 10 мкМ фенилэфрина (ФЭ, агонист α_1 -адренорецепторов), 10 мкМ изопротеренола (ИЗО, агонист β -адренорецепторов) или 10 мкМ норадреналина (НА, эндогенный агонист адренорецепторов). Таким же образом осуществляли контрольные эксперименты с многоклеточными препаратами левого предсердия. После прекращения стимуляции электрическую активность регистрировали непрерывно в течение всего времени эксперимента. Описанный экспериментальный протокол был одинаков для всех возрастных групп. Эксперименты, по выявлению эффектов агонистов адренорецепторов на ПП и спонтанную активность в легочных венах десимпатизированных животных проводили по сходному протоколу.

Эксперименты, направленные на выявление эффектов пуриновых комедиаторов, проводили как в электрически стимулируемых, так и в покоящихся препаратах ЛВ крыс всех описываемых возрастных групп. В стимулируемых препаратах исследовали действие НАД⁺, АТФ и диаденозинтетрафосфата (ДАТФ) в концентрациях 10 мкМ на длительность потенциалов действия. Для этого вначале в течение 2-3 минут производили запись «контрольных» значений ПД, а затем в течение 5-7 минут перфузировали раствором, содержащим исследуемое вещество. Эффекты пуриновых соединений на потенциал покоя изучали в покоящихся препаратах ЛВ крыс всех описываемых возрастных групп. Для этого после прекращения стимуляции и периода стабилизации ПП (4-6 мин) препараты ЛВ перфузировали раствором, содержащим 10 мкМ НАД⁺, 10 мкМ АТФ или 10 мкМ ДАТФ в течение 7-8 минут. Описанный экспериментальный протокол был одинаков для всех возрастных групп.

Эксперименты, направленные на изучение модулирующего действия пуриновых соединений на эффекты норадреналина в препаратах легочных вен, проводили на крысах 14-, 21-дневного возраста и взрослых животных, так как на более ранних этапах постнатального

онтогенеза норадреналин не вызывал каких-либо значимых изменений в препаратах ЛВ. Исследование проводили в покоящихся препаратах: после прекращения стимуляции и периода стабилизации ПП вначале в течение 5-10 минут перфузировали препараты раствором, содержащим 10 мкМ НА. Важным аспектом, определяющим время перфузии препарата, было появление стабильной спонтанной активности при действии НА. После этого, в раствор, содержащий НА, добавляли НАД⁺, АТФ или ДАТФ до конечной концентрации 10 мкМ. Регистрировали изменения биоэлектрической активности в течение 7-8 минут.

Эксперименты, направленные на выявление механизмов, активируемых при стимуляции α_1 -адренорецепторов, проводили на препаратах ЛВ взрослых крыс. Использовали ингибиторы фосфолипазы С (U-73122 в концентрации 0,5 мкМ), фосфолипазы D (FPLI в концентрации 0,1 мкМ), протеинкиназы С (хелеритрин, 1 мкМ), а также ингибитор хлорных токов SITS (10 мкМ). После прекращения стимуляции и стабилизации ПП препараты перфузировали раствором, содержащим тот или иной ингибитор, в течение 10 минут, а затем, на фоне ингибитора подавали фенилэфрин в течение 10 минут. ПП регистрировали непрерывно в течение всего периода подачи веществ.

Эксперименты, направленные на выявление механизмов, активируемых при стимуляции β -адренорецепторов, также проводили на препаратах ЛВ только взрослых крыс. Использовали ингибитор аденилатциклазы MDL-12330A (10 мкМ), активатор аденилатциклазы форсколин (5 мкМ), неселективный ингибитор фосфодиэстераз IBMX (10 мкМ), ингибиторы протеинкиназы А: Н-89 (5 мкМ), KT5720 (0,1 мкМ) и Rp-adenosine-cAMP (5 мкМ). Все вещества, кроме форсколина, подавали после прекращения стимуляции препаратов и стабилизации ПП в течение 7-10 минут, после этого подавали изопротеренол на фоне данных соединений. Форсколин использовали сам по себе, без последующего действия изопротеренола.

Эксперименты, направленные на выявление роли $[Ca^{2+}]_i$ в регуляции ПП в ЛВ крыс, проводили по следующей схеме. После адаптации в течение 1–2 мин регистрировали потенциалы действия (ПД), затем прекращали стимуляцию. Непосредственно после прекращения стимуляции следовал период стабилизации ПП (4–6 мин), по окончании которого в среду с препаратом в течение 15 мин вводили соединения, способствующие повышению уровня $[Ca^{2+}]_i$: кофеин (5 мМ), рианодин (0,01 мкМ). В течение всего этого периода непрерывно подачи регистрировали ПП. Также в данной серии экспериментов использовали хелатор кальция ВАРТА-АМ (мкМ): препарат ЛВ перфузировали раствором, содержащим данное соединение в течение 10 минут.

Для изучения возможного вклада калиевых кальцийзависимых каналов (I_{KCa}) в сдвиг ПП, вызываемый в ЛВ повышением $[Ca^{2+}]_i$, использовали селективный блокатор калиевых кальцийзависимых каналов малой проводимости – UCL1848 ((8,14-диаза-1,7(1,4)диаза-1,7(1,4)-

дихино-линациклотетрадекафан трифторацетат), 0,1 мкМ), калиевых каналов средней проводимости (IK) – TRAM-34 (1-[(2-хлорфенил)дифенилметил]-1Н-пиразол), 0,1 мкМ), а также неселективный блокатор клотримазол (10 мкМ). В этой серии опытов после стабилизации ПП в покоящихся препаратах ЛВ сначала в среду с препаратом на 10 мин вводили блокатор, а затем на его фоне также на 10 мин – 5 мкМ кофеина.

2.2.5 Анализ экспериментальных данных

Для анализа характеристик биоэлектрической активности в препаратах ЛВ и ЛП, таких как уровень мембранного потенциала покоя (ПП), максимальная скорость нарастания переднего фронта ПД ($dV/dt_{\max}$), а также характеристик спонтанной активности в легочных венах (частота следования спонтанных ПД, длительность периодов («пачек») 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%).

Для построения диаграмм и оценки статистической значимости различий использовали значения параметров, наблюдаемые при максимальном развитии эффектов агонистов адренорецепторов использовали программу GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc.).

2.3. Визуализация катехоламин-содержащих волокон в стенке легочных вен и левого предсердия

Для оценки степени симпатической иннервации проводили визуализацию симпатических волокон в стенке ЛВ крыс разных возрастных групп: новорожденных, 7-, 14-, 21-дневных и взрослых животных (группы 1Д, 7Д, 14Д, 21Д, 60Д). Для визуализации симпатических нервных волокон использовали метод гистохимического окрашивания при помощи глиоксиловой кислоты. Данный метод основан на способности катехоламинов взаимодействовать с глиоксиловой кислотой с образованием флуоресцирующих аддуктов (Axelsson et al., 1972; De la Torre, 1980).

2.3.1. Приготовление и окрашивание тканевых образцов легочных вен

Венозно-легочные препараты получали по методике, описанной в разделе 2.2.1. Затем препарат помещали в препаровальную камеру, разрезали легочные вены вдоль продольной оси и промывали раствором Тироде. Далее препараты в течение 30 минут 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%), pH доводили до 7,4 1 М р-ром NaOH. Затем препарат расправляли на предметном стекле эндокардиальной стороной вверх, сушили в течение 30

минут под струей теплого воздуха, а затем в сушильном шкафу при температуре 100°C в течение 5 минут. Высушенный препарат заливали вазелиновым маслом и накрывали покровным стеклом. Все препараты были подготовлены в сходных условиях.

2.3.2. Обработка конфокальных изображений и анализ распределения катехоламин-позитивных волокон в легочных венах

Окрашенные препараты ЛВ фотографировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия), используя воздушный объектив Plan-Apochromat 20x/0,8 M27. Фотографии получали для области, соответствующей первой бифуркации легочной вены левой доли легкого. При визуализации с помощью ПО Carl Zeiss ZEN 7.0 получали стековые изображения (25 стеков, разрешение каждого стека 2048×2048 пикселей, 8 бит/пиксель) в конфокальном режиме (диаметр точечной диафрагмы – 0,56 мкм, интервал между стековыми плоскостями – 1 мкм). Флюоресценцию аддуктов возбуждали фотодиодным лазером с длиной волны 405 нм; регистрировали флюоресценцию в диапазоне 420-440 нм (максимум 435 нм).

Анализ распределения катехоламин-позитивных волокон в стековых изображениях осуществляли в программе ImageJ (ImageJ 1.50i) используя плагин Bio-Formats Explorer ImageJ. (imagej.net/Bio-Formats). После вычитания фона методом скользящего параболоидного усреднения осуществляли извлечение точек максимальной флюоресценции в каждом стеке и объединение стеков в однослойную картину. Затем осуществляли бинаризацию изображения. Используя стандартные процедуры ImageJ, рассчитывали процентное отношение общего количества флюоресцентных пикселей в бинарном изображении (Рис. 2.3.А) к общей площади препарата. Полученные значения рассматривали как показатель содержания катехоламин-содержащих волокон в ткани легочных вен (или левого предсердия). Для оценки протяженности катехоламин-позитивных волокон проводили «скелетонизацию» изображений, используя процедуру imagej.net/Skeletonize. На основе полученной карты волокон (Рис. 2.3.Б), рассчитывали их длину по отношению к общей площади изображения. Данный показатель считали пропорциональным плотности симпатических нервных волокон в миокардиальных препаратах.

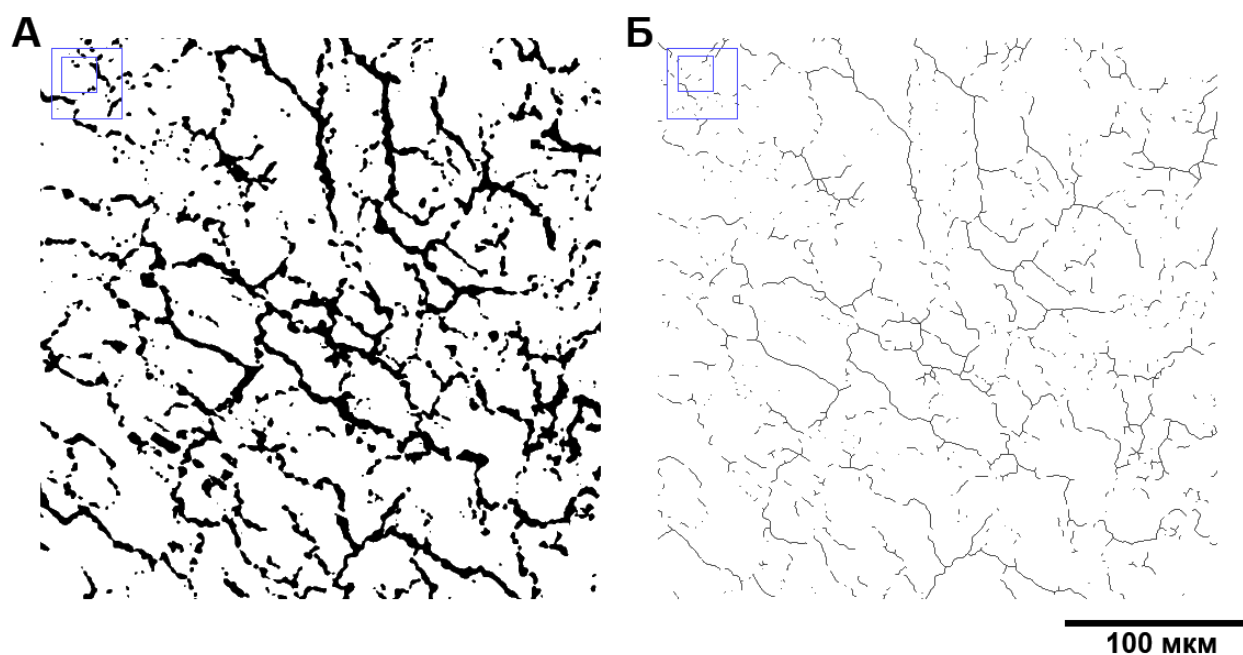


Рис.2.3. Примеры изображений катехоламин-положительных волокон в препаратах ЛВ взрослых крыс в процессе обработки в программе ImageJ. Увеличение основного изображения в три раза (синие рамки в левом верхнем углу). А – бинарное изображение, Б – изображение после процесса «скелетонизации».

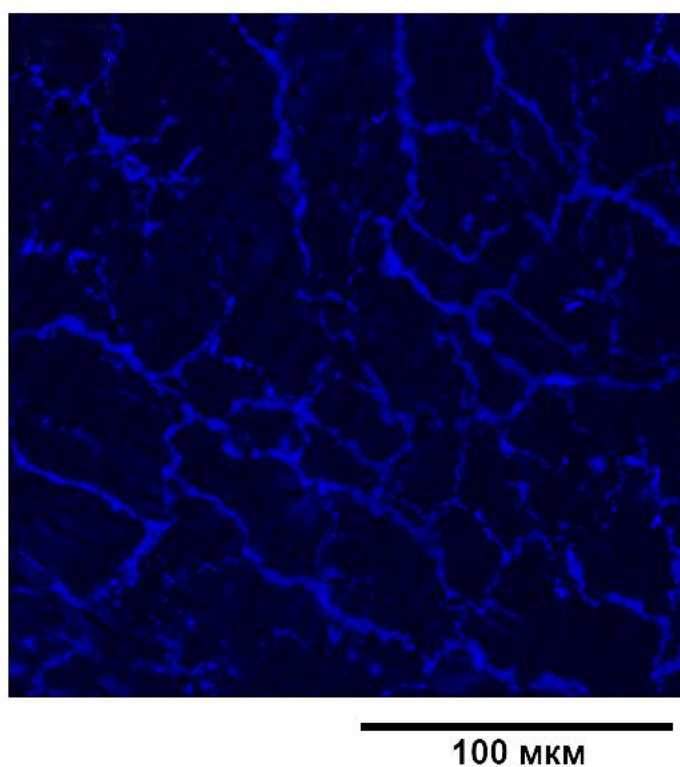


Рис. 2.4. Примеры варикоз в катехоламин-положительных волокнах в препаратах ЛВ взрослых крыс.

2.4. Иммунофлуоресцентное выявление рецепторов норадреналина в миокардиальной ткани легочных вен

2.4.1. Получение тканевых образцов и приготовление парафиновых блоков

Для иммунофлуоресцентного выявления адренорецепторов были взяты венозно-легочные препараты крыс возрастом 1-, 7-, 14 и 60 суток (взрослые животные). Препараты включали в себя левое предсердие и левую ЛВ и были выделены в соответствии с протоколом, описанным ранее в разделе 2.2.1.

Для двойного иммунофлуоресцентного исследования использовали следующие антитела:

- 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 легочных 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.

2.4.2. Приготовление и окраска срезов

За сутки до приготовления срезов парафиновые препараты замораживали при температуре -20°C . С помощью ротационного микротом с ручным приводом Leica RM2125RTS делали поперечные срезы легочных вен толщиной 4 мкм, после чего срезы переносили на водяную баню, нагретую до 35°C , а затем помещали на покровные стекла SuperFrost Plus. Стекла со срезами сушили на нагревательном столике при температуре 70°C в течение 15 минут. При необходимости срезы хранили в холодильнике при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$.

Окрашивание срезов проводили по следующему протоколу:

1. Разогрев стекол с парафиновыми срезами в термостате ($+60^{\circ}\text{C}$) в течение 30 минут (с целью расплавления парафина);
2. Депарафинизация в двух сменах 100% ксилола (по 10 минут);
3. Регидратация в серии спиртов (этанол) убывающей концентрации (100%, 100%, 70%, 50%) по 5 минут в каждом;

4. Промывка дистиллированной водой в течение 2 минут;
5. Инкубация стекол с материалом в Трис буфере (pH=9, ПраймБиоМед, Россия) в течение 10 мин при температуре 110°C для демаскировки антигенов;
6. Промывка в растворе PBS 20 мин;
7. Промывка дистиллированной водой (2 раза);
8. Инкубация срезов в 3% перекиси водорода в течение 5-10 минут для ингибирования эндогенной пероксидазы;
9. Инкубация в неиммунной козьей сыворотке (ПраймБиоМед, Россия) в течение 10 минут для исключения неспецифического связывания;
10. Инкубация с первичными антителами, разведенными из концентрата 1:100 в разбавителе антител (ПраймБиоМед, Россия) – 60 минут при комнатной температуре во влажной камере;
11. Промывка в PBS-T буфере в течение 2 минут (3 раза);
12. Инкубация со смесью вторичных антител 1:500 в PBS-T (Jackson ImmunoResearch, США) - 1 час;
13. Промывка в PBS-T буфере в течение 2 минут (4 раза);
14. Промывка дистиллированной водой 5 мин (для предотвращения образования кристаллов соли);
15. Монтирование препаратов под покровное стекло в среду на водной основе для флуоресцентных препаратов (Dako (Agilent), США).

Окрашенные срезы хранили при комнатной температуре.

Для определения фонового уровня флюоресценции, обусловленного неспецифическим связыванием вторичных антител, подготавливали срезы без нанесения первичных антител, но с обработкой вторичными AlexaFluor и Cy3-конъюгированными антителами.

2.4.3. Получение конфокальных изображений и анализ распределения адренорецепторов в миокарде легочных вен

Окрашенные препараты легочных вен 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. При визуализации получали стековые изображения (4 стека, разрешение каждого стека 2048×2048 пикселей, 8 бит/пиксель) в конфокальном режиме (диаметр точечной диафрагмы – 1 мкм, интервал между стековыми плоскостями – 1 мкм), которые затем с помощью ПО Carl Zeiss ZEN 7.0

преобразовывали в однослойные, выделяя в каждом стеке области с максимальным уровнем флюоресценции.

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) используя плагин Bio-Formats Explorer ImageJ. (imagej.net/Bio-Formats). Используя стандартные процедуры ImageJ, рассчитывали процентное отношение общего количества флуоресцентных пикселей в бинарном изображении к общей площади изображения. Полученные значения рассматривали как показатель содержания α -1A- и β 1-адренорецепторов. Зоны повышенного поглощения возбуждающего излучения рассматривали как соответствующие расположению ядер. Пятна флюоресценции Cy3-конъюгированных антител располагающиеся по периметру зон повышенного поглощения рассматривали как признаки ядерных α -1A адренорецепторов.

2.5. Моделирование хронической неонатальной десимпатизации у крыс и верификация десимпатизации

Для получения крыс с хронической неонатальной десимпатизацией животным проводили инъекции гуанетидина сульфата (Santa Cruz Biotechnology, США). Гуанетидин растворяли в физиологическом растворе, инъекции проводили подкожно в области холки 6 раз в неделю в дозе 25 мг/кг со 2 по 14 день жизни и в дозе 50 мг/кг с 15 по 54–56 день жизни. Объем вводимого раствора составлял 1 – 2,5 мкл/г. До возраста 28 дней объем вводимого раствора гуанетидина рассчитывали в среднем на помет, а начиная с возраста 29 дней - индивидуально для каждого животного. За два дня до взятия животного в эксперимент инъекции прекращали.

Десимпатизацию верифицировали, изготавливая срезы левого предсердия и легочных вен, окрашивая и обрабатывая полученные препараты по методике, описанной в разделе 2.3. Десимпатизацию считали успешной, если в образцах не обнаруживали специфической флюоресценции катехоламиновых аддуктов.

2.5.1. Характеристика животных с хронической неонатальной десимпатизацией и контрольных к ним животных

Динамика массы тела животных с хронической неонатальной десимпатизацией и контрольных к ним животных представлена на рисунке 2.4. На момент выхода в эксперимент

(56-58 день жизни) масса тела контрольных животных составляла 227 ± 17 г, а десимпатизированных 160 ± 32 г ($p < 0,05$, критерий Стьюдента).

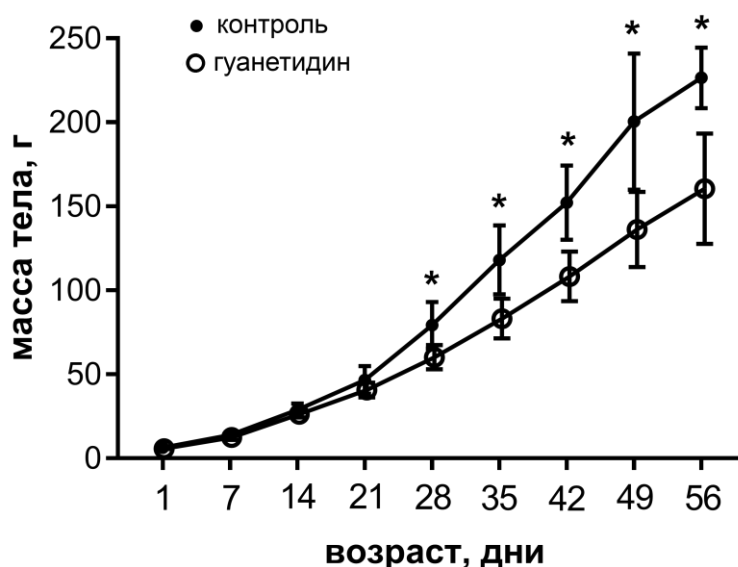


Рис. 2.5. Динамика массы тела крыс с хронической неонатальной десимпатизацией (гуанетидин) и контрольных к ним животных. * $p < 0,05$ (one-way ANOVA с поправкой Сидака на множественные сравнения).

2.5.2. Регистрация биоэлектрической активности в легочных венах у десимпатизированных животных

Выделение препаратов левого предсердия и легочных вен от десимпатизированных крыс возраста 1-, 7-, 14-, 21-день и взрослых животных осуществляли по протоколу, описанному в пункте 2.2.1.

Регистрацию биоэлектрической активности осуществляли по протоколу, описанному в пункте 2.2.4: исследовали длительность ПД, значения ПП, оценивали наличие спонтанной активности в базальных условиях, а также при активации адренорецепторов норадреналином.

Анализ данных и их статистическую обработку осуществляли в соответствии с пунктом 2.2.5.

2.6. Реактивы и материалы.

Список реактивов, использованных в ходе выполнения работы, приведен в табл.2.1.

Табл.2.1. Фармакологические агенты, используемые в работе.

Название	Фармакологическая активность	Производитель	Растворитель	Концентрация маточного р-ра, М	Рабочая концентрация
Норадреналин (НА)	Агонист адренорецепторов	Sigma-Aldrich	H ₂ O	10 ⁻²	10 мкМ
Фенилэфрин (ФЭ)	Агонист α ₁ - адренорецепторов	Sigma-Aldrich	H ₂ O	10 ⁻²	10 мкМ
Изопротеренол (ИЗО)	Агонист β- адренорецепторов	Sigma-Aldrich	H ₂ O	10 ⁻²	10 мкМ
U-73122 hydrate	селективный блокатор PLC	Sigma-Aldrich	DMSO	10 ⁻²	0,5 мкМ
FIPI hydrochloride hydrate	селективный блокатор PLD1 и PLD2	Sigma-Aldrich	DMSO	10 ⁻²	0,1 мкМ
Хелеритрин	блокатор РКС	Sigma-Aldrich	H ₂ O	10 ⁻²	1 мкМ
UCL-1648 trifluoroacetate salt	селективный блокатор калиевых кальцийзависимых токов низкой проводимости	Sigma-Aldrich	DMSO	10 ⁻²	0,1 мкМ
TRAM-34	блокатор калиевых кальцийзависимых токов средней проводимости	Sigma-Aldrich	DMSO	10 ⁻²	1 мкМ
Клотримазол	неселективный блокатор калиевых кальцийзависимых токов	ДИА-М	H ₂ O	10 ⁻²	10 мкМ
Форсколин	активатор АЦ	Tocris	ethanol	10 ⁻²	5 мкМ
MDL 12330A hydrochloride	блокатор АЦ	Tocris	DMSO	10 ⁻²	10 мкМ
Н-89 dihydrochloride hydrate	блокатор РКА	Sigma-Aldrich	DMSO	10 ⁻²	5 мкМ
KT5720	блокатор РКА	Sigma-Aldrich	ethanol	10 ⁻²	0,1 мкМ

Rp-adenosine-cAMP	блокатор PKA	Sigma-Aldrich	H ₂ O	10 ⁻²	5 мкМ
IBMX	Блокатор PDE	Sigma-Aldrich	DMSO	10 ⁻²	10 мкМ
SITS	неселективный блокатор хлорных каналов; также инактивирует Na/K-АТФазу	Sigma-Aldrich	DMSO	10 ⁻²	100 мкМ
Кофеин	в данной концентрации является активатором рианодиновых рецепторов, что приводит к выбросу кальция из саркоплазматического ретикулума	Merck	H ₂ O	10 ⁻²	5 мМ
Рианодин	в низкой концентрации является активатором рианодиновых рецепторов саркоплазматического ретикулума, в высокой концентрации – блокатор данного типа рецепторов	Sigma-Aldrich	H ₂ O	10 ⁻²	0,01 мкМ, 5 мкМ
SN-6	блокатор NCX	Sigma-Aldrich	DMSO	10 ⁻²	10 мкМ
Benzamil hydrochloride hydrate	селективный блокатор NCX	Sigma-Aldrich	DMSO	10 ⁻²	10 мкМ
ВАРТА-АМ	хелатор внутриклеточного (цитоплазматического) кальция	Tocris	H ₂ O	10 ⁻²	10 мкМ
НАД+	Пуриновый комедиатор	ДИА-М	H ₂ O	10 ⁻²	10 мкМ
АТФ	Пуриновый комедиатор	Sigma-Aldrich	H ₂ O	10 ⁻²	10 мкМ
ДАТФ	Пуриновый комедиатор	Sigma-Aldrich	H ₂ O	10 ⁻²	10 мкМ

(диаденозинтетр афосфат)					
-----------------------------	--	--	--	--	--

2.7. Статистическая обработка результатов

Статистически значимые различия выявляли при помощи программы статистической обработки данных «GraphPad Prism 7». Использовали парный t-тест Стьюдента*, точный тест Фишера**, однофакторный либо двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений (one way ANOVA) и его аналог для непараметрических выборок (Критерий Краскела — Уоллиса) с последующим применением апостериорных тестов с использованием поправки на множественные сравнения (поправка Тьюки)***.

Проверку распределения в выборках на нормальность осуществляли с помощью теста Шапиро-Уилка. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Данные в группах представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. n – количество экспериментов в той или иной группе. Экстремальные значения исследуемых параметров исключены из групп при обработке данных.

* - для сравнения эффекта какого-либо вещества по сравнению с контрольным значением (без действия данного вещества).

** - для сопоставления количества случаев адренергической спонтанной активности в легочных венах контрольных и десимпатизированных животных.

*** - для сравнения различий между разными возрастными группами животных

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Общая характеристика биоэлектрической активности в миокардиальной ткани легочных вен взрослых крыс

Во всех случаях в миокардиальной ткани легочных вен взрослых крыс (60Д) электрически вызванные потенциалы действия демонстрировали конфигурацию, сходную с таковой в рабочем предсердном миокарде. Однако, длительность ПД в ЛВ была значимо выше, чем в левом предсердии ($p < 0,05$). Репрезентативные примеры потенциалов действия ЛВ и ЛП приведены на рисунке 3.1. В левом предсердии ДПД90% в контрольных условиях составляла 38 ± 4 мс ($n=20$), в то время как в легочной вене - 63 ± 9 мс ($n=15$). Потенциал покоя в рабочем миокарде предсердия и миокарде легочной вены взрослых крыс при постоянной стимуляции значимо не отличался и составлял -83 ± 3 мВ ($n=10$) и -82 ± 4 мВ ($n=15$), соответственно.

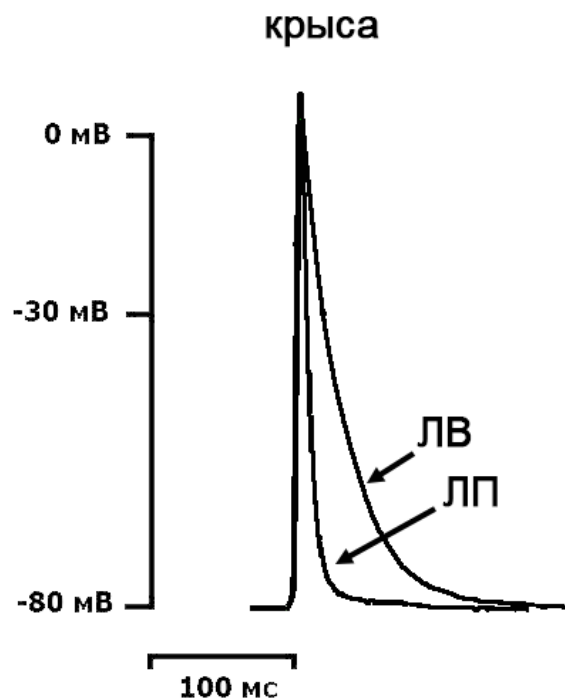


Рис. 3.1. Репрезентативные примеры электрически вызванных потенциалов действия в миокардиальной ткани легочных вен (ЛВ) и левого предсердия (ЛП) взрослых крыс.

Прекращение ритмической стимуляции в препаратах ЛВ взрослых крыс во всех экспериментах приводило к спонтанному сдвигу потенциала покоя в сторону положительных значений (деполяризации ПП). Такое изменение мембранного потенциала наблюдается в базальных условиях, то есть без каких-либо дополнительных воздействий. В результате, в покое (т.е. при отсутствии навязываемого ритма) миокарде легочных вен потенциал

покоя составлял в среднем -65 ± 7 мВ, что существенно отличается от значения ПП в покоемшемся рабочем миокарде предсердия ($n=20$, $p<0,01$ при сравнении с ПП в левом предсердии) (Рис.3.2.). В рабочем миокарде предсердий спонтанной деполяризации ПП никогда не наблюдали, более того, прекращение ритмической стимуляции приводило в ряде случаев к кратковременной гиперполяризации на $3,5 \pm 1$ мВ. Спонтанный сдвиг потенциала покоя начинал развиваться сразу после прекращения навязывания ритма, мембранный потенциал стабилизировался на новом уровне в течение 2-5 минут, после чего, на протяжении всего периода отсутствия ритмической стимуляции оставался на постоянном уровне. Возобновление ритмической стимуляции приводило к восстановлению ПП до -82 ± 4 мВ (Рис. 3.3.).

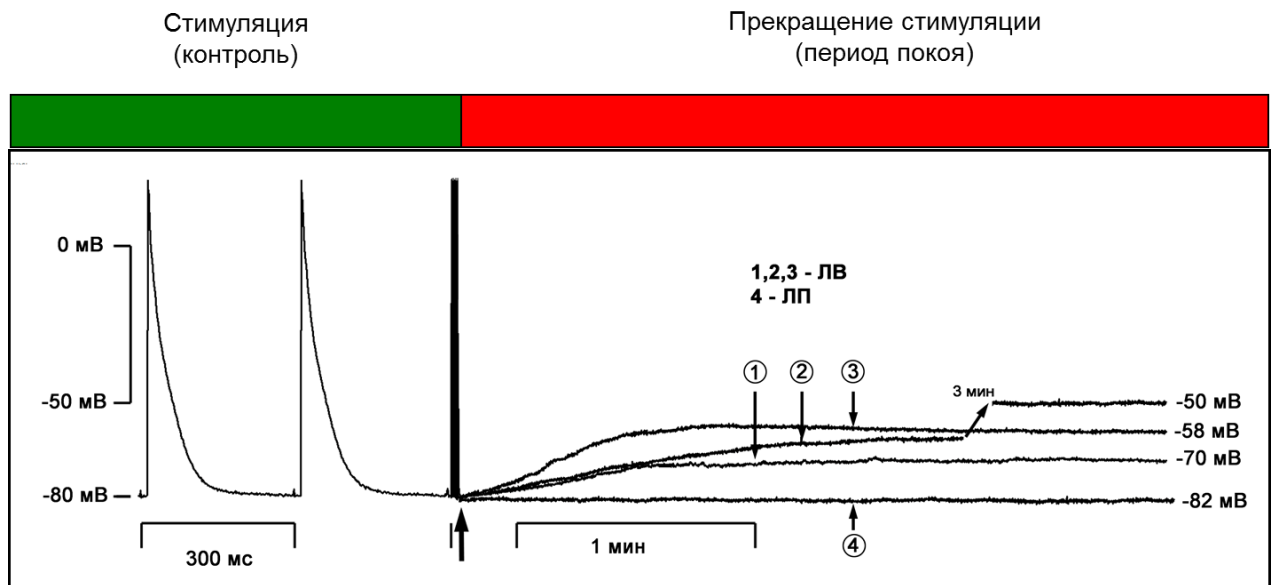


Рис. 3.2. Репрезентативные примеры потенциалов действия (слева) и потенциала покоя (справа) в миокарде легочных вен крысы. "1"- "3" - сдвиг потенциала покоя в миокарде легочных вен крысы в разных экспериментах. "4"- потенциал покоя в миокарде левого предсердия. Стрелкой указан момент прекращения стимуляции препарата легочных вен (левого предсердия).

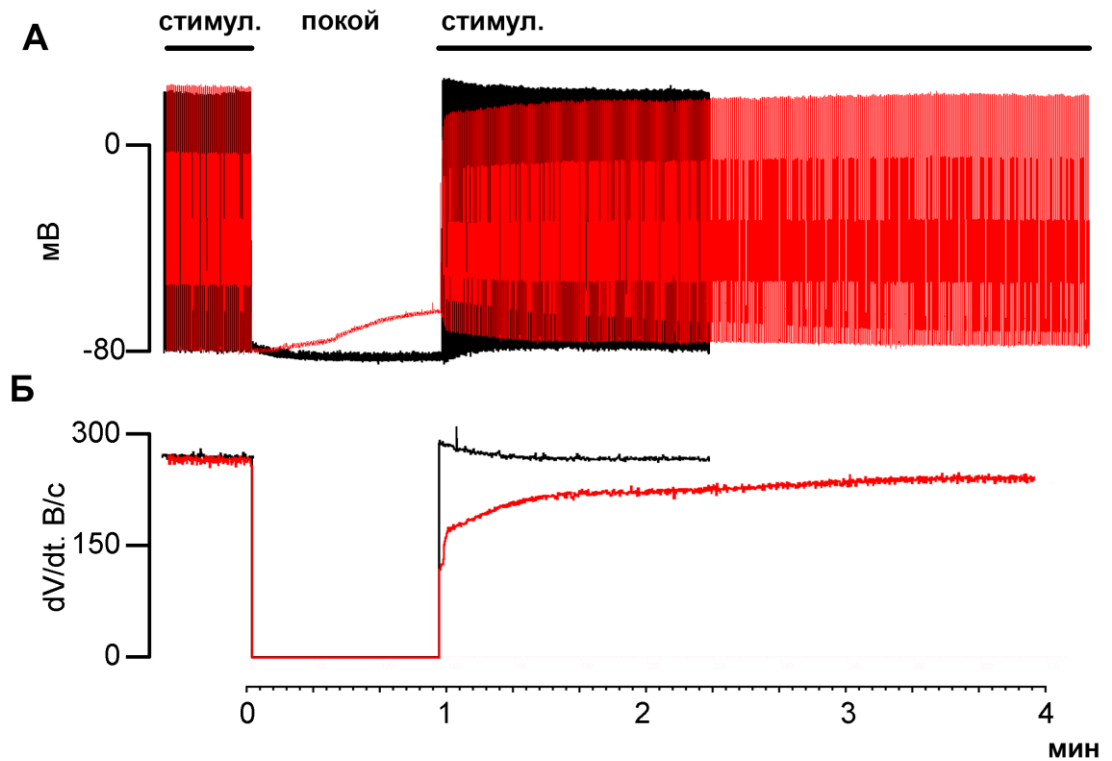


Рис. 3.3. А. Репрезентативные примеры изменения потенциала покоя в препаратах легочных вен (красная кривая) и левого предсердия (черная кривая) при прекращении и возобновлении ритмической электрической стимуляции. Б. Изменение максимальной скорости деполяризации электрически вызванных ПД в препаратах ЛВ (красная кривая) и левого предсердия (черная кривая) при выключении электрической стимуляции и ее возобновлении.

Для покоящегося миокарда легочных вен взрослых крыс в базальных условиях не характерны спонтанные потенциалы действия либо автоматическая «пейсмекероподобная» активность. Единичные спонтанные потенциалы действия могут возникать только в части препаратов во время периода спонтанной деполяризации, однако, они прекращаются спустя 3-5 мин и стабилизации ПП.

3.2. Изменение биоэлектрической активности миокардиальной ткани легочных вен крыс в ходе раннего постнатального онтогенеза

3.2.1. Потенциал действия и потенциал покоя в легочных венах крыс на разных этапах постнатального развития

Биоэлектрическая активность в миокарде легочных вен была исследована у крыс следующих возрастов: новорожденные (1Д), в возрасте 7, 14, 21 дней (7Д, 14Д, 21Д), а также у взрослых крыс (60Д).

В наших экспериментах электрически вызванные ПД предсердного типа в ЛВ наблюдали на всех вышеописанных этапах постнатального развития (Рис. 3.4.). Таким образом, уже начиная с первых суток постнатального развития, миокардиальная ткань ЛВ способна отвечать на электрическую стимуляцию потенциалами действия, конфигурация которых сходна с таковой в рабочем миокарде предсердий. ДПД90% в препаратах ЛВ, полученных от крыс в возрасте 1Д, 7Д, 14Д, 21Д, 60Д, составила 37 ± 11 (n=9), 20 ± 5 (n=6), 22 ± 4 (n=6), 27 ± 3 (n=5) и 55 ± 6 мс (n=5), соответственно (Рис.3.5.А). ДПД50% у крыс тех же возрастных групп составила 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.3.5.Б). Таким образом, по мере постнатального развития длительность ПД в легочных венах увеличивается (за исключением 1-го дня постнатальной жизни). Наибольшую длительность, таким образом, имеют ПД у взрослых животных при сопоставлении в интервале от 7-го до 60-го дня постнатального развития,

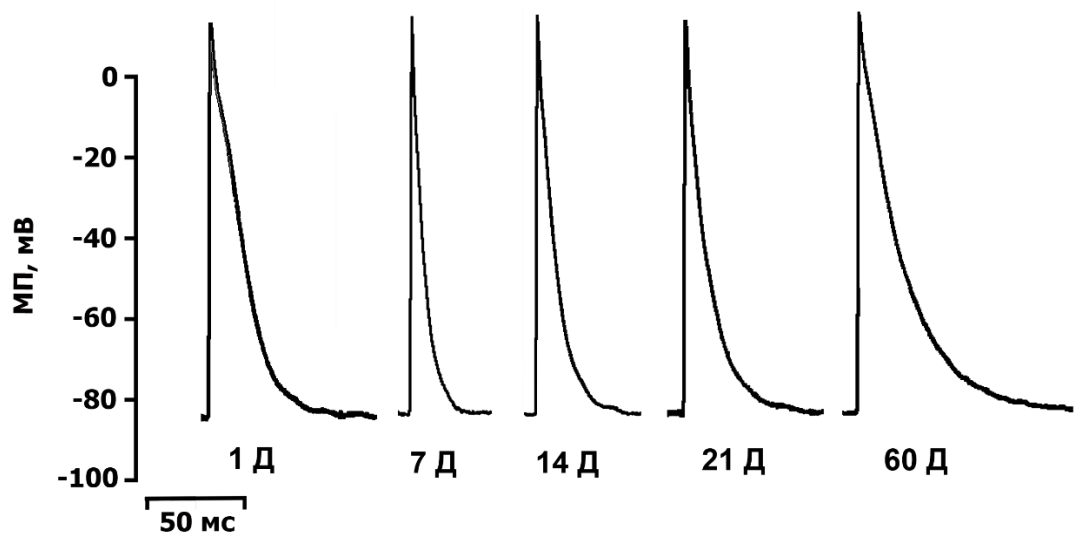


Рис. 3.4. Репрезентативные примеры изменения конфигурации ПД в миокарде ЛВ у крыс разного возраста. 1Д - новорожденные, 7Д – крысы 7-дневного возраста, 14Д – крысы 14-дневного возраста, 21Д – крысы 21-дневного возраста, 60Д – взрослые крысы.

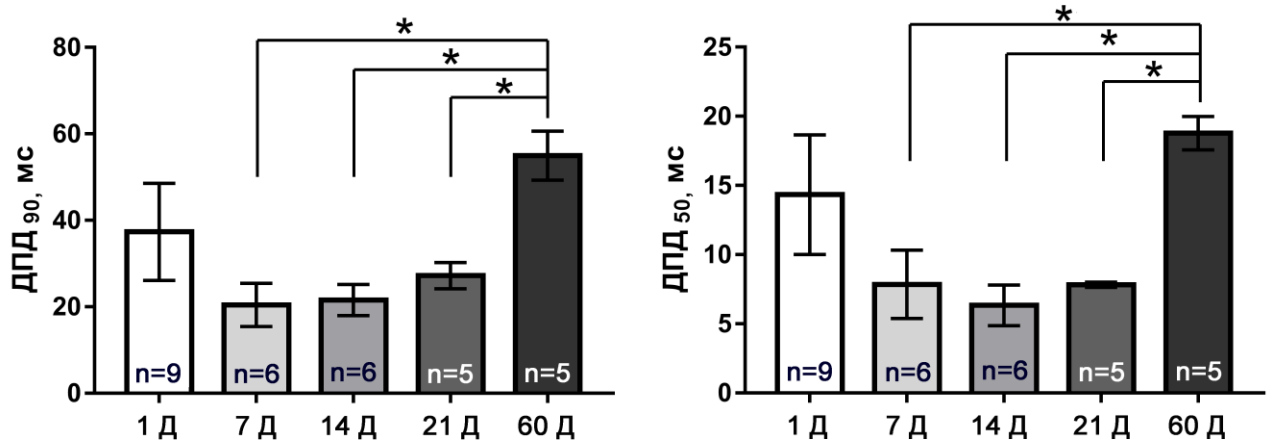


Рис. 3.5. Длительность ПД на уровне 90% (А) и 50% (Б) реполяризации в миокардиальной ткани ЛВ у крыс разного возраста. 1Д - новорожденные, 7Д – крысы 7-дневного возраста, 14Д – крысы 14-дневного возраста, 21Д – крысы 21-дневного возраста, 60Д – взрослые крысы. * - $p < 0,05$ (ANOVA) в сравнении с группой «60Д».

Потенциал покоя регистрировали как в электрически стимулируемых, так и в покоящихся препаратах ЛВ у крыс всех возрастных групп (Рис 3.6., 3.7.).

В условиях ритмической электрической стимуляции в ЛВ новорожденных крыс ПП составил -88 ± 4 мВ ($n=5$), а в отсутствие таковой- -87 ± 4 мВ ($n=5$). Следует отметить, что для подавляющего большинства тканевых препаратов, полученных от крыс в первый день жизни, характерна спонтанная активность в форме регулярно и непрерывно следующих потенциалов действия. Частота спонтанных ПД в легочных венах новорожденных крыс составляла $2,8 \pm 1$ Гц, что является лишь немногим меньше экспериментально навязываемой с помощью стимулирующих электродов (3,3 Гц). Поэтому прекращение навязывания ритма с помощью электрической стимуляции не приводило к переходу миокардиальной ткани в покоящееся состояние. Спонтанная активность отсутствовала в нестимулируемых легочных венах новорожденных животных только в 2-х случаях. В одном случае после прекращения стимуляции ПП не изменялся, во втором происходила деполяризация на 2,5 мВ (Рис.3.6., 3.7.). Таким образом, оценка уровня ПП в нестимулируемых легочных венах новорожденных является условной.

У крыс в возрасте 7Д ПП в препаратах ЛВ при стимуляции был -86 ± 6 мВ ($n=9$), а в отсутствие стимуляции -83 ± 6 мВ ($n=12$). В препаратах легочных вен от крыс возрастом 7 сут регулярной автоматической активности уже не наблюдали. Однако, спонтанная деполяризация потенциала покоя, характерная для миокарда ЛВ взрослых животных, в миокарде легочных вен данной возрастной группы отсутствовала. В электрически стимулируемых препаратах ЛВ крыс возраста 14Д ПП составил -87 ± 3 мВ ($n=6$), в покоящихся препаратах -81 ± 6 мВ ($n=6$),

соответственно, при прекращении стимуляции наблюдалась небольшая деполяризация мембранного потенциала - в среднем на 7 ± 4 мВ, однако она не являлась статистически значимой. В препаратах ЛВ крыс 21-дневного возраста при электрической стимуляции ПП составлял -83 ± 10 мВ ($n=5$). При отключении стимуляции наблюдали статистически значимую деполяризацию мембранного потенциала - в среднем на 15 мВ ($n=5$, $p<0,05$), ПП при этом составил -68 ± 6 мВ ($n=6$). У взрослых крыс ПП в электрически стимулируемых препаратах составил в данной серии экспериментов -83 ± 6 ($n=10$). Прекращение ритмической стимуляции также вызывало в таких препаратах спонтанный сдвиг потенциала покоя в сторону положительных значений. В покоем миокарде ЛВ взрослых крыс, ПП (как указано в предыдущем разделе) составлял в -62 ± 5 ($n=7$).

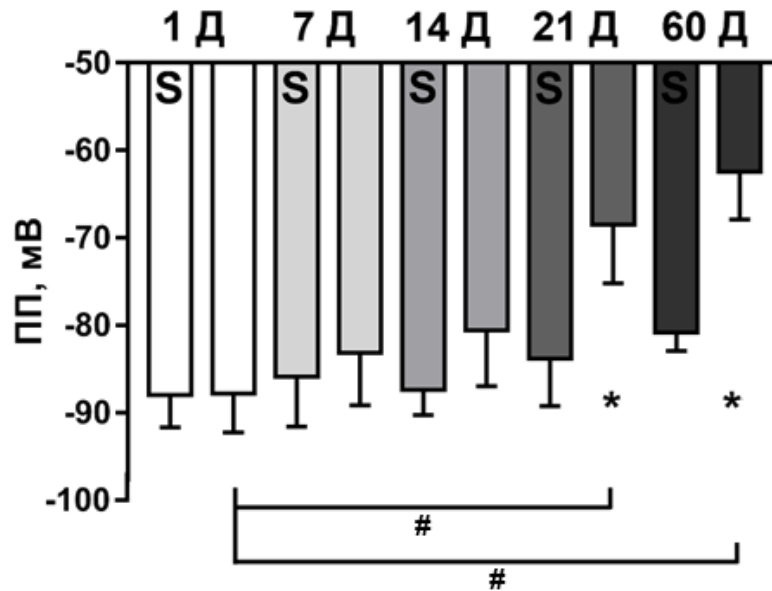


Рис. 3.6. Потенциал покоя в стимулируемых (S) и покоящихся (нестимулируемых) препаратах миокардиальной ткани легочных вен крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза. 1Д - новорожденные, 7Д – крысы 7-дневного возраста, 14Д – крысы 14-дневного возраста, 21Д – крысы 21-дневного возраста, 60Д – взрослые крысы. * - $p<0,05$ (парный t-тест Стьюдента). # - $p<0,05$ (ANOVA) в сравнении с группой «1Д».

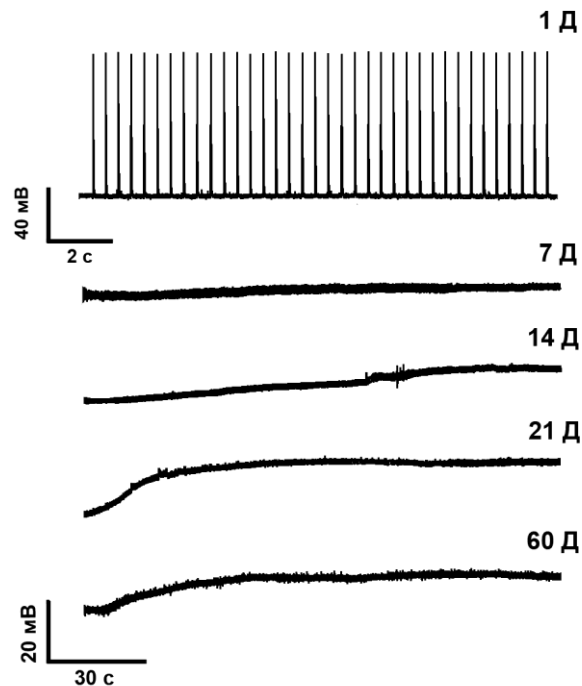


Рис.3.7. Репрезентативные примеры изменения потенциала покоя в миокардиальной ткани ЛВ крыс (после прекращения электрической стимуляции препарата), наблюдаемого после прекращения ритмической стимуляции, показанные для разных этапов постнатального онтогенеза. 1Д – пример спонтанной автоматической активности в легочных венах новорожденных крыс. Для легочных вен крыс возрастом 21 и 60 дней характерна деполяризация потенциала покоя.

3.2.2 Спонтанная (автоматическая) активность в легочных венах крыс на разных этапах постнатального развития

В данной серии экспериментов оценивали предрасположенность миокарда легочных вен к спонтанной автоматической активности на разных этапах постнатального онтогенеза. У новорожденных крыс в 80% случаев (8 из 10 препаратов) наблюдали спонтанные ПД, которые появлялись сразу после прекращения электрической стимуляции, сохранялись на протяжении всего времени записи.

В препаратах ЛВ крыс 7-, 14-, 21-дневного возраста и у взрослых крыс спонтанной автоматической активности такого типа, как у новорожденных животных не наблюдали. В препаратах ЛВ крыс возрастом 7 и более суток после прекращения электрической стимуляции могли возникать спонтанные ПД, однако они имели одиночный и нерегулярный характер (их частота составляла не более 10 ПД за 3 мин), такие ПД обычно прекращались через 2-3 минуты после прекращения электрической стимуляции. У крыс возрастом 7Д единичные спонтанные

ПД возникали в 2 из 14 препаратов, а у крыс возраста 14Д, 21Д и 60Д спонтанную активность наблюдали в одном из 10, 11 и 20 препаратов, соответственно (Рис.3.8.). Таким образом, миокард легочных вен крысы на всех этапах постнатального развития, за исключением 1-х суток жизни, не склонен к формированию автоматической активности в контрольных (базальных) условиях.

Наблюдаемую в миокарде легочных вен новорожденных крыс автоматическую активность обозначили как «базальная автоматия первых суток». Следует подчеркнуть, что этот тип активности, видимо, имеет иную природу, чем спонтанная активность, вызываемая катехоламинами в легочных венах и рассмотренная в следующих разделах.

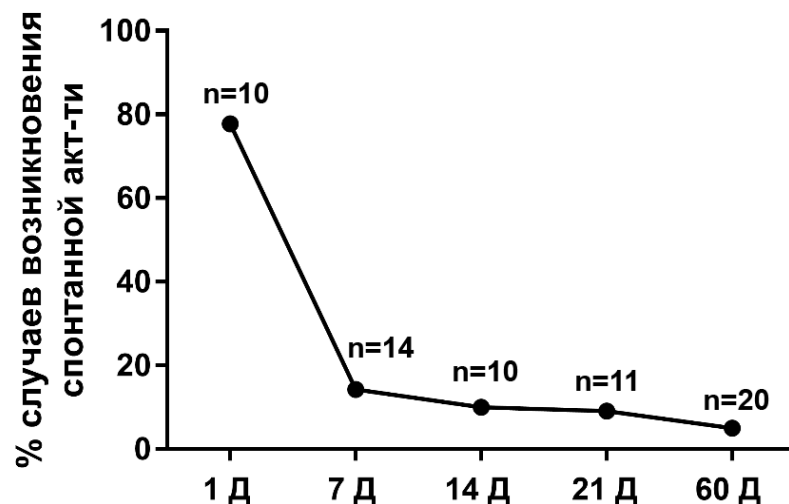


Рис. 3.8. Спонтанная (автоматическая) активность в миокарде легочных вен крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза, наблюдаемая в контрольных условиях.

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

Для изучения эффектов активации адренорецепторов на биоэлектрическую активность миокарда ЛВ крыс использовали эндогенный (неселективный) агонист адренорецепторов норадреналин, селективный агонист β -адренорецепторов изопротеренол и агонист α_1 -адренорецепторов фенилэфрин.

3.3.1. Влияние норадреналина на биоэлектрическую активность в легочных венах на разных этапах постнатального онтогенеза

У новорожденных крыс норадреналин (НА, 10 мкМ) не вызвал значимого изменения характера спонтанной автоматической активности (т.е. базальной автоматии первых суток), присутствующей в препаратах изначально. Например, частота следования спонтанных ПД в

контрольных условиях составляла $2,8 \pm 4$ ($n=8$), то при действии НА - $3,2 \pm 5$ Гц ($n=7$). В случае, если такой активности не было (20% препаратов: 2 из 10), то НА в данной концентрации не оказывал никакого влияния на ПП. Потенциалы действия и в контроле и при действии НА не имели фазы медленной диастолической деполяризации (МДД).

У крыс 7-дневного возраста НА вызывал какие-либо изменения электрической активности только в 20% случаев (2 препарата из 10), что проявлялось в индукции редких спонтанных ПД, без фазы МДД, следующих с частотой не более 0,9 Гц (Рис.3.9., верхняя панель). В остальных случаях (8 препаратов из 10) НА не вызывал никаких изменений потенциала покоя и не приводил к возникновению спонтанной активности, а в случае наличия единичных спонтанных ПД не учащал их следования.

В миокарде легочных вен крыс 14-дневного возраста НА вызывал спонтанную активность в 33% (2 из 6) случаев, в одном случае потенциалы действия имели фазу МДД, в другом – нет. В остальных препаратах не наблюдали никаких эффектов НА. В тех случаях, когда НА вызывал спонтанную активность, она имела регулярный перманентный характер; частота следования ПД составила в одном случае 6 Гц, во втором – 3 Гц (Рис.3.9.).

В препаратах ЛВ крыс в возрасте 21 сут НА вызывал спонтанную активность уже в 100% случаев. Спонтанная активность имела как периодический залповый (или «пачечный», 5 из 8 случаев, максимальная частота следования ПД в пачке составила $3,3 \pm 1$ Гц), так и регулярный перманентный (3 из 8 случаев, частота - 2 ± 1 Гц) характер (Рис.3.9.). За исключением одного случая, потенциалы действия при регулярном характере активности имели фазу МДД.

В миокардиальных препаратах ЛВ взрослых крыс при действии НА также наблюдали спонтанную активность в 100% случаев. Она также имела как регулярный (6 из 12 случаев), так и периодический залповый характер (6 из 12 случаев, Рис.3.9., 3.10.). Частота ПД при регулярной спонтанной активности составляла $3 \pm 0,5$ Гц ($n=17$). Средние значения ДПД90% и ДПД50% при такой активности составили 48 ± 7 мс и 23 ± 5 мс, соответственно. Следует отметить, что только в половине случаев спонтанные потенциалы действия имели фазу МДД.

В случае залповой активности спонтанные ПД чередовались с периодами покоя. Длительность залпов спонтанных ПД варьировала от 10 до 140 с (в среднем, 54 ± 15 с). Количество ПД в пачке также имело широкий диапазон значений: от 33 до 348 (в среднем 125 ± 37). Продолжительность периодов покоя между залпами составила 44 ± 12 с, максимальная частота следования ПД в «пачке» составляла $4 \pm 0,3$ Гц, а максимальное значение $dV/dt_{\max}$ - 15 ± 2 В/с (что на порядок ниже значения, характерного для электрически вызванных ПД в рабочем миокарде предсердий и миокарде легочных вен). Периоды покоя между залпами ПД сопровождалась медленной деполяризацией мембранного потенциала, а периоды спонтанной активности – постепенной гиперполяризацией ПП: в момент окончания последнего ПД в

«пачке» ПП имел наиболее отрицательное значение (Рис.3.9., 3.25., слева). Окончание залпа ПД, очевидно связано с тем, что ПП становится отрицательнее некоего критического уровня. Следует отметить, что во всех препаратах во время залпов («пачек») спонтанной активности в интервалах между очередными ПД потенциал покоя не оставался стабильным: наблюдалась медленная диастолическая деполяризация, которая могла иметь различную крутизну (пример на Рис.3.9. «60Д» справа). Следует отметить, что характеристики пачечной активности для возрастной группы «21Д» статистически не отличались, от таковых в группе «60Д».

Спонтанная активность в ЛВ взрослых крыс сохранялась на протяжении всего времени перфузии раствором, содержащим НА, а также в течение 10-15 минут после прекращения действия НА.

Возникновению спонтанной активности при действии НА в миокарде ЛВ взрослых крыс предшествовало двухфазное изменение мембранного потенциала: сначала в течение $1 \pm 0,5$ мин развивалась гиперполяризация, которая составляла 6 ± 2 мВ ($n=12$), затем период гиперполяризации сменяла постепенно нарастающая деполяризация. В ходе деполяризации, вызванной НА, ПП мог достигать уровня -60 мВ, (в среднем -65 ± 5 мВ, $n=12$, Рис.3.10.). Залпы спонтанных потенциалов действия всегда начинались в фазу деполяризации.

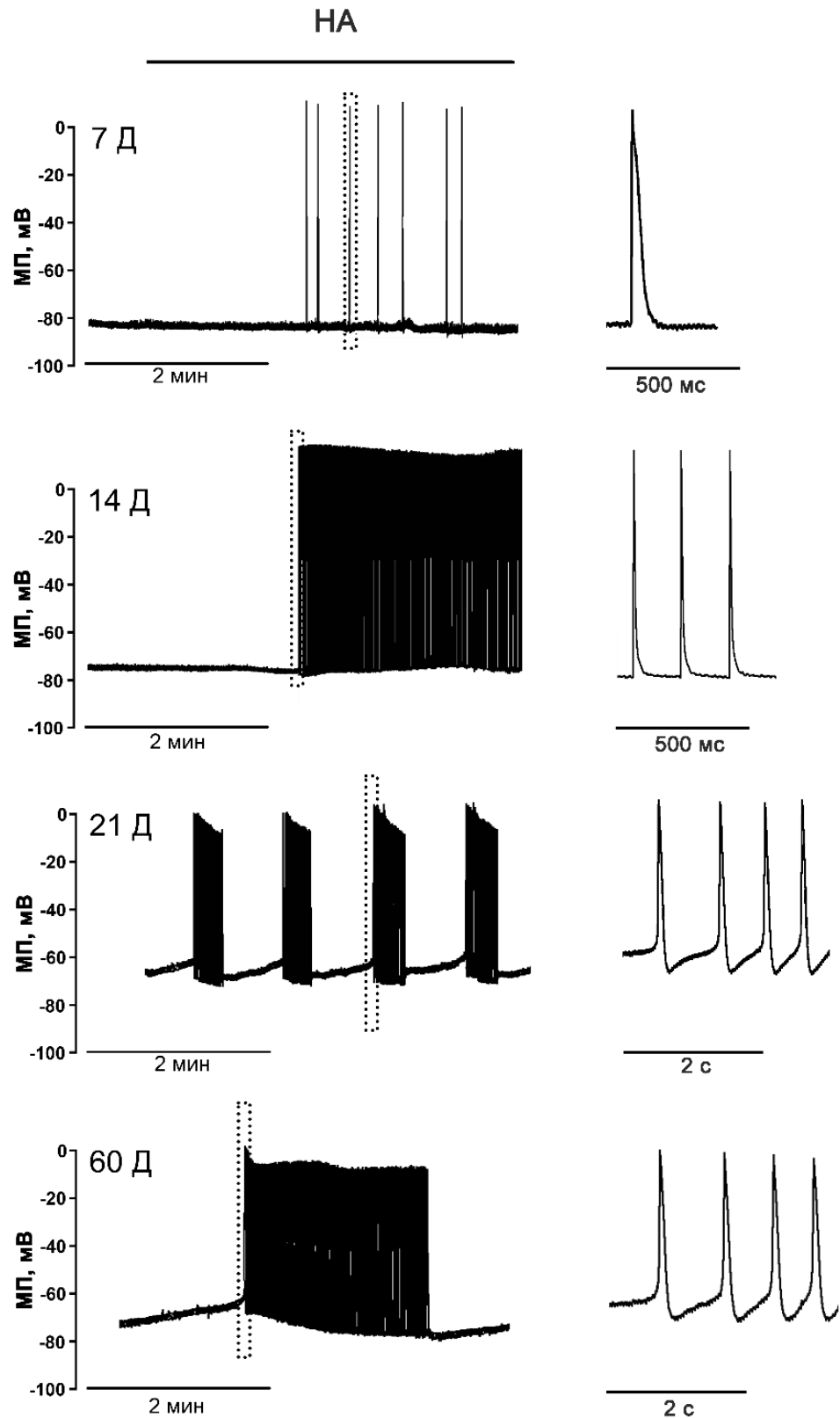


Рис. 3.9. Репрезентативные примеры спонтанной активности, возникающей при действии норадреналина (10 мкМ), в препаратах легочных вен крыс на разных этапах постнатального онтогенеза. Справа показаны записи спонтанных ПД при большой развертке по времени, и соответствующие периодам, выделенным пунктиром на левых панелях.

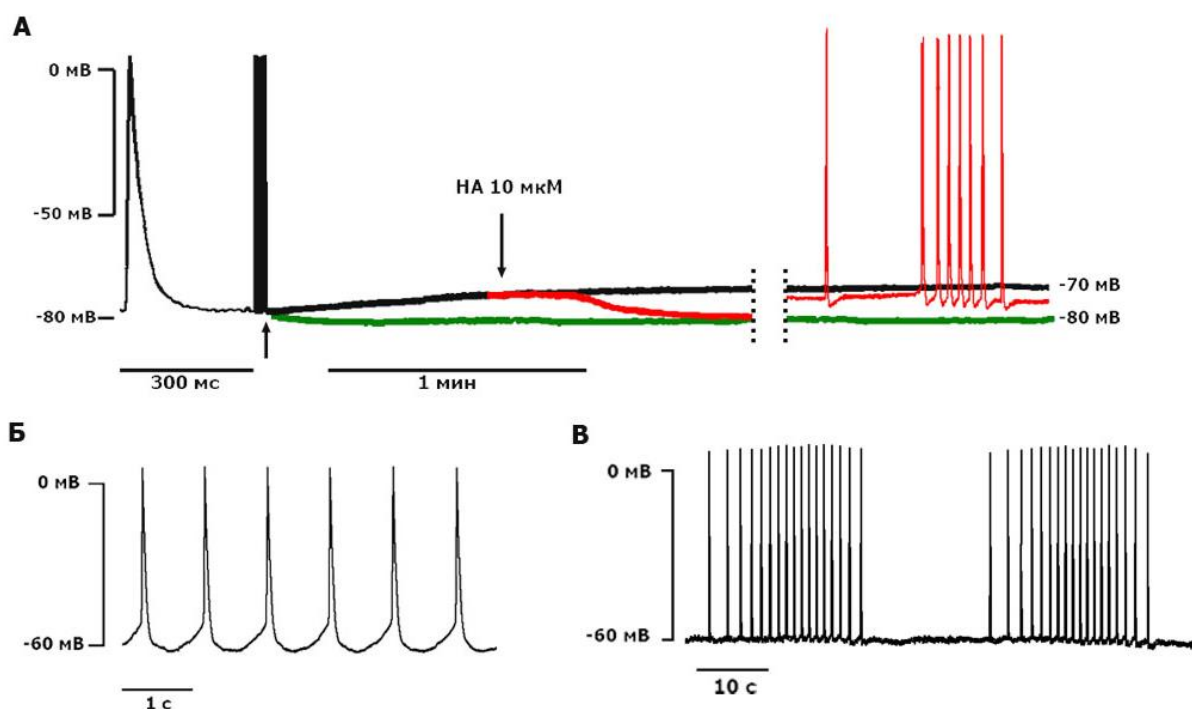


Рис. 3.10. Пример спонтанной активности, а также изменения ПП в миокарде легочных вен взрослых крыс при действии норадреналина (НА, 10 мкМ). Пунктирными линиями обозначен разрыв записи в 3 мин. А – ПП в ЛВ в контрольных условиях (черный цвет), при действии НА (красный цвет). ПП в левом предсердии показан зеленым цветом; Б – регулярная спонтанная активность в ЛВ при действии НА сопровождаемая медленной диастолической деполяризацией; В – залповая активность в ЛВ при действии НА.

3.3.2. Влияние фенилэфрина и изопротеренола на биоэлектрическую активность в легочных венах на разных этапах постнатального онтогенеза

Электрофизиологические эффекты селективных агонистов адренорецепторов – изопротеренола (ИЗО) и фенилэфрина (ФЭ), как и действие НА существенно различались в миокарде легочных вен крыс разных возрастов. Кратко, величина их эффекта возрастала в ходе постнатального развития: наибольшие эффекты данных соединений наблюдались у взрослых крыс, а наименьшие – на самых ранних этапах постнатального онтогенеза – до 7 дней.

Так в миокарде ЛВ новорожденных крыс ИЗО (10 мкМ) не оказывал никакого действия на ПП и спонтанную автоматическую активность, которая присутствует в этих препаратах в базальных условиях. У крыс 7-дневного возраста ИЗО вызывал гиперполяризацию ПП на 3 ± 2 мВ в 60% случаев (3 препарата из 5), в препаратах ЛВ крыс 14-дневного возраста ИЗО вызывал гиперполяризацию ПП на 5 ± 3 мВ в 80% случаев (в 3 препаратах из 4), а в препаратах ЛВ крыс

21-дневного возраста - уже на 8 ± 2 мВ в 100% случаев ($n=5$). У взрослых крыс в данной серии экспериментов ИЗО вызывал гиперполяризацию на 11 ± 2 мВ ($n=5$) во всех препаратах. Изменение ПП при действии ИЗО было статистически значимым только в препаратах ЛВ крыс в возрасте 21 сут и у взрослых крыс ($p < 0,05$, Рис.3.11.).

В препаратах ЛВ крыс 21-дневного возраста и у взрослых крыс эффект изопротеренола начинал развиваться сразу после начала действия и достигал своего максимума через 2-3 мин. В ходе всего периода перфузии, раствором, содержащим ИЗО после достижения максимального эффекта, ПП оставался на стабильном "гиперполяризованном" уровне. Изопротеренол не вызывал спонтанной активности ни в одном из препаратов ЛВ, полученных от крыс возрастом 7-60 суток.

Как и изопротеренол, фенилэфрин (10 мкМ) не оказывал действия на биоэлектрическую активность у новорожденных крыс, а в препаратах ЛВ остальных возрастных групп вызывал противоположный ИЗО эффект - деполяризацию ПП. В легочных венах крыс возрастом 7 сут, ФЭ вызывал деполяризацию на 3 ± 1 мВ (в 50% случаев, в 2 препаратах из 4), у крыс 14-дневного возраста - на 9 ± 6 мВ (в 3 препаратах из 4), у крыс 21-дневного возраста - на 14 ± 2 мВ ($n=4$, во всех случаях), тогда как у взрослых крыс на 17 ± 2 мВ ($n=8$, во всех экспериментах). Изменение мембранного потенциала при действии ФЭ было статистически значимым только в препаратах ЛВ крыс возрастом 21 дня и у взрослых животных ($p < 0,05$, Рис.3.11.). Эффект начинал проявляться через 3-4 минуты после начала действия ФЭ и развивался в течение всего времени действия агониста. Спонтанная активность в миокарде ЛВ при действии ФЭ не возникала ни в одном из экспериментов.

Эксперименты с фенилэфрином позволяют предположить, что активация α_1 -адренорецепторов является необходимой для индукции спонтанной активности норадреналином. Для инициации спонтанной активности в ЛВ, очевидно 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 ПД.

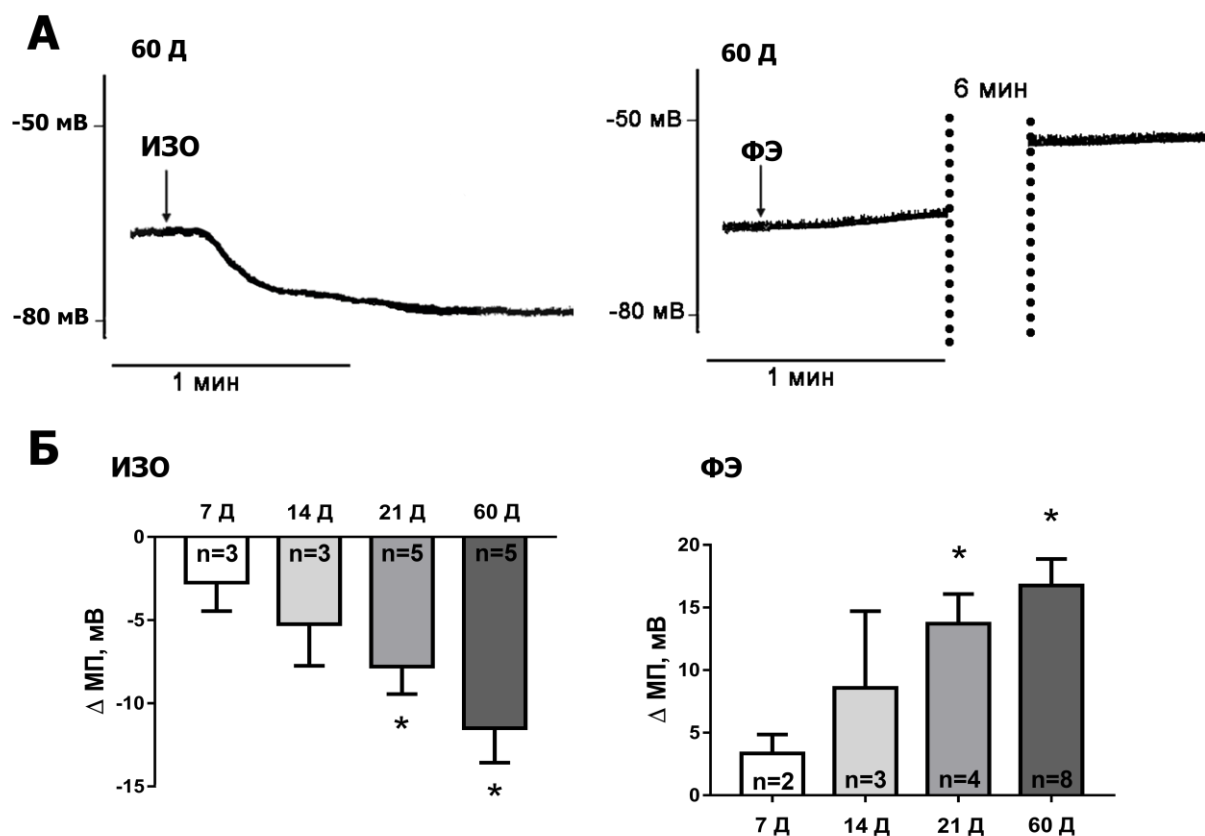


Рис. 3.11. Влияние агониста α_1 -адренорецепторов фенилэфрина (ФЭ, 10 мкМ) и агониста β -адренорецепторов изопротеренола (ИЗО, 10 мкМ) на потенциал покоя в миокарде ЛВ крыс на разных этапах постнатального онтогенеза. А – репрезентативные примеры изменения потенциала покоя при действии селективных агонистов адренорецепторов в препаратах ЛВ взрослых крыс. Б – изменение мембранного потенциала покоя (Δ МП) в миокарде легочных вен крыс разных возрастов при действии ИЗО и ФЭ. 7Д – крысы 7-дневного возраста, 14Д – крысы 14-дневного возраста, 21Д – крысы 21-дневного возраста, 60Д – взрослые крысы. * - $p < 0,05$ (по сравнению со значением ПП в контрольных условиях, парный t-тест).

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

На данном этапе работы мы попытались выяснить механизмы, лежащие в основе эффектов норадреналина (адренергической стимуляции) в легочных венах. Поскольку электрофизиологические эффекты НА очевидно складываются преимущественно из эффектов активации α_1 - и β_1 -адренорецепторов, выражающихся в деполяризации и, соответственно, гиперполяризации ПП, то отдельно проводили эксперименты, направленные на выяснение механизмов действия этих двух явлений. Выяснение механизмов адренергических эффектов в миокарде легочных вен проводили на примере взрослых крыс.

3.4.1. Эксперименты, направленные на выяснение механизмов деполяризации, вызванной активацией α_1 -адренорецепторов в легочных венах

Основное внимание было направлено на роль фосфолипаз C и D, протеинкиназы C, а также на роль некоторых ионных каналов.

Влияние ингибиторов PLC и PLD на потенциал покоя и деполяризацию, вызванную фенилэфрином в легочных венах

Одним из элементов внутриклеточного каскада, активируемого α_1 -адреностимуляцией, является фосфолипаза. В нашей работе мы использовали блокаторы фосфолипазы C U-73122 (0,5 мкМ) и блокатор фосфолипазы D FPLI (0,1 мкМ).

Каждый из блокаторов добавляли в перфузионный раствор после прекращения стимуляции и стабилизации ПП в миокарде ЛВ взрослых крыс. Оба блокатора не оказывали значимого влияния на уровень ПП в легочных венах (аппликация в течение 10 мин, $n=6$ и $p>0,5$ для U-73122; $n=5$ и $p>0,5$ для FPLI). На рисунке 3.12 (3-я секция) приведены записи ПП в ЛВ в контроле и при действии блокаторов фосфолипаз.

Также, ни блокатор PLC, ни блокатор PLD не подавляли деполяризацию, вызванную ФЭ. Фенилэфрин, в контрольных условиях в данной серии экспериментов, вызывал сдвиг мембранного потенциала на $20 \pm 2,3$ мВ, ФЭ на фоне блокатора PLC сдвигал мембранный потенциал на 18 ± 1 мВ ($n=6$, $p>0,5$), а на фоне блокатора PLD на 19 ± 2 мВ ($n=5$, $p>0,5$) (рис.3.12., четвертая секция).

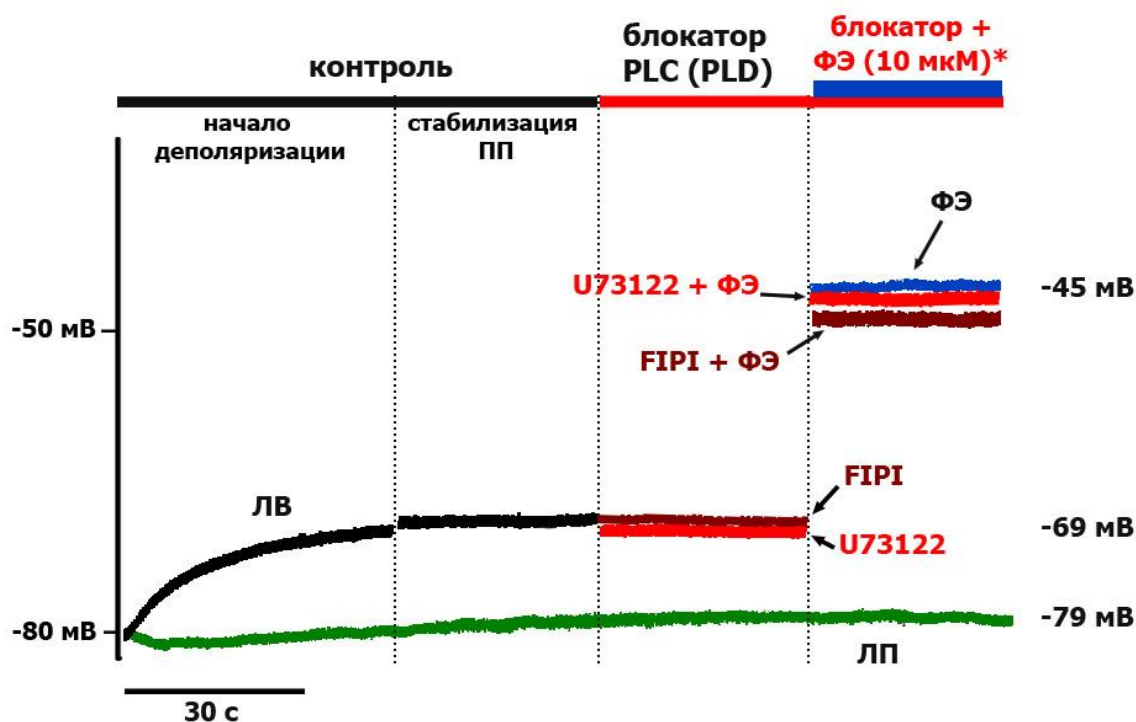


Рис. 3.12. Пример записи ПП в миокарде легочных вен (черный) и левого предсердия (зеленый) в контроле, при действии блокаторов PLC (U-73122, 0,5 мкМ, $n=6$) и PLD (FIP1, 0,1 мкМ, $n=5$), а также при действии блокаторов фосфолипаз на фоне фенилэфрина (10 мкМ). *- уровни ПП на 10-й минуте действия фенилэфрина. ЛВ - легочные вены, ЛП - левое предсердие.

Влияние ингибирования протеинкиназы С на ПП и деполяризацию, вызванную фенилэфрином в легочных венах

Протеинкиназа С является ключевым ферментом внутриклеточного каскада, связанного с α_1 -адренорецепторами. В качестве ингибитора протеинкиназы С использовали хелеритрин (1 мкМ). При самостоятельном действии, хелеритрин (аппликация в течение 7 минут после прекращения стимуляции и стабилизации ПП) не вызывал статистически значимого изменения потенциала покоя в миокарде легочных вен ($n=5$, ПП в контроле -67 ± 5 мВ, ПП при действии хелеритрина -65 ± 5 мВ, $p > 0,5$, Рис.3.13.). Хелеритрин также не оказывал влияния на деполяризацию ПП, вызванную фенилэфрином (10 мкМ) в легочных венах. Фенилэфрин, в контрольных условиях в данной группе экспериментов, вызывал сдвиг мембранного потенциала на 19 ± 3 мВ, а деполяризация ПП, вызванная ФЭ на фоне хелеритрина, составляла 23 ± 2 мВ ($n=5$, $p > 0,5$).

В одном эксперименте хелеритрин при самостоятельном действии индуцировал спонтанную активность регулярного характера (Рис. 3.14.А). В этом случае частота спонтанно возникающих ПД составляла 0,5 Гц. Также, в одном эксперименте хелеритрин вызывал

регулярную спонтанную активность в легочных венах на фоне фенилэфрина (Рис.3.14.Б). В данном случае ПД сопровождались послеполяризациями.

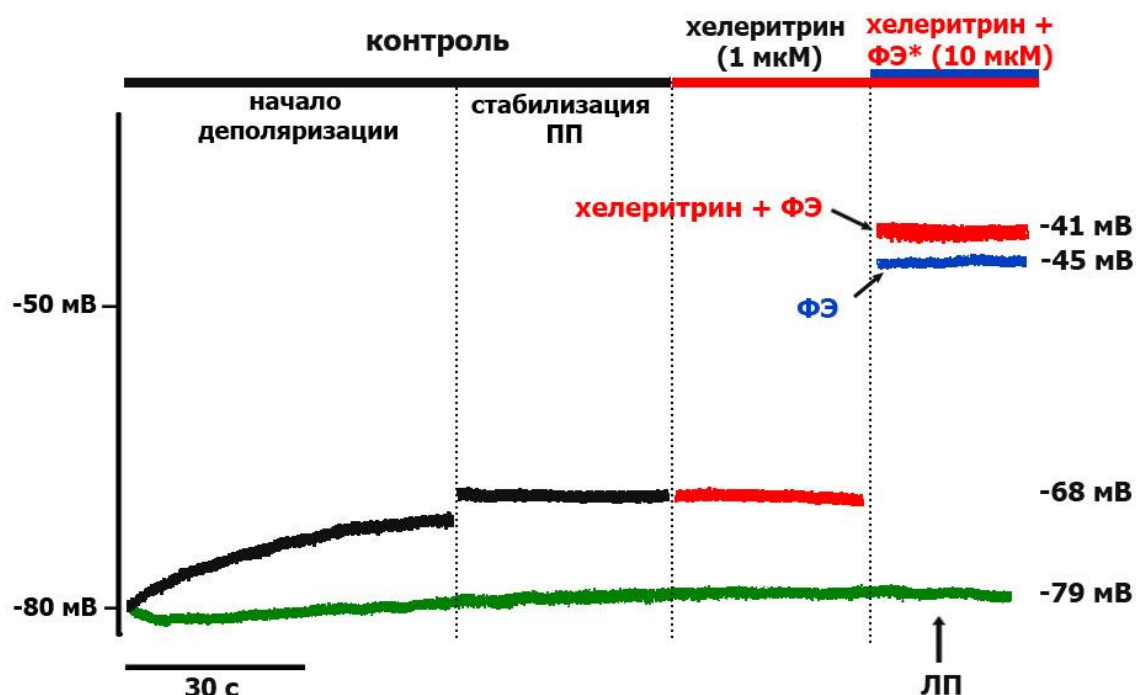


Рис. 3.13. Пример записи ПП в миокарде легочных вен (черный) и левого предсердия (зеленый) в контроле, при действии хелеритрина (1 мкМ, $n=5$) и его влияние на эффект фенилэфрина (ФЭ). *- уровни ПП на 10-й минуте действия фенилэфрина. ЛВ - легочные вены, ЛП - левое предсердие.

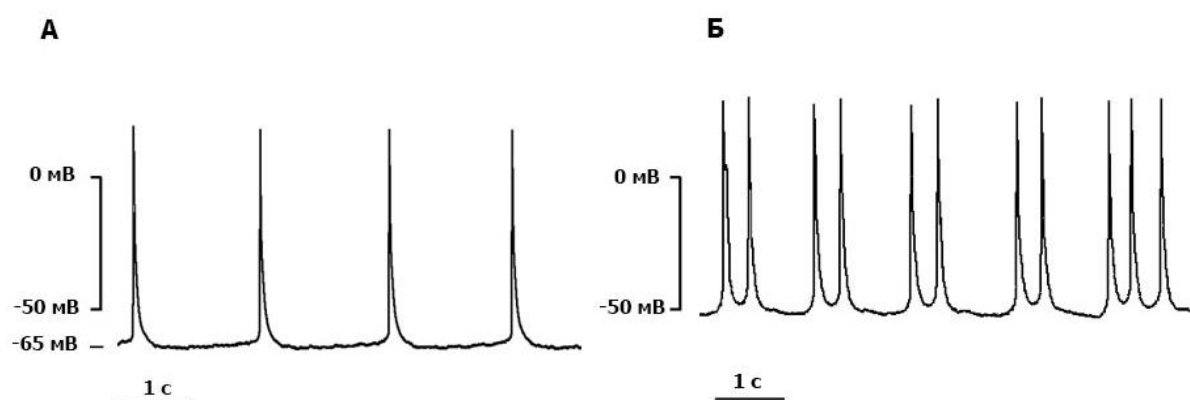


Рис. 3.14. Примеры спонтанной активности, возникающей в миокарде ЛВ при действии хелеритрина (1 мкМ, А) и фенилэфрина на фоне хелеритрина (Б).

Влияние блокады хлорной проводимости на ПП и деполяризацию, вызванную фенилэфрином в легочных венах

Сдвиг мембранного потенциала в положительную сторону при α_1 -адреностимуляции может быть обусловлен усилением выходящих деполяризующих хлорных токов, в том случае если равновесный потенциал для Cl^- (E_{CL}) положительнее ПП. Для выяснения роли данного типа ионных токов в деполяризации, вызываемой фенилэфрином в ЛВ, мы использовали неселективный блокатор хлорных каналов SITS. При самостоятельном действии SITS в покое миокарде легочных вен вызывал сдвиг потенциала покоя в сторону отрицательных значений – происходила гиперполяризация мембранного потенциала (Рис.3.15.). Этот эффект развивался в течение 2-3 минут. В концентрации 100 мкМ SITS вызывал гиперполяризацию ПП на $6,5 \pm 2$ мВ ($n=3$), и значение мембранного потенциала устанавливалось на уровне $-71,5 \pm 2$ мВ. Такое изменение ПП подкрепляет гипотезу о том, что в легочных венах E_{CL} положительнее ПП.

Тем не менее, SITS не подавлял деполяризацию ПП, вызываемую в ЛВ фенилэфрином (Рис.3.15.). В данной группе экспериментов, деполяризация, развивающаяся при действии ФЭ на фоне SITS оказалась незначительно больше (25 ± 3 мВ, $n=3$), чем таковая, наблюдаемая при самостоятельном действии ФЭ (на $20 \pm 2,3$ мВ).

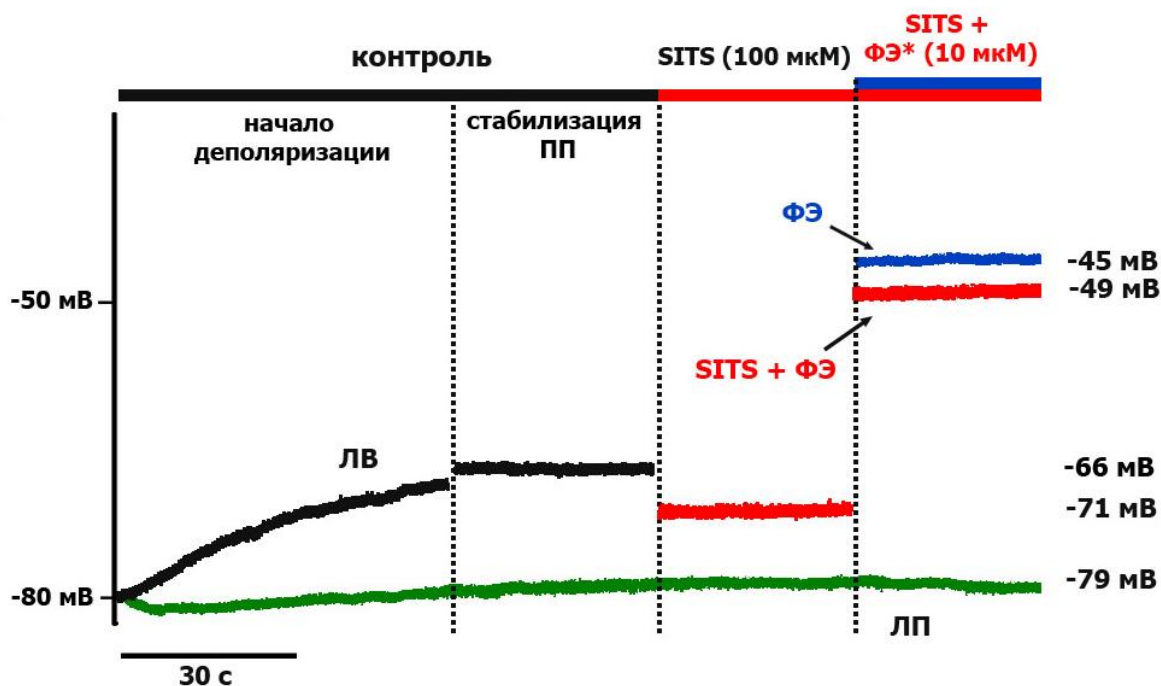


Рис. 3.15. Пример записи ПП в миокарде легочных вен (черный) и левого предсердия (зеленый) в контроле, при действии неселективного блокатора хлорной проводимости SITS (красный цвет, 100 мкМ, $n=4$), а также при действии SITS на фоне фенилэфрина. *- уровни ПП на 10-й минуте действия фенилэфрина. ЛВ - легочные вены, ЛП - левое предсердие.

3.4.2. Эксперименты, направленные на выяснение механизмов гиперполяризации, вызванной активацией β -адренорецепторов в легочных венах

Последующие эксперименты направлены на выяснение механизмов гиперполяризации в легочных венах, вызываемой активацией β -адренорецепторов.

Влияние блокады аденилатциклазы на ПП и гиперполяризацию, вызванную изопротеренолом в легочных венах

В качестве ингибитора аденилатциклазы использовали соединение MDL-12330A (MDL) в концентрации 10 мкМ. После прекращения стимуляции и стабилизации ПП, апплицируемый MDL в миокарде легочных вен вызывал деполяризацию на 9 ± 5 мВ ($n=5$, при действии MDL значение мембранного потенциала составляло -56 ± 5 мВ). Этот эффект MDL являлся статистически значимым ($p < 0,05$). Однако, изопротеренол (10 мкМ) на фоне блокатора аденилатциклазы вызывал практически такую же гиперполяризацию, что и при самостоятельном действии (ПП при действии ИЗО и MDL составлял -68 ± 3 мВ, Рис.3.16.). Таким образом, статистически значимого различия в величине сдвига мембранного потенциала, наблюдаемого при самостоятельном действии ИЗО (10 ± 2 мВ, $n=9$) и действии ИЗО на фоне MDL (12 ± 2 мВ), выявлено не было ($p > 0,5$). MDL не подавлял гиперполяризацию, вызываемую изопротеренолом (хотя мембранный потенциал при одновременном действии MDL и ИЗО оказывался близким к ПП, наблюдаемому в ЛВ в контрольных условиях).

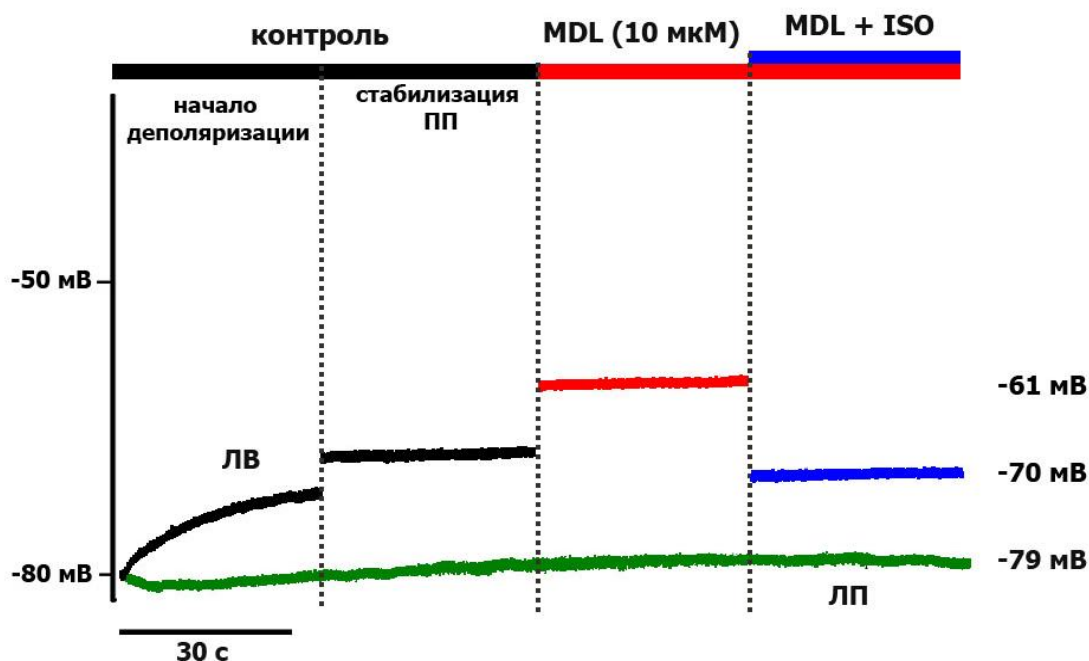


Рис. 3.16. Пример записи ПП в миокарде легочных вен (черный) и левого предсердия (зеленый) в контроле, при действии блокатора аденилатциклазы (MDL, красный цвет, 10 мкМ), а также изопротеренола (ISO) на фоне MDL. ЛВ - легочные вены, ЛП - левое предсердие.

Влияние активации аденилатциклазы на потенциал покоя в легочных венах

Помимо блокатора аденилатциклазы в работе мы использовали и активатор аденилатциклазы – форсколин (5мкМ). Аппликацию форсколина начинали после прекращения стимуляции ЛВ и стабилизации потенциала покоя. Форсколин вызывал гиперполяризацию мембранного потенциала в ЛВ на 11 ± 2 мВ ($n=6$). Этот эффект являлся статистически значимым ($p < 0,01$). Гиперполяризация, вызываемая форсколином, практически совпадает по величине с гиперполяризацией, вызываемой в ЛВ изопротеренолом (10 ± 2 мВ, $p > 0,5$, Рис.3.17., 3.18.).

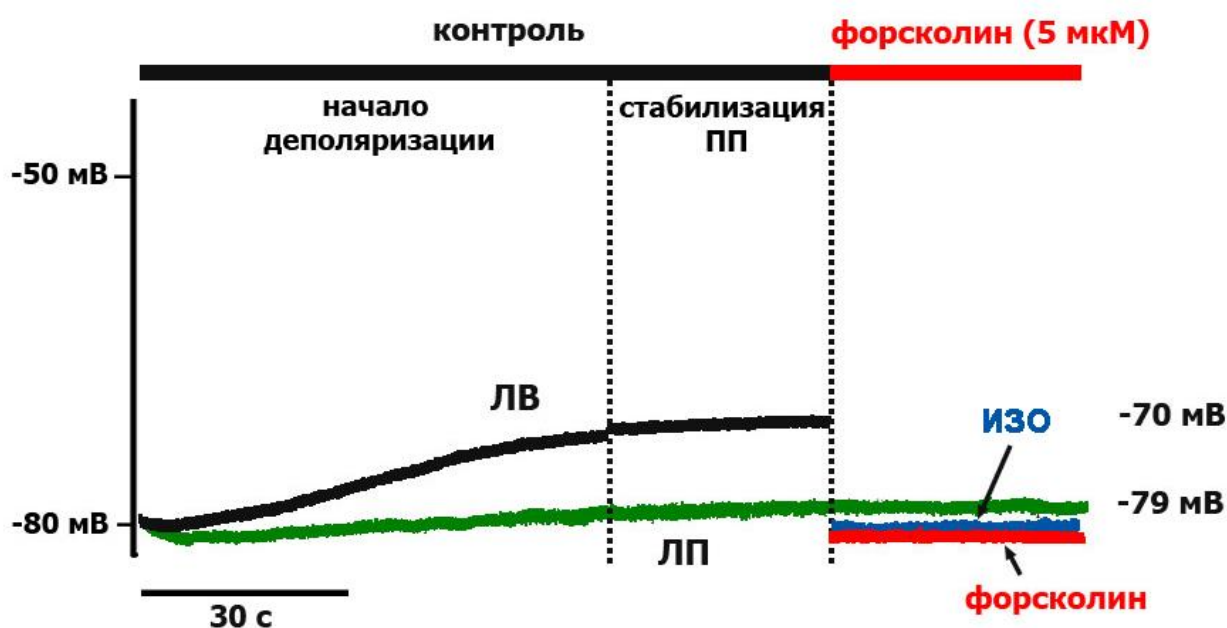


Рис. 3.17. Пример записи ПП в миокарде легочных вен (черный) и левого предсердия (зеленый) в контроле, при действии форсколина (красный цвет, 5 мкМ), а также изопротеренола (ИЗО) в ЛВ. ЛВ - легочные вены, ЛП - левое предсердие.

Влияние –неспецифического ингибитора фосфодиэстераз на ПП в легочных венах

При самостоятельном действии неселективный ингибитор фосфодиэстераз IBMX (10 мкМ) вызывал гиперполяризацию ПП в препаратах ЛВ крысы на 6 ± 3 мВ ($n=6$, $p < 0,05$, Рис.3.18.). Функционально, действие IBMX имитирует активацию аденилатциклазы, так как приводит к накоплению в цитоплазме цАМФ. Эксперименты с IBMX служат подкреплением предположению, что гиперполяризация, вызванная в легочных венах изопротеренолом, обусловлена накоплением цАМФ.

Влияние ингибирования протеинкиназы А на ПП и гиперполяризацию, вызываемую изопротеренолом в легочных венах

Для ингибирования РКА использовали несколько блокаторов Н-89, КТ5720 и Rp-adenosine-cAMP. Сами по себе блокаторы РКА не приводили к статистически значимому изменению ПП в легочных венах. Однако, все блокаторы существенно подавляли гиперполяризацию, вызванную изопротеренолом, при этом ПП сдвигался в положительную сторону от уровня, наблюдаемого при действии ИЗО. Наиболее сильный эффект наблюдался при действии ингибитора КТ5720 (0,1 мкМ), который вызывал снижение эффекта ИЗО на $67\pm4\%$ ($n=5$, Рис.3.18., $p<0,05$). Наиболее распространенный ингибитор РКА - Н-89 (5 мкМ) подавлял эффект ИЗО на $42\pm5\%$, а Rp-adenosine-cAMP (5 мкМ) на $30\pm3\%$ ($n=6$ для каждого из блокаторов, Рис.3.18., во всех случаях $p<0,05$).

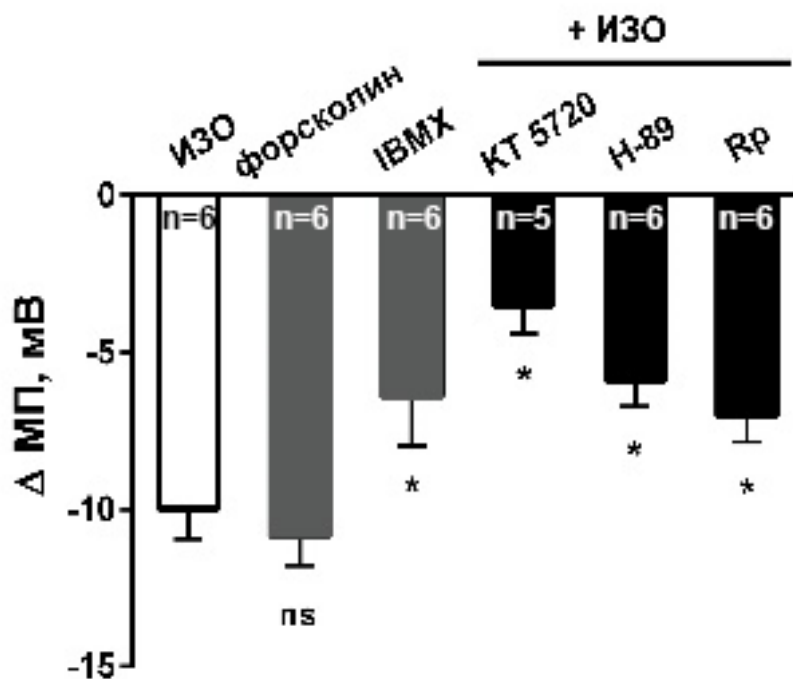


Рис. 3.18. Изменение мембранного потенциала (Δ МП) в легочных венах, вызванное изопротеренолом, форсколином, IBMX и изопротеренолом на фоне ингибиторов протеинкиназы А (РКА). * - $p<0,05$ (парный t-тест), ns – нет статистически значимых различий (по сравнению со значением при действии изопротеренола).

3.4.3. Роль цитоплазматического кальция в гиперполяризации, вызываемой активацией β -адренорецепторов в легочных венах

Хорошо известно, что одним из основных эффектов активации β -адренорецепторов в кардиомиоцитах является значительное повышение базального уровня цитоплазматического кальция ($[Ca^{2+}]_i$), а также усиление спонтанных и вызванных выбросов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулула. В связи с вышесказанным было предположено, что гиперполяризация, вызываемая изопротеренолом в легочных венах, частично или полностью обусловлена повышением уровня $[Ca^{2+}]_i$. Для подтверждения данной гипотезы, были проведены эксперименты, в которых использовали агенты, приводящие к увеличению $[Ca^{2+}]_i$ независимо от внутриклеточных сигнальных каскадов адренорецепторов.

Влияние рианодина и кофеина на потенциал покоя в легочных венах

Рианодин может оказывать разнонаправленное действие на рианодиновые рецепторы (RyR) саркоплазматического ретикулула (СПР): в наномолярных концентрациях он является агонистом, а в концентрациях свыше 100 мкМ – блокатором RyR (Thomas and Williams, 2012). Мы использовали рианодин в концентрации 0,01 мкМ для активации рианодиновых рецепторов СПР, стимуляции утечки, спонтанных выбросов и повышения уровня цитоплазматического кальция. При использовании в концентрации 0,01 мкМ рианодин в покоем миокарде легочных вен вызывал гиперполяризацию: потенциал покоя сдвигался на $4,1 \pm 2$ мВ ($n=4$) (Рис.3.19.). В покоем миокарде левого предсердия рианодин не вызывал никаких изменений ПП.

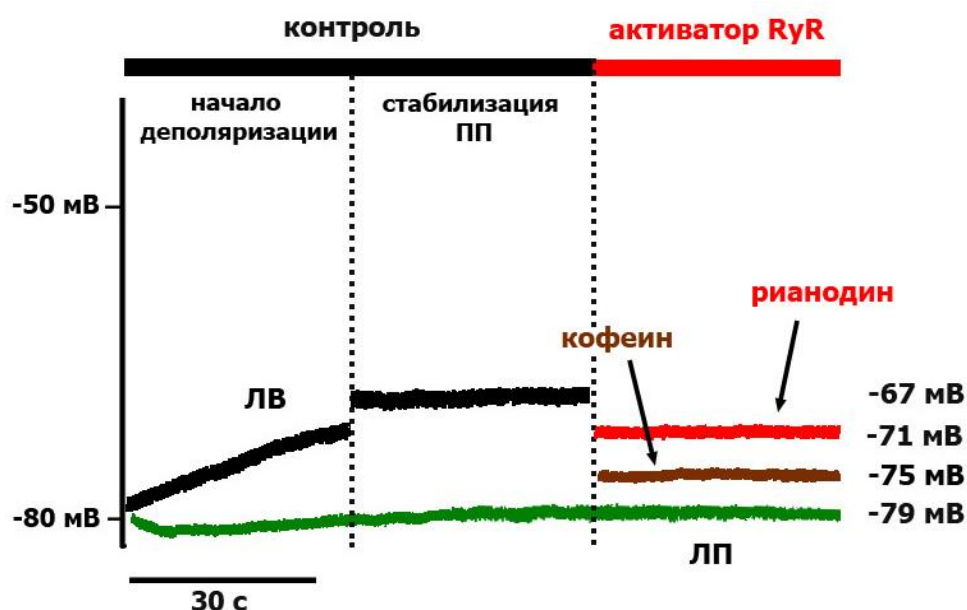


Рис. 3.19. Примеры записей ПП в легочных венах в контроле, при действии рианодина (0,01 мМ, $n=4$) и кофеина (5 мМ, $n=7$). ЛП – левое предсердие, ЛВ – легочные вены.

Как известно кофеин также является стимулятором выброса кальция из СПР через рианодиновые рецепторы (Kong et al., 2008). Наряду с рианодином, для увеличения уровня $[Ca^{2+}]_i$ мы использовали кофеин в концентрации 5 мМ. Кофеин апплицировали после прекращения стимуляции ЛВ и стабилизации потенциала покоя. В наших экспериментах, кофеин вызывал гиперполяризацию ПП на $9 \pm 1,3$ мВ ($n=7$) за 10 минут действия (Рис.3.19.). Этот эффект кофеина был статистически значимым ($p < 0,01$). Таким образом, кофеин вызывал больший по амплитуде эффект, чем рианодин. По направлению сдвиг ПП, вызываемый кофеином, был таким же, что и при действии изопротеренола. Кроме того, амплитуда гиперполяризации при действии кофеина и ИЗО была приблизительно одинаковой (эффект кофеина составил 90% от эффекта ИЗО, $p > 0,5$). На основе экспериментов с рианодином и кофеином нами было сделано предположение, что гиперполяризация, возникающая в миокарде легочных вен при действии изопротеренола действительно обусловлена (или связана) повышением уровня $[Ca^{2+}]_i$. Такой механизм можно назвать «кальций-зависимой» гиперполяризацией. В случае верности предположения о «кальций-зависимой» гиперполяризации следует ожидать деполяризацию ПП или подавление эффекта ИЗО при понижении уровня $[Ca^{2+}]_i$. Эту возможность мы попытались проверить в экспериментах с использованием кальциевого хелатора ВАРТА-АМ.

Влияние ВАРТА-АМ на потенциал покоя в легочных венах

ВАРТА-АМ – это высокоселективный хелатор кальция, проникающий через клеточную мембрану. Аппликацию ВАРТА-АМ осуществляли после прекращения стимуляции и стабилизации ПП в легочных венах в контрольных условиях, при действии изопротеренола, кофеина и рианодина.

В контрольных условиях ВАРТА-АМ (после 10 мин действия) в 50% случаев (3 препарата из 6) не приводила к существенным изменениям мембранного потенциала: в этих экспериментах наблюдали лишь небольшую гиперполяризацию ПП (на 2-4 мВ). В остальных 50% случаев (3 из 6 препаратов) ВАРТА-АМ вызывала деполяризацию ПП на 7-9 мВ. Вследствие разнонаправленности эффектов, достоверности влияния ВАРТА-АМ на ПП установить не удалось. Кроме того, значимого влияния на гиперполяризацию, вызванную кофеином ($n=3$) рианодином ($n=3$), а также изопротеренолом ($n=3$) ВАРТА не оказывала.

Потенциал покоя в легочных венах при действии блокаторов кальций зависимых калиевых токов

В миокарде может присутствовать ряд ионных каналов, которые могут быть активированы кальцием и переносить реполярирующий или гиперполярирующий ток. К таким

каналам относятся кальций-зависимые калиевые каналы малой и средней проводимости (SK, IK, соответственно), которые, как хорошо известно, обуславливают кальций-зависимую гиперполяризацию и расслабление гладкомышечных клеток (Nelson and Quayle, 1995; Sun et al., 2020). Мы использовали блокаторы данных ионных каналов, чтобы выяснить их вклад в формирование «кальций-зависимой» гиперполяризации в миокарде легочных вен.

В качестве блокатора калиевых кальций-зависимых каналов малой проводимости использовали соединение UCL в концентрации 0,1 мкМ (n=5), а в качестве блокатора калиевых каналов средней проводимости - TRAM-34 (0,1 мкМ, n=6). Также использовали клотримазол (10 мкМ) - соединение, которое является неселективным блокатором калиевых кальций-зависимых каналов.

При самостоятельном действии UCL (n=5) и TRAM-34 (n=5) не вызывали значимого изменения ПП в покое миокарде легочных вен (после 10 мин аппликации, ПП в контроле -64 ± 4 мВ, ПП при действии UCL -65 ± 5 мВ, $p > 0,5$; ПП при действии TRAM-34 -65 ± 4 , $p > 0,5$), Рис. 3.20., 3.21.). Также, UCL и TRAM-34 не оказывали заметного влияния на гиперполяризацию, вызванную кофеином. Кофеин в контрольных условиях в данной группе экспериментов вызывал сдвиг мембранного потенциала на 9 ± 2 мВ (n=5), гиперполяризация ПП, вызванная кофеином на фоне UCL составляла 8 ± 2 мВ (n=5, $p > 0,5$), а на фоне TRAM-34 7 ± 3 мВ (n=6, $p > 0,5$).

Неселективный блокатор кальций-зависимых калиевых каналов клотримазол (10 мкМ), также не оказывал самостоятельного влияния на ПП в легочных венах (ПП в контроле -64 ± 4 мВ, ПП при действии клотримазола -64 ± 5 мВ, n=3), и не подавлял гиперполяризации, вызванной кофеином (гиперполяризация ПП, вызванная кофеином на фоне клотримазола составляла 9 ± 3 мВ, n=3).

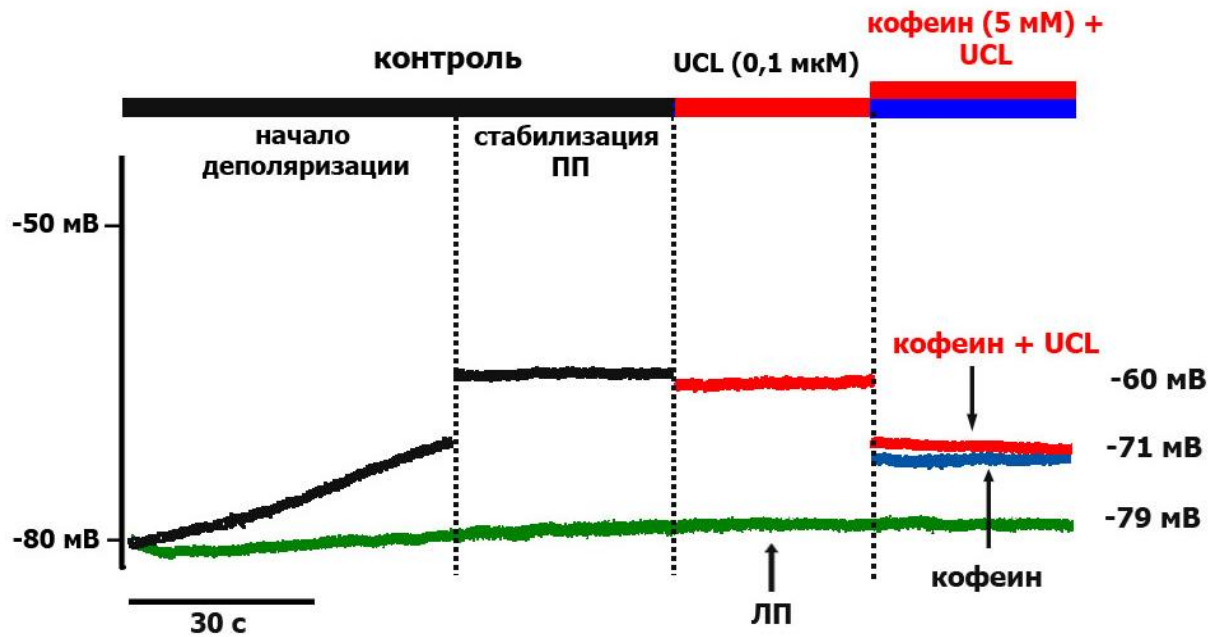


Рис. 3.20. Пример записи ПП в миокарде ЛВ в контроле, при действии UCL, а также одновременном действии кофеина (5 мМ) и UCL (0,1 мкМ). ЛП – ПП в левом предсердии.

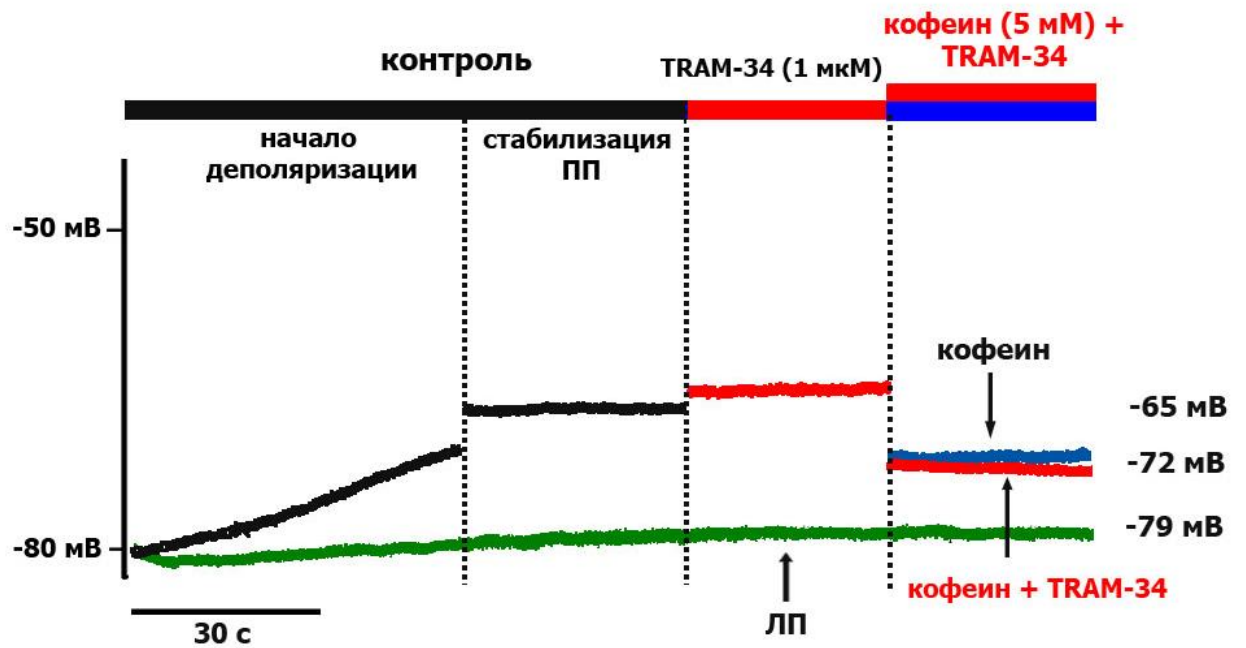


Рис. 3.21. Пример записи ПП в миокарде ЛВ в контроле, при действии TRAM-34 (1 мкМ, $n=5$), а также одновременном действии кофеина и TRAM-34 (5 мМ).

3.4.4. Роль натрий-кальциевого обменника в регуляции спонтанной активности, вызванной норадреналином в миокарде легочных вен

Известно, что значительное влияние на мембранный потенциал кардиомиоцитов оказывает натрий-кальциевый обменник (NCX), генерируя трансмембранный ток (I_{NCX}) в результате переноса через мембрану ионов Na^+ и Ca^{2+} . Величина ионного тока I_{NCX} , а также его тип (деполярирующий или гиперполярирующий) зависит от таких факторов как уровень $[Ca^{2+}]_i$, уровень цитоплазматической концентрации Na^+ , текущее значение мембранного потенциала, активация α - и β -адренорецепторов. Очевидно, что I_{NCX} может вносить вклад в изменение мембранного потенциала легочных вен при адренергической стимуляции. Поэтому, следующая часть работы была направлена на выяснение возможной роли I_{NCX} в регуляции потенциала покоя и спонтанной активности в легочных венах. Для этого мы использовали блокаторы NCX бензамил (10 мкМ) и SN-6 (10 мкМ).

Влияние блокаторов NCX на потенциал покоя в миокарде легочных вен

Бензамил в концентрации 10 мкМ вызывал деполяризацию мембранного потенциала в покоем миокарде легочных вен. Эффект бензамила проявлялся сразу после начала действия вещества, однако деполяризация развивалась медленно. После 10 минут аппликации деполяризация, вызванная бензамилом, достигала 9 ± 3 мВ (значение ПП при этом составляло -56 ± 3 мВ, $n=5$, Рис.3.22.). Данный эффект является статистически значимым ($p < 0,05$).

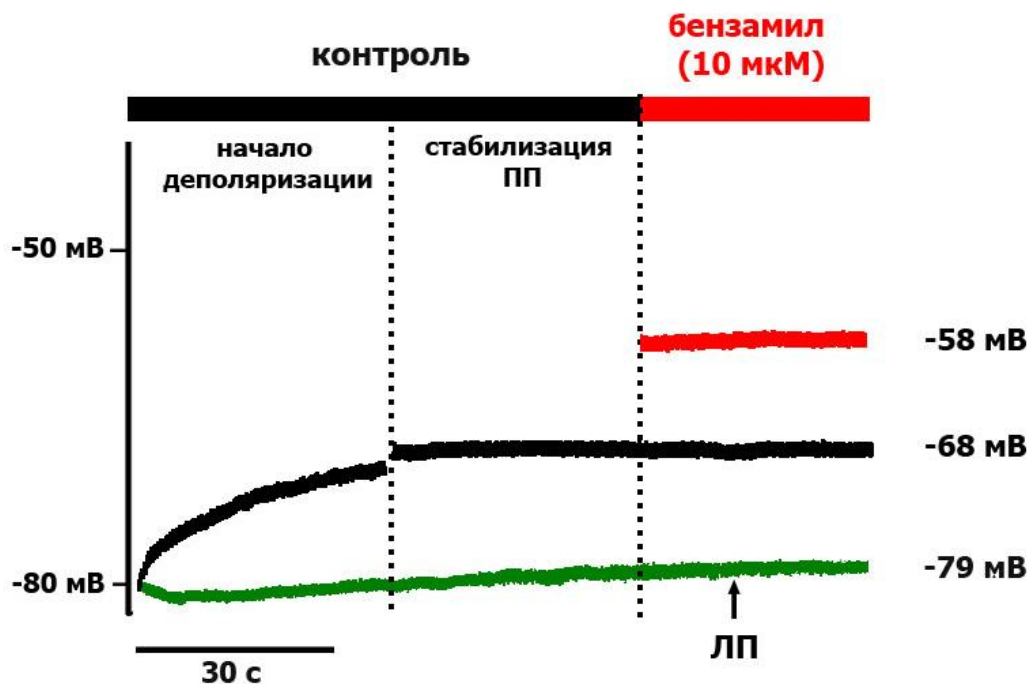


Рис. 3.22. Пример записи ПП в миокарде легочных вен в контроле и при действии бензамила (10 мкМ, $n=5$). ЛП -уровень ПП в левом предсердии.

Другой блокатор NCX - SN-6 (10 мкМ) также вызывал деполяризацию ПП в миокарде ЛВ. Через 10 минут действия SN-6 в концентрации 10 мкМ деполяризация, вызванная данным блокатором, достигала 6 ± 4 мВ (n=5, Рис 3.23). Данный эффект является статистически значимым ($p < 0,05$).

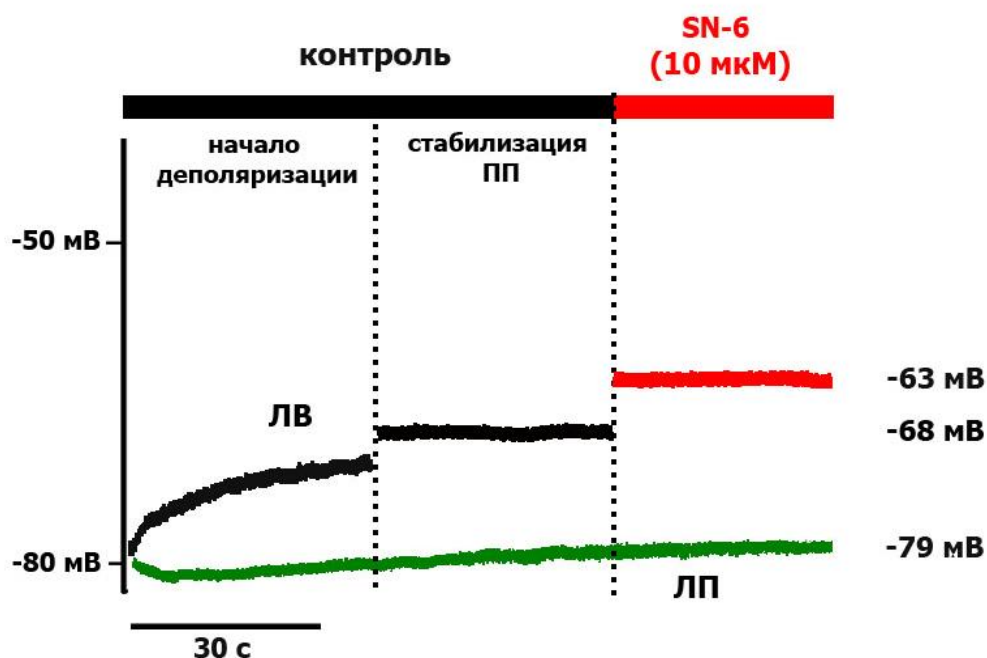


Рис. 3.23. Пример записи ПП в миокарде легочных вен в контроле и при действии SN-6 (10 мкМ, n=5). ЛП – уровень ПП в левом предсердии.

Влияние ингибирования NCX на спонтанную активность, вызванную норадреналином

Мы исследовали влияние бензамилла на спонтанную активность, вызванную в миокарде легочных вен норадреналином. Как было описано выше, НА через 5-7 минут после начала действия вызывает спонтанные ПД в миокарде ЛВ, которые следуют в виде залпов или перманентной регулярной активности.

Бензамилл оказывает влияние на несколько параметров спонтанной активности: увеличивается частота следования залпов спонтанных ПД, увеличивается длительность каждой пачки ПД (до 10 - 30 с), также увеличивается количество ПД (на Рис. 3.24. - от 18 до 60) и частота их следования в каждой пачке. В случае регулярной спонтанной активности, при действии бензамилла, увеличивается частота следования ПД. Диапазоны колебаний потенциала покоя в легочных венах при действии норадреналина, а также норадреналина совместно с бензамиллом существенно не различались (-70 – 60 мВ). Тем не менее, эффекты бензамилла могут быть объяснены его способностью вызывать деполяризацию ПП. Возможно, что бензамилл облегчает возникновение спонтанных ПД, а прекращение спонтанной активности затрудняет.

Следует отметить, что часть ПД в пачках при действии норадреналина всегда сопровождаются постдеполяризациями. В ходе перфузии легочных вен раствором, содержащим бензамил и норадреналин, ПД никогда не сопровождались постдеполяризациями.

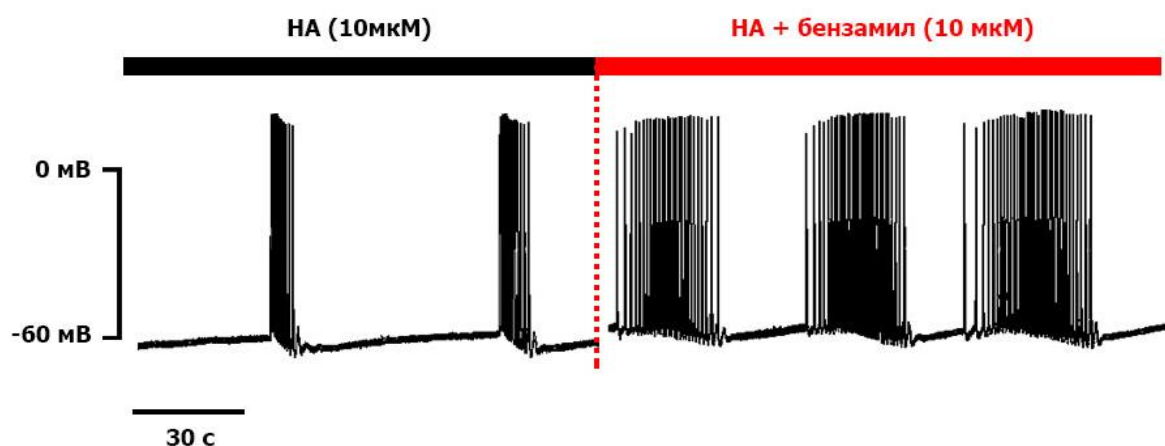


Рис. 3.24. Влияние бензамила на характер пачечной активности в миокарде легочных вен.

3.4.5. Роль I_{K1} в регуляции потенциала покоя и индукции спонтанной активности, вызванной норадреналином в миокард легочных вен

Как было описано ранее, у крыс до 14 дней в покоящихся препаратах ЛВ ПП был более гиперполяризованным по сравнению с препаратами ЛВ взрослых крыс: у крысят практически не было спонтанной деполяризации мембранного потенциала после отключения стимуляции. Как известно, основную роль в формировании стабильного гиперполяризованного ПП играет калиевый ионный ток I_{K1} . Для выявления роли тока аномального выпрямления в формировании такого ПП у крысят до 14 дней использовали хлорохин (5 мкМ, 10 минут), вещество, проявляющее свойства блокатора ионных токов аномального выпрямления, в том числе тока I_{K1} .

Так, у крысят 7-дневного возраста сам хлорохин вызывал небольшую деполяризацию мембранного потенциала (не больше, чем на 5 мВ), однако при действии НА на фоне хлорохина в 86% препаратов наблюдалось возникновение спонтанной активности (6 препаратов из 7, пример представлен на рис.3.25., 3.26.). У крысят 14-дневного возраста хлорохин также вызывал незначительную деполяризацию мембранного потенциала, после которой при действии НА наблюдалась спонтанная активность пачечного или регулярного характера ($n=4$, активность возникала во всех случаях, Рис.3.26.). Таким образом, хлорохин потенцировал эффекты норадреналина в ЛВ крыс, возрастом 7 и 14 сут, что можно связать с подавлением I_{K1} .

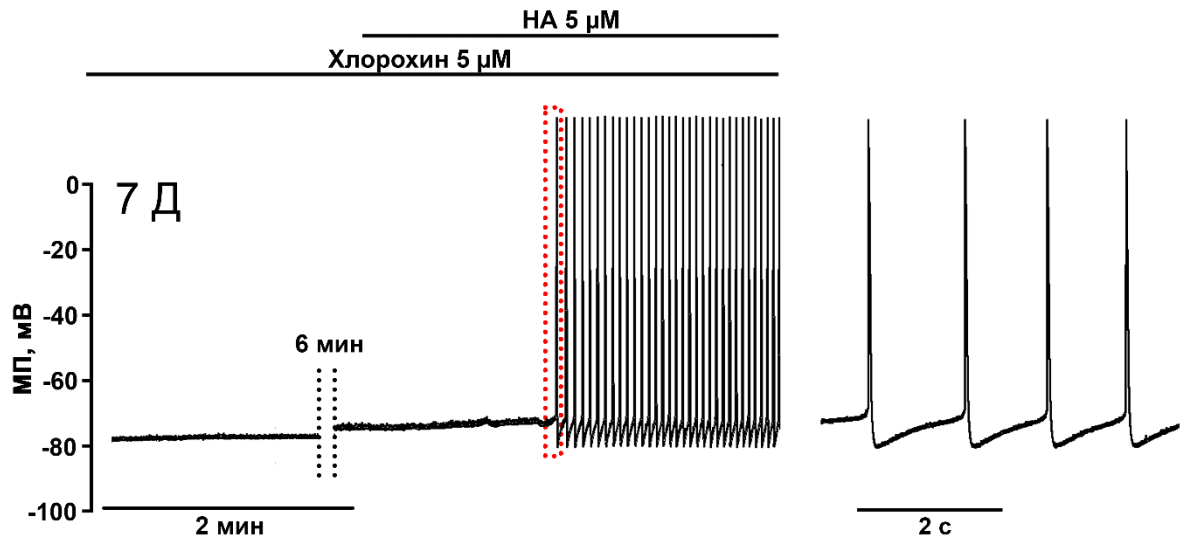


Рис. 3.25. Репрезентативный пример записи электрической активности при действии хлорохина (5 мкМ) и норадреналина (НА) на фоне хлорохина в миокардиальном препарате ЛВ крысы возрастом 7 сут.

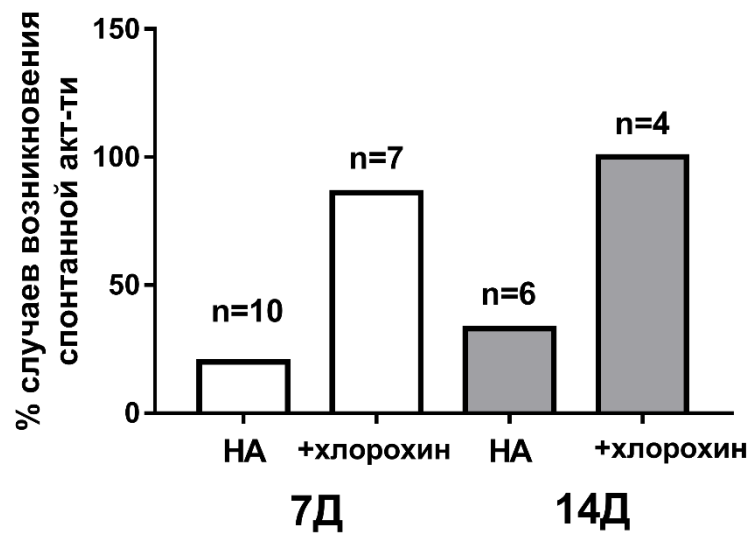


Рис. 3.26. Количество случаев спонтанной активности при действии норадреналина и при действии норадреналина на фоне хлорохина в миокарде ЛВ крыс 7- и 14-суточного возраста. (n – общее количество препаратов).

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

В данной части работы изучали действие НАД⁺, АТФ и диаденозинтетрафосфата (ДАТФ) на биоэлектрическую активность в миокарде ЛВ крыс в ходе постнатального онтогенеза, а также выявляли их влияние на спонтанную активность, вызываемую активацией адренорецепторов, моделируя тем самым эффекты при их совместном высвобождения из симпатических терминалей.

3.5.1. Действие НАД⁺ и АТФ на потенциал действия, потенциал покоя и спонтанную активность легочных вен на разных этапах онтогенеза

Потенциалы действия

Внеклеточные НАД⁺ и АТФ в миокарде легочных вен крыс на всех этапах постнатального развития действовали одинаково: снижали длительность ПД как на уровне 50, так и 90% реполяризации (Рис.3.27.). Величина снижения ДПД90%, вызываемая НАД⁺, по мере взросления животных изменялась: наибольший эффект действия НАД⁺ был у новорожденных животных, а наименьший – у взрослых. При действии АТФ наибольший эффект наблюдали у взрослых животных (Рис.3.27.). Величина снижения ДПД50% также изменялась с возрастом: и для НАД⁺, и для АТФ максимальный эффект был у новорожденных животных, а минимальный – у взрослых (Рис.3.28.)

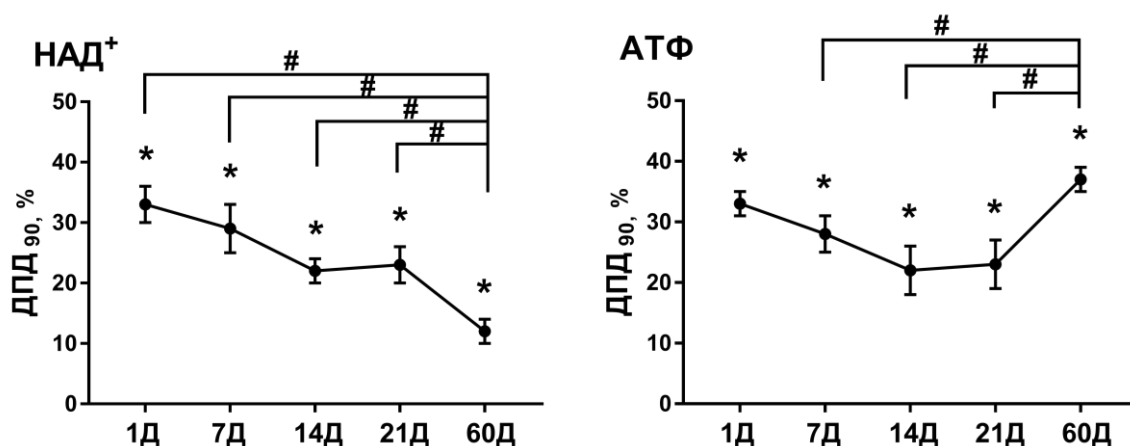


Рис. 3.27. Снижение длительности ПД на уровне 90% реполяризации при действии НАД⁺ (10 мкМ) и АТФ (10 мкМ) в миокардиальной ткани ЛВ крысы на разных этапах постнатального онтогенеза (n=6 для каждой из групп. 1Д – новорожденные животные, 7Д, 14Д, 21Д – животные 7-, 14- и 21-дневного возраста, 60Д – взрослые животные. * - p<0,05 по

сравнению с контрольными значениями, # - $p < 0,05$, сравнение между возрастными группами, one-way ANOVA).

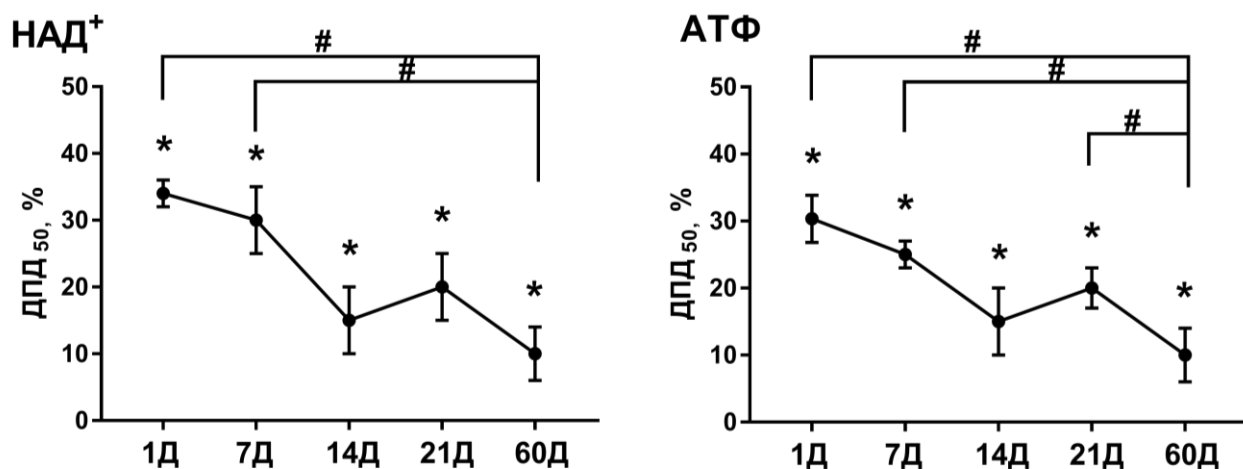


Рис. 3.28. Снижение длительности ПД на уровне 50% реполяризации при действии НАД⁺ (10 мкМ) и АТФ (10 мкМ) в миокардиальной ткани ЛВ крысы на разных этапах постнатального онтогенеза (n=6 для каждой из групп. . 1Д – новорожденные животные, 7Д, 14Д, 21Д – животные 7-, 14- и 21-дневного возраста, 60Д – взрослые животные. * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольными значениями, t-тест, # - $p < 0,05$, сравнение между возрастными группами, one-way ANOVA).

Потенциал покоя

У новорожденных крыс ни НАД⁺, ни АТФ (10 мкМ) не вызывали изменений потенциала покоя в нестимулируемых препаратах ЛВ. В миокарде легочных вен крыс 7-дневного возраста при действии пуриновых соединений наблюдали тенденцию к гиперполяризации: при действии НАД⁺ ПП гиперполяризовался на 3 ± 2 мВ (n=5), при действии АТФ на 3 ± 1 мВ (n=5), однако, эти изменения не были статистически значимыми. У крыс в возрасте 14 дней НАД⁺ вызывал гиперполяризацию ПП на 5 ± 2 мВ (n=4), а АТФ на 4 ± 3 мВ (n=4). В миокарде ЛВ 21-дневных крыс и НАД⁺, и АТФ вызывали статистически значимые изменения мембранного потенциала. Так, НАД⁺ приводил к гиперполяризации ПП на 10 ± 2 мВ (n=5, $p < 0,05$), а АТФ на 9 ± 2 мВ (n=5, $p < 0,05$). У взрослых крыс НАД⁺ вызывал гиперполяризацию ПП на 9 ± 3 мВ (n=6), а АТФ на 10 ± 2 мВ (n=6), что также статистически значимо отличалось от значений ПП до воздействия данных соединений.

Таким образом, пуриновые соединения оказывали гиперполяризующее действие на ПП пропорционально величине спонтанной деполяризации (напомним, что спонтанная

деполяризация ПП в миокарде легочных вен усиливается в ходе постнатального онтогенеза и ПП устанавливается на все менее отрицательном уровне, см. Рис.3.6.).

Спонтанная активность

Как указано выше в контрольных условиях спонтанная (автоматическая) активность в легочных венах наблюдалась только в 1-е сут после рождения. В наших экспериментах, ни НАД⁺ (n=6, 10 мкМ), ни АТФ (n=6, 10 мкМ) никакого заметного действия на частоту этой активности не оказывали ($3,1 \pm 1$ Гц (n=5) в контроле; $2,9 \pm 1$ Гц при действии НАД⁺ и $3 \pm 0,6$ Гц при действии АТФ, соответственно, $p > 0,5$).

3.5.2. Влияние диаденозинтетрафосфата на потенциал действия, потенциал покоя и спонтанную активность крыс в ходе онтогенеза

Потенциалы действия

Диаденозинтетрафосфат (ДАТФ) оказывал существенное влияние на электрически вызванные ПД в миокарде легочных вен крыс на всех исследуемых этапах онтогенеза. Репрезентативные примеры ПД в контрольных условиях, а также при действии ДАТФ в разных возрастных группах представлены на рис.3.29. При действии ДАТФ в концентрации 10 мкМ ДПД90% в легочных венах снижалась на $32 \pm 12\%$ (n=4), $31 \pm 4\%$ (n=5), $31 \pm 2\%$ (n=5), $28 \pm 4\%$ (n=4) от контрольных значений в препаратах, полученных от животных в конце первых суток, а также на 7-е, 14-е и 21-е сут постнатальной жизни, соответственно. В препаратах легочных вен взрослых крыс ДПД90% при действии ДАТФ снижалась на $29 \pm 3\%$ (n=6). Эффект ДАТФ в миокарде ЛВ крыс разного возраста при выражении в процентах был сходен, несмотря на существенно различную исходную длительность ПД (Рис.3.29. А).

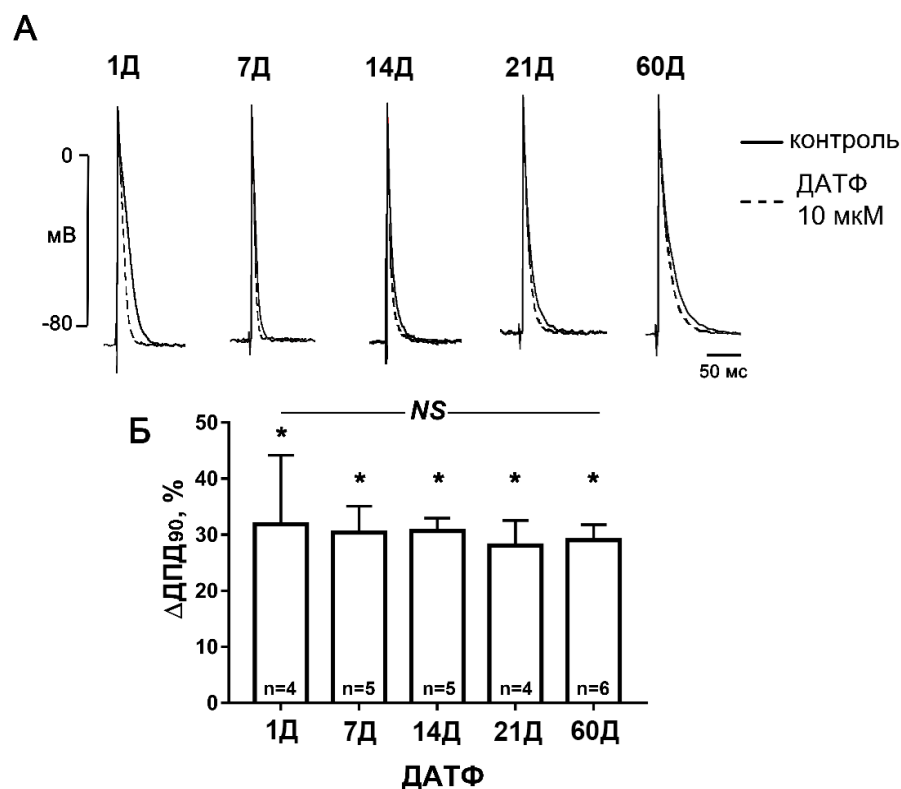


Рис. 3.29. Влияние диаденозинтетрафосфата (ДАТФ) на электрически вызванные потенциалы действия в многоклеточных препаратах легочных вен, полученных от крыс на разных этапах постнатальной жизни. А. Репрезентативные примеры потенциалов действия в контрольных условиях (сплошная линия) и при действии ДАТФ (пунктирная линия) в концентрации 10 мкМ. Д1 – препараты легочных вен, полученные от животных в конце первых суток постнатального развития; Д7, Д14, Д21 и Д60 – препараты, полученные на 7-ые, 14-е, 21-е и 60-е сут постнатального развития. Б. Изменение длительности ПД на уровне 90% реполяризации при действии ДАТФ в концентрации 10 мкМ в препаратах ЛВ крысы на разных этапах постнатального онтогенеза. * – $p < 0,05$ (длительность ПД при действии ДАТФ относительно контроля, t-тест); NS – незначимо (сравнение эффекта ДАТФ между различными возрастными группами, ANOVA).

Потенциал покоя

В наших экспериментах, ДАТФ оказывал значимое влияние на ПП в покоящихся препаратах ЛВ крыс в части возрастных групп (Рис.3.30.). Так, при действии ДАТФ в концентрации 10 мкМ в препаратах ЛВ 14-, 21- и 60-дневных крыс наблюдали статистически значимую гиперполяризацию ПП, которая составила 6 ± 2 (n=5), 9 ± 1 (n=5), $9 \pm 1,5$ (n=4) мВ, соответственно. В препаратах, полученных от животных в конце первых сут и на 7-е и сут жизни ДАТФ статистически значимого изменения ПП не вызывал. Следует отметить, что

величина гиперполяризирующего эффекта ДАТФ была больше в миокардиальных препаратах, полученных от крыс большего возраста.

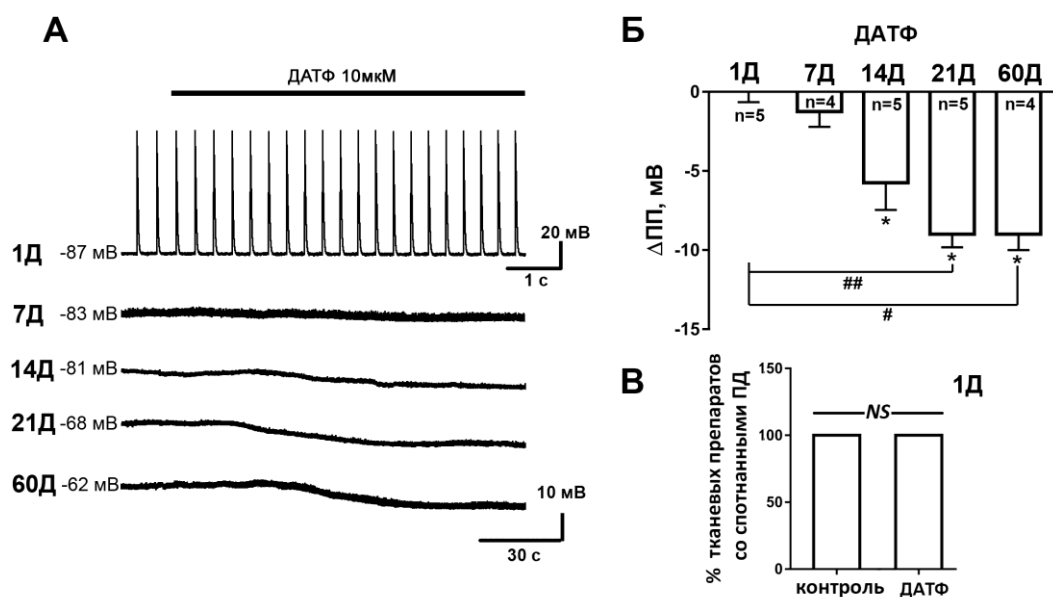


Рис. 3.30. Влияние диаденозинтетрафосфата на потенциал покоя в многоклеточных препаратах легочных вен, полученных от крыс на разных этапах постнатальной жизни. А. Оригинальные записи ПП при действии ДАТФ в концентрации 10 мкМ в препаратах легочных вен крыс, полученные от животных в конце первых суток постнатального развития (1Д), а также на 7-е, 14-е, 21-е и 60-е сут (7Д, 14Д, 21Д и 60Д) постнатального развития. Б. Изменение ПП в препаратах легочных вен крыс под действием ДАТФ на разных этапах постнатального онтогенеза. # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,005$ (относительно ПП, наблюдаемого в конце 1-х сут развития, ANOVA); * – $p < 0,05$ (изменение ПП при действии ДАТФ относительно контроля, парный t-тест). В. Спонтанная активность в препаратах ЛВ, полученных от крысят в конце первых сут постнатального развития при действии 10 мкМ ДАТФ. В таких препаратах ДАТФ не вызывал подавления спонтанных ПД. NS – незначимо.

Спонтанная (автоматическая) активность

Спонтанная автоматическая активность в контрольных условиях в данной серии экспериментов (как и в других) наблюдалась только в препаратах ЛВ новорожденных крыс. Как и в случае с НАД⁺ и АТФ, ДАТФ заметного действия на регулярный характер и частоту ($3,1 \pm 1$ Гц и $3,3 \pm 1$ Гц, в контроле и при действии ДАТФ, соответственно, $n=8$, $n=5$, $p > 0,1$) такой активности не оказывал (Рис.3.30. А, В).

3.5.3 Влияние НАД⁺ и АТФ на электрофизиологические эффекты норадреналина в миокарде легочных вен крыс на разных этапах постнатального развития

Как было показано ранее, норадреналин (10 мкМ) в миокарде ЛВ новорожденных не оказывал влияния на ПП и спонтанную автоматическую активность. Как и в случае самостоятельного действия, НАД⁺ и АТФ (в концентрации 10 мкМ) на фоне НА (10 мкМ) не приводили к значимым изменениям параметров спонтанной активности (4 ± 1 Гц в контроле ($n=7$) и $4,5 \pm 2$ Гц ($n=5$) при действии НАД⁺ и 4 ± 1 Гц ($n=5$) при действии АТФ, $p > 0,1$, в данной серии экспериментов) и ПП (-87 ± 4 мВ ($n=5$) и -85 ± 5 мВ ($n=5$) при действии НАД⁺, -86 ± 4 мВ ($n=5$) при действии АТФ, $p > 0,1$).

В миокарде ЛВ крыс 7-дневного возраста НА не вызывал спонтанную активность, таким образом у крыс данного возраста нельзя было оценить действие НАД⁺ и АТФ на параметры автоматической активности, индуцированной норадреналином.

В миокарде ЛВ крыс 14-дневного возраста в данной серии экспериментов в 2 из 6 препаратах наблюдали спонтанную активность при действии 10 мкМ НА. НАД⁺ и АТФ на фоне НА вызывали либо урежение спонтанной активности (НАД⁺ на 80%, АТФ на 60%), либо полное ее прекращение.

В данной серии экспериментов, в миокардиальных препаратах ЛВ крыс 21-дневного возраста НА вызывал спонтанную активность как «пачечного» (5 из 8), так и перманентного (регулярного) характера (3 из 8). НАД⁺ и АТФ действовали сходно на спонтанную активность обоих типов: подавляли автоматию, вызванную НА. В случае залпового типа спонтанной активности, вызванной НА, оба пуриновых соединения приводили к полному прекращению генерации спонтанных ПД. В случае регулярной спонтанной активности данные соединения приводили к изменению типа активности на «пачечный» (2 случая из 3), либо также к полному прекращению активности.

У взрослых крыс (60Д) НА (10 мкМ) вызывал спонтанную активность в 100% экспериментов ($n=14$). Как и в предыдущих сериях экспериментов, у взрослых животных вызванная НА спонтанная активность имела как пачечный (в 50% случаев), так и перманентный характер (в 50% случаев). В отличие от экспериментов с препаратами от 21-дневных животных, в этой серии НАД⁺ и АТФ никогда не приводили к полному прекращению спонтанной активности, вызванной НА (Рис.3.31.). Однако, данные соединения существенно изменяли параметры автоматии, что описано более подробно в следующих двух разделах.

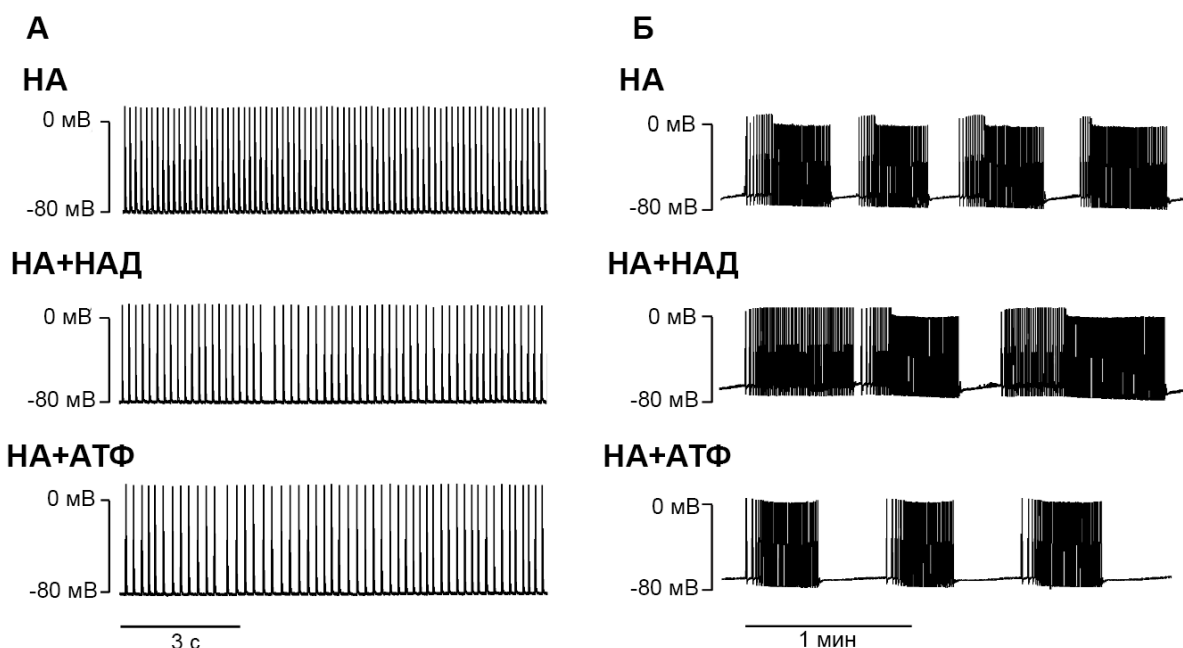


Рис. 3.31. Репрезентативные примеры спонтанной активности (спонтанных ПД), возникающей в миокарде легочных вен крыс, возрастной группы 60Д (взрослые животные) при действии 10 мкМ норадреналина (НА, сверху), а также при действии 10 мкМ НАД⁺ или АТФ на фоне НА. А – регулярная спонтанная активность, Б – залповая («пачечная») спонтанная активность, вызываемая НА.

Влияние НАД⁺ и АТФ на регулярную спонтанную активность, вызванную норадреналином в ЛВ взрослых крыс

В данной серии экспериментов в контрольных условиях частота следования ПД при регулярной спонтанной активности, вызванной норадреналином (10 мкМ) составляла $3 \pm 0,5$ Гц ($n=15$), длительность ПД на уровне 90% реполяризации (ДПД_{90%}) - 48 ± 7 мс, на уровне 50% реполяризации (ДПД_{50%}) - 23 ± 5 мс, максимальная скорость нарастания фронта ПД ($dV/dt_{\max}$) - 149 ± 34 В/с. НАД⁺ (10 мкМ) вызвал снижение ритма до 85% (83-90%) от значения в контрольных условиях, ДПД_{90%} - до 95%, ДПД_{50%} - до 89% (65-94%) ($n=8$, $p < 0,05$ во всех случаях, Рис.3.32.). АТФ (10 мкМ) оказывал сходное действие на параметры регулярной активности: вызвал снижение ритма до 91% (90-94%) от значения в контрольных условиях, ДПД_{90%} - до 80% (76-86%), ДПД_{50%} - до 77% (69-82%) ($n=7$, $p < 0,05$ во всех случаях) (Рис.3.32.). В данных экспериментах как НАД⁺, так и АТФ не вызывали значимых изменений $dV/dt_{\max}$.

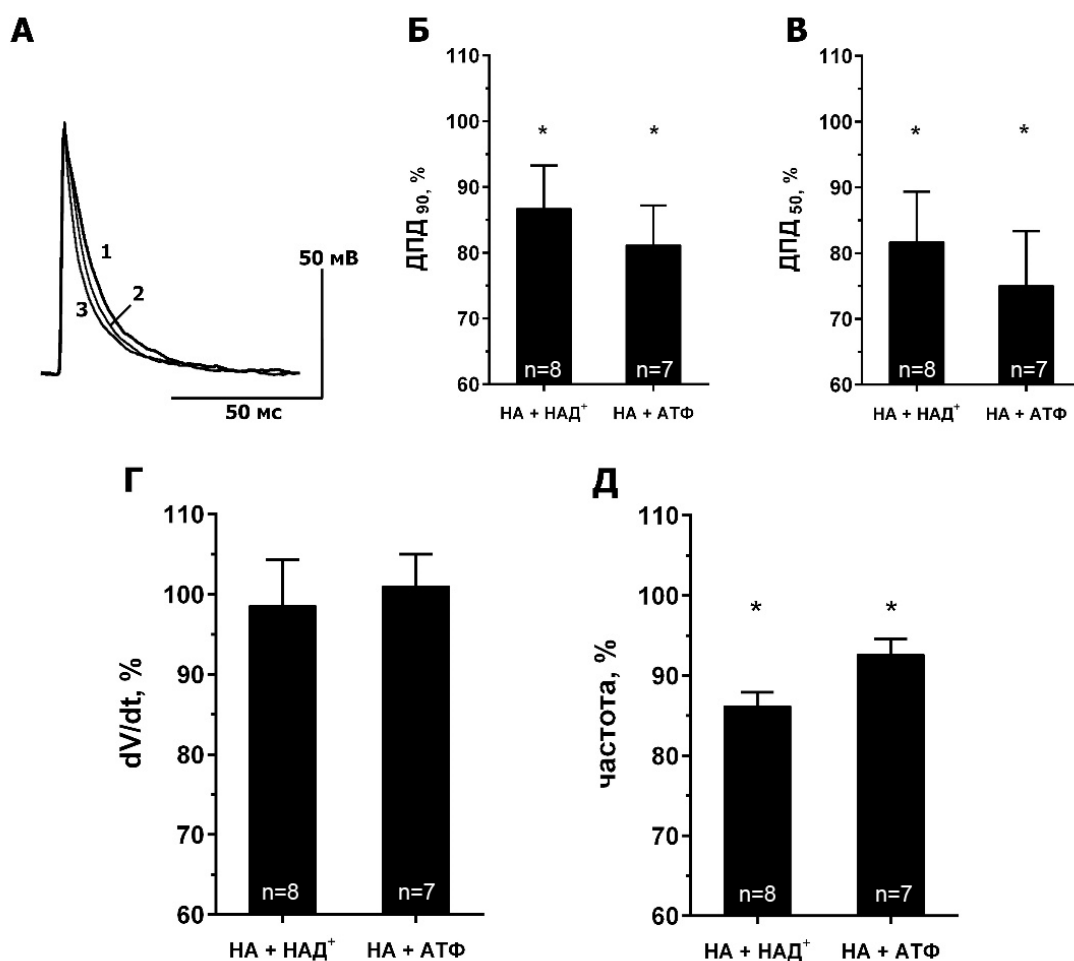


Рис. 3.32. Влияние НАД⁺ (10 мкМ) и АТФ (10 мкМ) на характер регулярной спонтанной активности, а также параметры ПД при регулярной спонтанной активности, вызываемой норадреналином (НА, 10 мкМ) в миокарде легочных вен взрослых крыс. * - $p < 0,05$. А - примеры ПД при действии НА (контрольные значения - "1"), в момент времени, соответствующий максимальному эффекту НАД⁺ на фоне НА ("2") и АТФ на фоне НА ("3"); Б - Длительности потенциалов действия на уровне 90% реполяризации (ДПД_{90%}) при аппликации НАД⁺ и АТФ на фоне НА (в % от контрольных значений); В - Изменение длительности потенциалов действия на уровне 50% реполяризации (ДПД_{50%}) при аппликации НАД⁺ и АТФ на фоне НА (в % от контрольных значений); Г - Изменение максимальной скорости фронта ПД (dV/dt), вызываемых действием НА при аппликации НАД⁺ и АТФ (в % от контрольных значений); Д - Изменение частоты следования спонтанных ПД, вызываемых действием НА при аппликации НАД⁺ и АТФ (в % от контрольных значений).

Влияние НАД⁺ и АТФ на «пачечную» спонтанную активность, вызванную норадреналином в легочных венах

В данной серии экспериментов длительность пачек в контрольных условиях (при аппликации НА) варьировала от 10 до 140 с (в среднем, 54 ± 15 с, $n=16$, Рис.3.33.). Количество ПД в пачке также имело широкий диапазон значений: от 33 до 348 (в среднем 125 ± 37). Продолжительность периодов покоя между пачечной активностью составила 44 ± 12 с, максимальная частота следования ПД в пачке составляла $4 \pm 0,3$ Гц, $dV/dt_{\max}$ - 15 ± 2 В/с (в двух экспериментах параметр $dV/dt_{\max}$ достигал значений 232 ± 27 В/с, которые не учитывались).

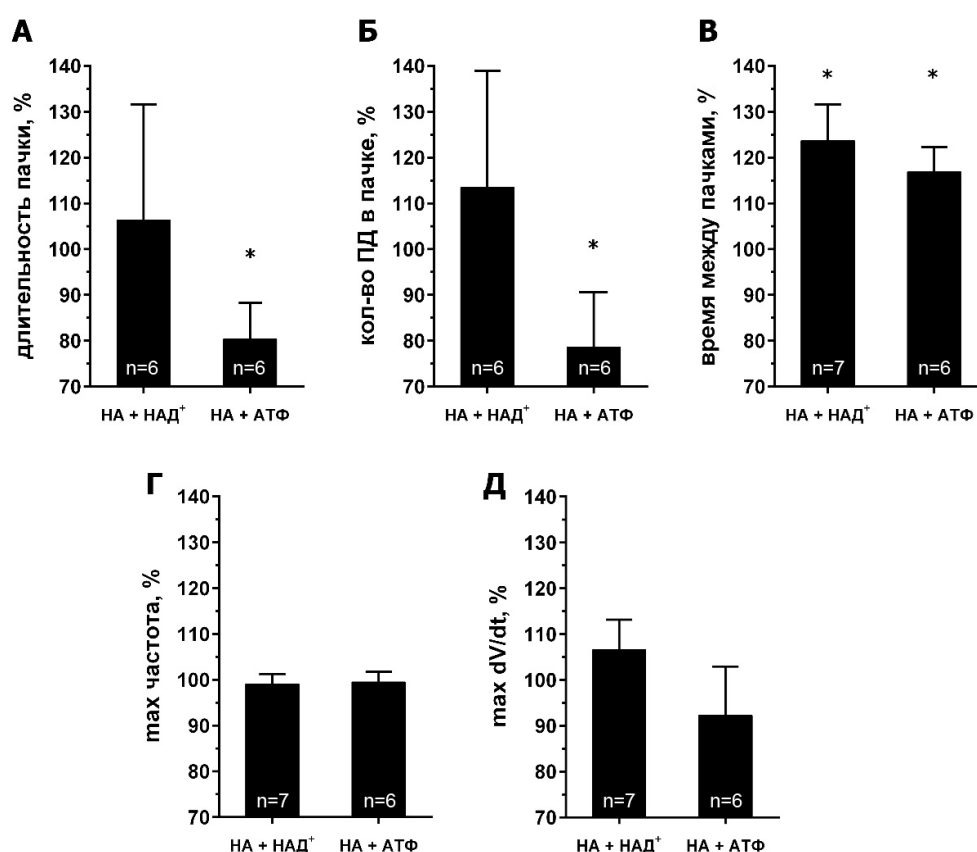


Рис. 3.33. Влияние НАД⁺ и АТФ (10 мкМ) на характер «пачечной» спонтанной активности, а также параметры ПД в «пачках», вызываемых норадреналином (НА, 10 мкМ) в миокарде легочных вен крысы (в % от контрольных значений). * - $p < 0,05$. А – Продолжительность «пачек» ПД при действии НАД⁺ и АТФ на фоне НА; Б - Количество ПД в одной «пачке» при действии НАД⁺ и АТФ на фоне НА; В – Продолжительность периода покоя между залпами ПД при действии НАД⁺ и АТФ на фоне НА; Г – Максимальная частота следования ПД, наблюдаемая в «пачке» при действии НАД⁺ и АТФ на фоне НА; Д – Максимальное значение скорости фронта ПД, наблюдаемое в «пачке» при действии НАД⁺ и АТФ на фоне норадреналина.

НАД⁺ и АТФ вызывали значимое увеличение продолжительности периодов покоя между пачками: на 20% (8-42%) ($n=7$, $p < 0,05$) и 19% (13-25%) ($n=6$, $p < 0,05$) относительно

контрольных значений, соответственно (Рис.3.33.В). АТФ вызывал снижение длительности пачек и количества ПД в одной пачке до 79% (57-90%) и 72% (54-89%), соответственно ($n=6$, $p<0,05$ в обоих случаях Рис.3.31., Рис.3.33.А, Б). При действии НАД⁺ значимых изменений данных параметров обнаружено не было, однако наблюдалась тенденция увеличения длительности пачек и количества ПД в одной пачке при действии НАД⁺ (Рис.3.31., Рис.3.33.); как НАД⁺, так и АТФ не оказывали значимого влияния на максимальную частоту следования ПД в пачке и $dV/dt_{\max}$.

3.5.4. Влияние диаденозинтетрафосфата на электрофизиологические эффекты норадреналина в миокарде легочных вен крыс на разных этапах постнатального онтогенеза

На следующем этапе работы нами было исследовано влияние ДАТФ на эффекты норадреналина в миокарде легочных вен крыс в ходе постнатального развития.

ДАТФ на фоне НА не вызывал сколь либо заметное изменение конфигурации ПД и частоты автоматической активности в препаратах ЛВ ($3,9\pm 1$ Гц ($n=6$) в контроле и $4,2\pm 1$ Гц ($n=5$), в при действии ДАТФ, соответственно, $p>0,1$), полученных от крыс в конце 1-х сут жизни.

В миокарде легочных вен крыс 7-и 14-суточного возраста НА в данной серии ни в одном случае ($n=6$ и $n=7$, соответственно) не вызывал спонтанную активность, таким образом у крыс данного возраста нельзя было оценить действие ДАТФ на параметры автоматической активности, индуцированной норадреналином.

Во всех экспериментах в препаратах ЛВ, полученных от животных на 21-е ($n=8$) и 60-е ($n=8$) сут постнатального развития, ДАТФ в концентрации 10 мкМ вызывал быстрое подавление спонтанной как пачечной, так и регулярной активности, индуцированной норадреналином. Этот эффект был статистически значимым: прекращение спонтанной активности происходило в 100% препаратов, полученных от крыс указанных возрастных групп (Рис.3.34.). 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. Следует указать, что в ходе последнего залпа не наблюдали заметного снижения частоты следования спонтанных ПД или иных изменений параметров спонтанной активности.

Таким образом, влияние ДАТФ на автоматию легочных вен, вызванную НА, оказалось гораздо более «однозначным» и выраженным, чем действие других пуриновых соединений – АТФ и НАД⁺.

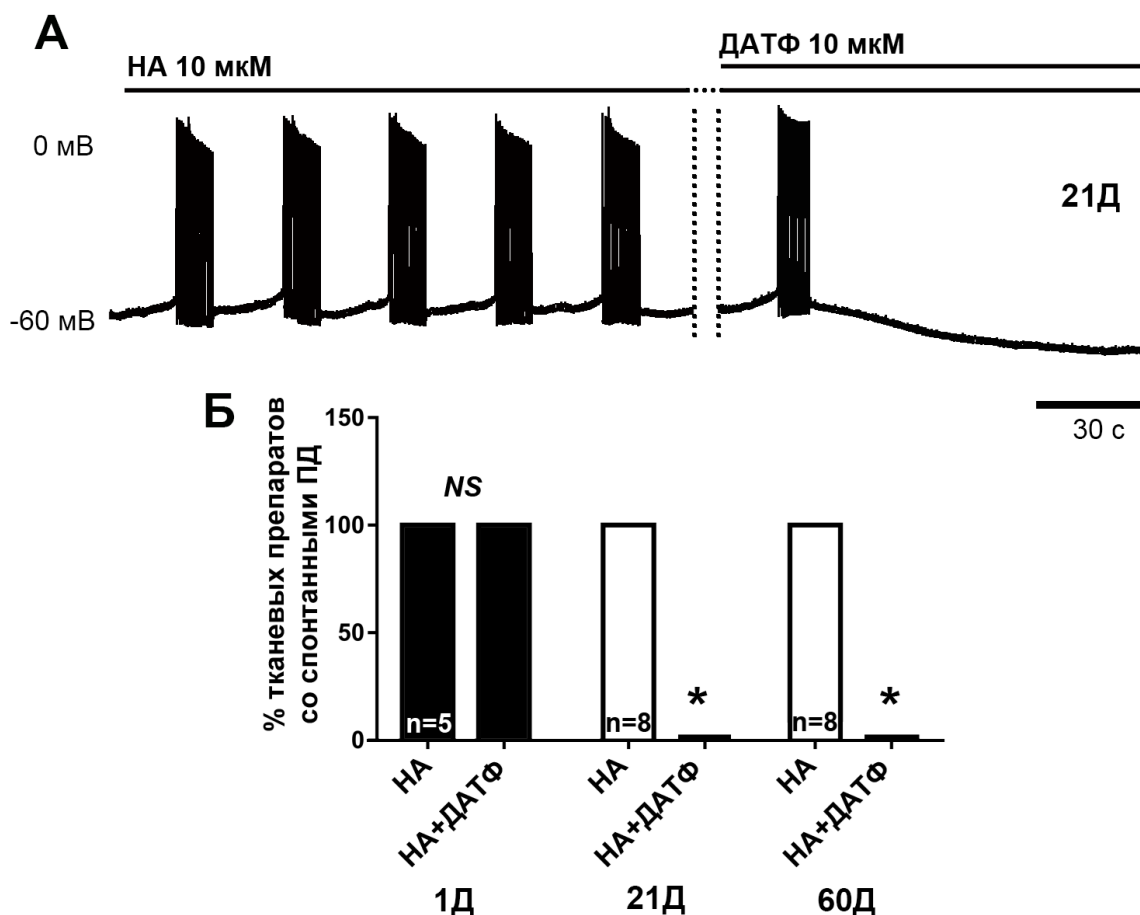


Рис. 3.34. Влияние диаденозинтрифосфата (10 мкМ) на спонтанную активность, вызванную норадреналином (НА, 10 мкМ) в многоклеточных препаратах легочных вен, полученных от крыс на разных этапах постнатальной жизни. А. Репрезентативная запись спонтанной активности (периодические спонтанные залпы ПД), возникающей 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. ДАТФ приводил к быстрому подавлению спонтанной активности во всех препаратах, полученных от крыс, возрастом 21 и 60 сут. Черным цветом отмечены препараты, полученные в конце первых сут развития, где спонтанная активность наблюдалась в базальных условиях, т.е. независимо от действия НА. В таких препаратах ни НА, ни ДАТФ не вызывали каких-либо изменений спонтанной активности. * - $p < 0,05$, парный t-тест; NS – незначимо.

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

Данный этап работы был направлен на то, чтобы связать выявленные изменения электрофизиологической активности, происходящие в легочных венах в ходе постнатальной

жизни, со структурным созреванием симпатической иннервации, а также с онтогенетическим изменением паттерна экспрессии адренорецепторов, обуславливающих тип ответа ткани на адренергические воздействия.

3.6.1. Формирование симпатической иннервации миокарда легочных вен у крыс в ходе постнатального развития

Специфическую флюоресценцию аддуктов глиоксиловой кислоты и катехоламинов, выявляемую в ходе микроскопического исследования в виде цепочек флюоресцентных пятен или ветвящихся волокон, залегающих ближе к эпикардальной поверхности (преимущественно кнаружи от миокардиальных слоев) толщи стенки легочных вен, считали морфологическими признаками присутствия в препаратах симпатических постганглионарных норадреналинсодержащих нервных окончаний и «варикоз». Увеличение количественных характеристик специфической флюоресценции в тканевых препаратах легочных вен считали признаком созревания симпатической иннервации.

В легочных венах новорожденных крыс во всех препаратах (6 препаратов от 6 животных) специфически локализованной флюоресценции катехоламиновых аддуктов обнаружено не было (Рис.3.35., 1Д). Соответственно, симпатическая иннервация в миокарде легочных вен на 1-е сут постнатальной жизни у крыс отсутствует. Следует указать, однако, что интенсивность диффузной флюоресценции миокардиальных слоев препаратов легочных вен новорожденных животных была существенно выше, чем таковая в препаратах, полученных от взрослых животных.

В тканевых препаратах легочных вен, полученных от крыс возрастом 7 сут, единичные волокна были обнаружены в 2 из 5 препаратов (Рис. 3.35., 7Д). Визуально, волокна имели большую толщину и малую степень ветвления, что может свидетельствовать о незрелости иннервации. Так как волокна были обнаружены только в 2-х препаратах, то провести статистическую оценку их морфологических свойств не удалось.

В легочных венах 14-дневных крыс катехоламин-содержащие волокна были обнаружены во всех 100% препаратов (5 из 5). Однако, общая площадь специфической флюоресценции и общая длина катехоламин-позитивных волокон была статистически значимо меньше, чем в тканевых препаратах, полученных от взрослых животных (Д60, Рис.3.37., А и Б). Таким образом, симпатическая иннервация присутствует в миокарде легочных вен к концу 2 недели постнатальной жизни, однако формирование ее еще не завершено.

В легочных венах крыс, возрастом 21 суток симпатические волокна были обнаружены также в 100% препаратов ЛВ (5 из 5, Рис.3.35.). Визуально, волокна имели высокую степень ветвления. Общая площадь специфической флюоресценции и общая длина катехоламин-

позитивных волокон были в этой возрастной группе такие же, как у взрослых животных (Рис.3.37.).

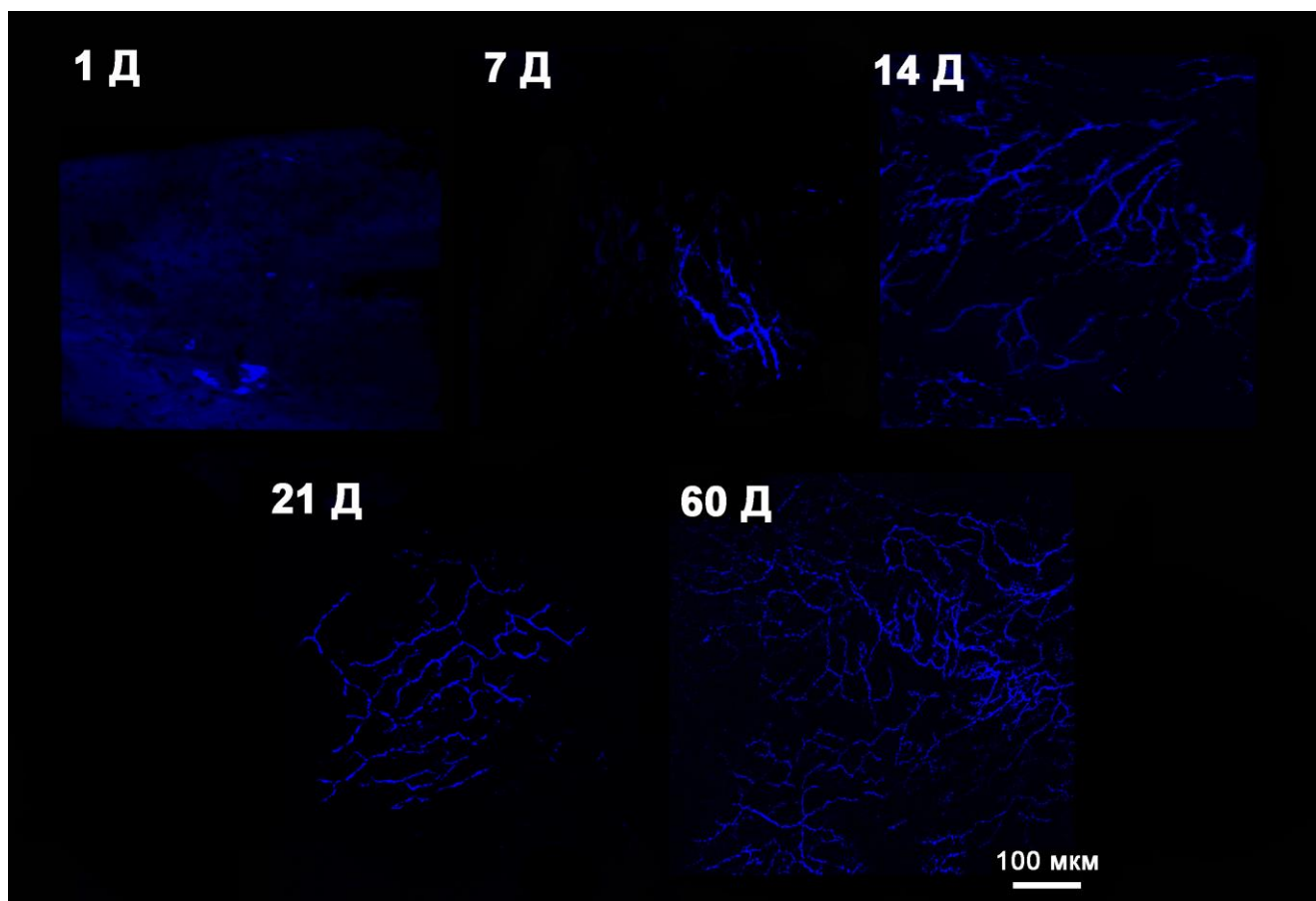


Рис. 3.35. Фотографии, полученные с помощью конфокального микроскопа, отражающие распределение катехоламин-содержащих (симпатических) волокон в препаратах легочных вен крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза. 1Д - новорожденные, 7Д – крысы 7-дневного возраста, 14Д – крысы 14-дневного возраста, 21Д – крысы 21-дневного возраста, 60Д – взрослые крысы. 1Д – обнаруживается только нелокализованная (фоновая) флюоресценция.

Следует отметить, что препараты ЛВ, полученные как от крыс возрастом 14, 21 сут, как и взрослых крыс, характеризовались достаточно гомогенным распределением иннервации. Нами не были выявлены участки явно лишенные иннервации, либо области с явно повышенной плотностью катехоламин-позитивных волокон (по крайней мере, в области миокардиального рукава, соответствующего первой бифуркации вены). В легочных венах взрослых животных сеть катехоламин-позитивных имела такую же степень «однородности» как и в левом предсердии (Рис. 3.36.).

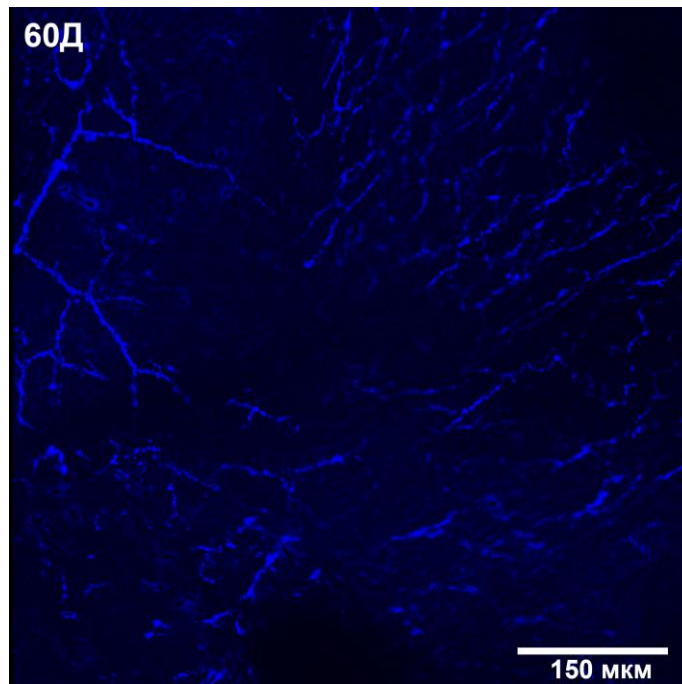


Рис. 3.36. Фотография, полученная с помощью конфокального микроскопа, отражающая распределение катехоламин-содержащих (симпатических) волокон в препарате левого предсердия взрослых крыс (60Д).

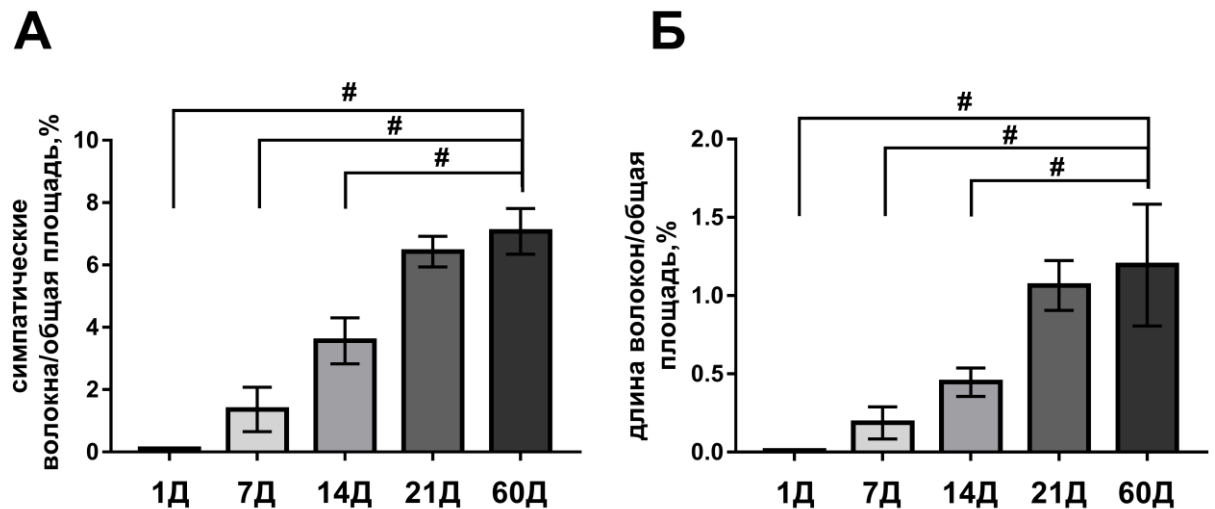


Рис. 3.37. Показатели, характеризующие плотность катехоламин-содержащих волокон в легочных венах крыс возраста 1-60 суток (1Д-60Д). А - общая площадь катехоламин-положительной флуоресценции (общая площадь симпатических волокон). Б - общая протяженность катехоламин-содержащих нервных волокон в препаратах легочных вен. # - $p < 0,05$, one-way ANOVA.

Таким образом, симпатическая иннервация легочных вен у крыс начинает формироваться в период с 7-го по 14 день постнатальной жизни. Структурно, сеть катехоламин-

позитивных (симпатических) волокон становится неотличимой от таковой у взрослых животных к 21 дню постнатального развития.

3.6.2. Экспрессия α_{1A} - и β_1 -адренорецепторов в миокардиальной ткани легочных вен крысы в ходе постнатального онтогенеза

α_{1A} -адренорецепторы

Специфическая флюоресценция, указывающая на наличие α_{1A} -адренорецепторов, обнаруживается в миокардиальном слое всех препаратов легочных вен, полученных как от новорожденных крыс ($n=5$), так и от крыс возрастом 7 ($n=5$), 14 ($n=5$), 60 ($n=5$) сут (Рис.3.38., А). Характер флюоресценции указывает на то, что α_{1A} -адренорецепторы имеют кластерное распределение в миокардиальном слое ЛВ, что является типичным для рецепторов данного типа. Оказалось, что общая площадь флюоресцентных пятен в исследованных образцах не меняется значимо с возрастом: 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 сут и взрослых животных (Рис.3.38., Б).

Кластерный характер распределения рецепторов сохраняется в легочных венах всех возрастов, однако, размер и локализация этих кластеров изменяется в ходе постнатального онтогенеза. Так, у взрослых крыс количество крупных кластеров α_{1A} -адренорецепторов значимо больше, чем на более ранних этапах постнатального онтогенеза (Рис. 3.40.).

Особенностью миокарда легочных вен взрослых животных (60Д) является то, что в отличие от других возрастных групп, большая часть кластеров α_{1A} -адренорецепторов (крупного размера) окружает области, где наблюдается повышенное поглощение возбуждающего излучения (Рис 3.38, А, 60Д). Эти области соответствуют периферии ядер кардиомиоцитов. Такой же характер локализации α_{1A} -адренорецепторов наблюдается в (рабочем) миокарде левого предсердия взрослых животных (Рис. 3.39.). Таким образом, значительная часть α_{1A} -адренорецепторов в легочных венах взрослых животных локализована в ядерной, а не в плазматической мембране.

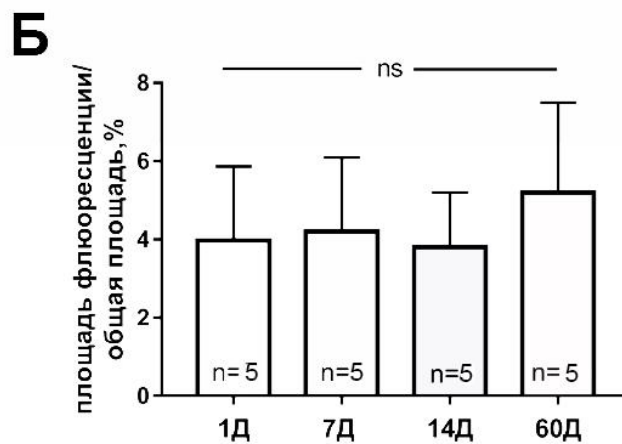
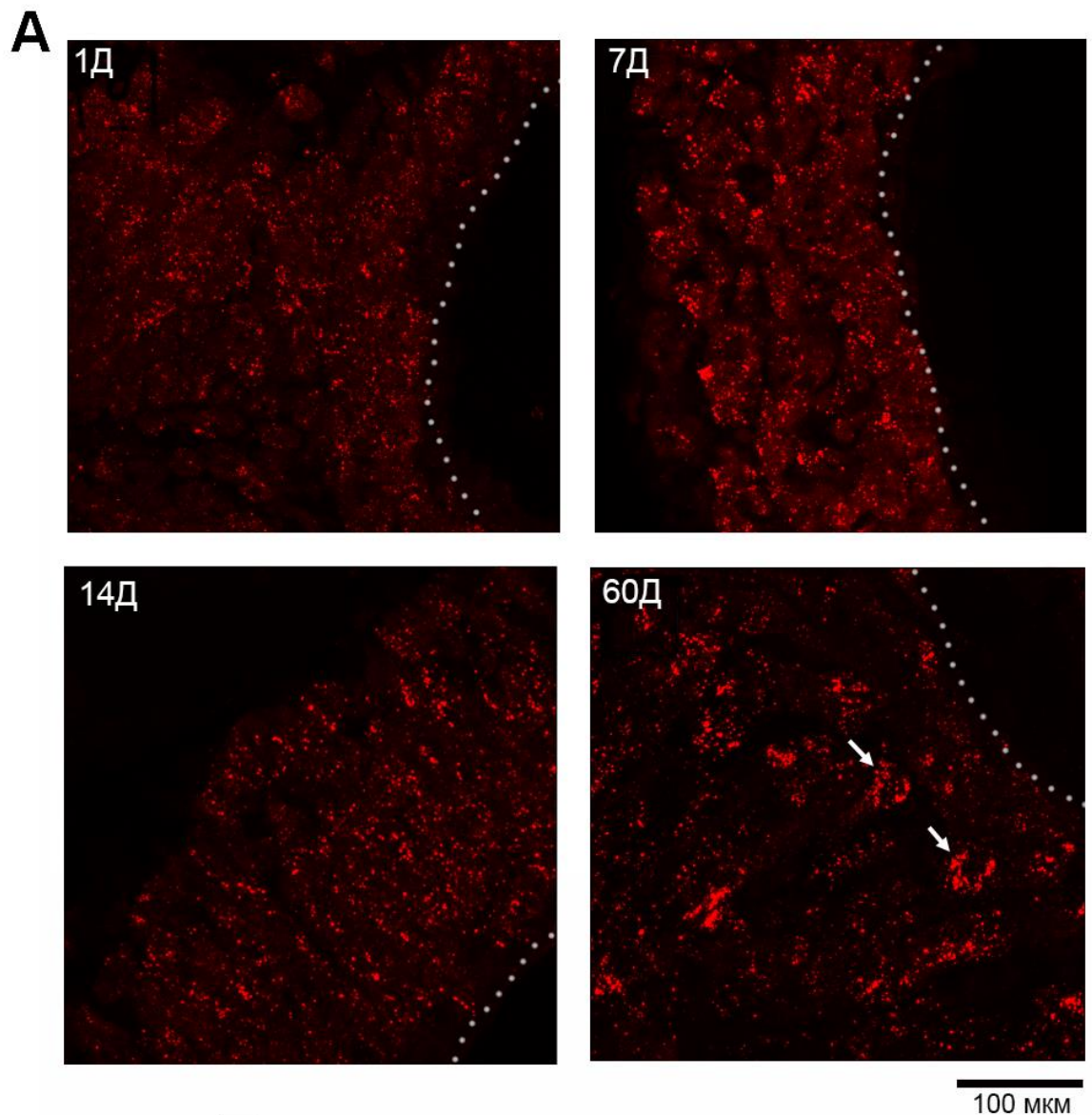


Рис. 3.38. А. Фотографии, полученные с помощью конфокального микроскопа, отражающие распределение α_{1A} -адренорецепторов в миокардиальной ткани легочных вен крыс в ходе постнатального онтогенеза. 1Д - новорожденные, 7Д, 14Д, 60Д – крысы, возрастом, 7, 14 и 60 суток. Пунктиром обозначена эндокардиальная сторона, стрелками – ядерная локализация

адренорецепторов. Б. Общая площадь флуоресценции в препаратах от крыс разного возраста, которая пропорциональна количеству α_{1A} -адренорецепторов в миокардиальной ткани легочных вен.

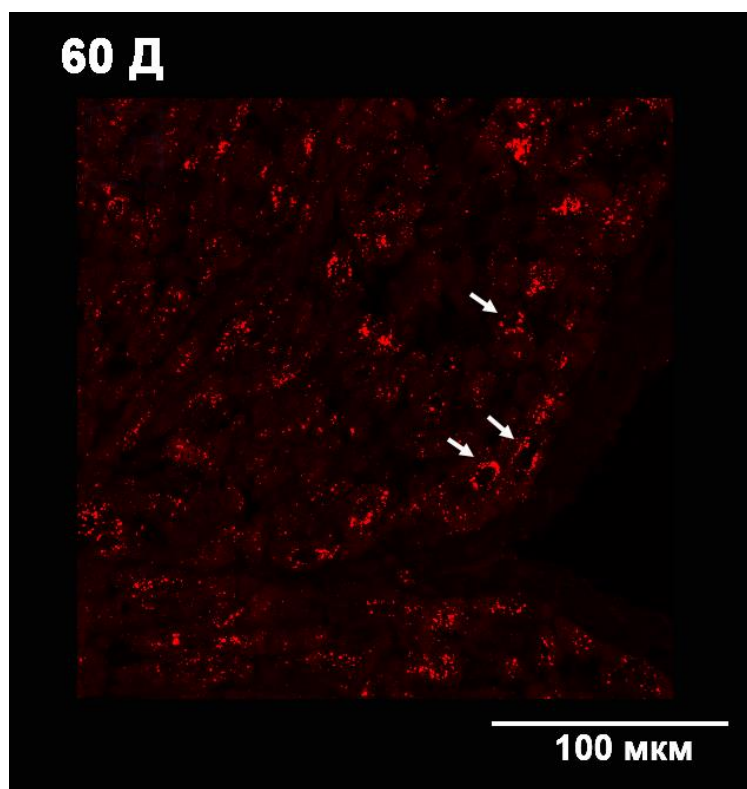


Рис. 3.39. Фотографии, полученные с помощью конфокального микроскопа, отражающие распределение α_{1A} -адренорецепторов в миокардиальной ткани левого предсердия взрослой крысы (60Д). Стрелками указана ядерная локализация крупных кластеров α_{1A} -адренорецепторов.

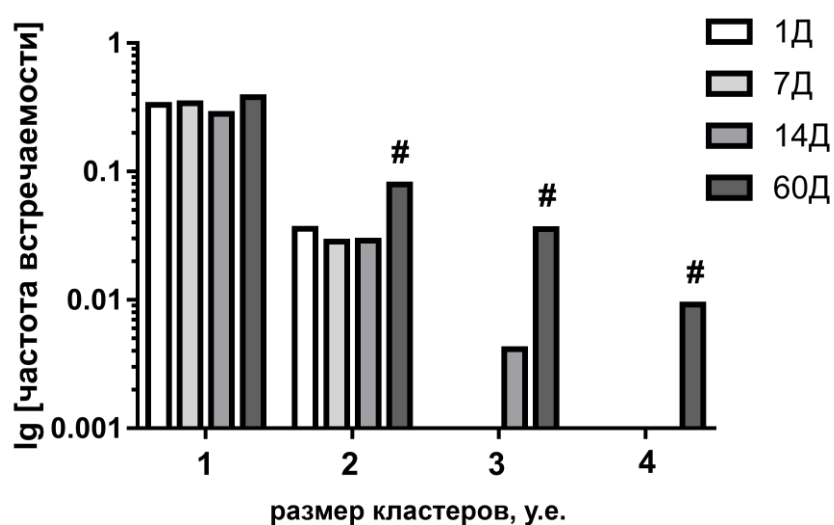


Рис. 3.40. Изменение размера кластеров α_{1A} -адренорецепторов в миокарде легочных вен крысы в ходе постнатального онтогенеза. 1Д - новорожденные, 7Д - крысы 7-дневного возраста, 14Д - крысы 14-дневного возраста, 60Д - взрослые крысы. 1-4 - размер пятен

флюоресценции, соответствующий размеру кластеров в условных единицах (4 – наибольший размер). # - $p < 0,05$ для группы 60Д по сравнению с остальными возрастными группами (one-way ANOVA).

β_1 -адренорецепторы

Как и в случае с α_{1A} -адренорецепторами, специфическая флюоресценция, соответствующая β_1 -адренорецепторам была 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 ($n=5$) сут (Рис.3.41., А). Общая площадь флюоресцентных пятен, соответствующих рецепторам, в миокардиальном слое исследованных образцов, полученных от крыс разных возрастов меняется не значительно: количество β_1 -адренорецепторов, исходя из данных иммунофлюоресцентного анализа, в легочных венах взрослых крыс лишь незначительно выше, чем крыс 14-х, 21-х сут и новорожденных животных (Рис.3.41., Б). β_1 -адренорецепторы в отличие от α_{1A} - не имеют ярко выраженного кластерного распределения. Также, нами не было обнаружено существенных изменений характера распределения β_1 -адренорецепторов в легочных венах в ходе постнатального онтогенеза. Локализация β_1 -адренорецепторов в рабочем миокарде левого предсердия и миокардиальной ткани легочных вен взрослых животных заметно не различались (Рис. 3.42.).

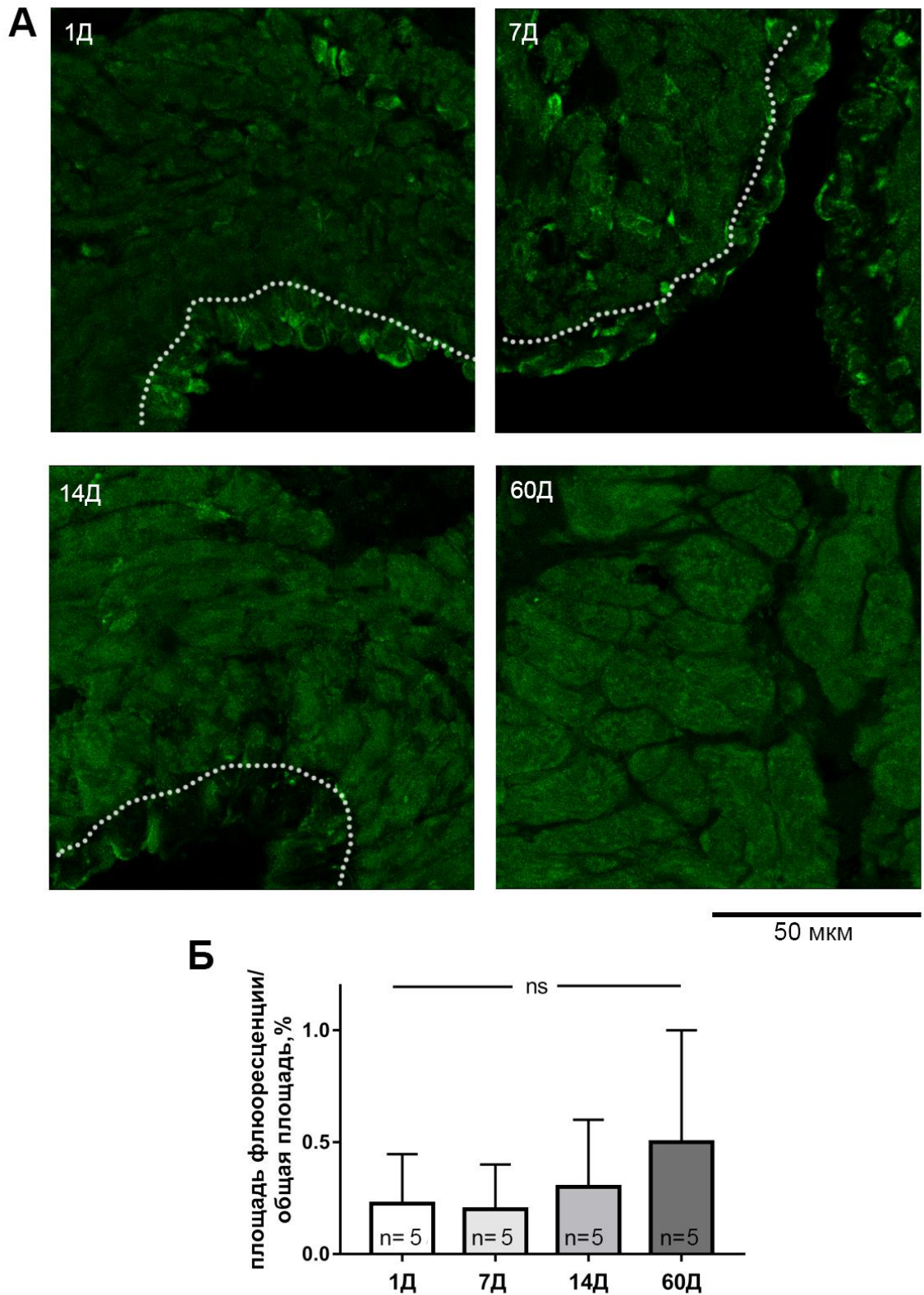


Рис. 3.41. А. Фотографии, полученные с помощью конфокального микроскопа, отражающие распределение β_1 -адренорецепторов в миокардиальной ткани легочных вен крыс в ходе постнатального онтогенеза. 1Д - новорожденные, 7Д, 14Д, 60Д – крысы, возрастом, 7, 14 и 60 суток. Пунктиром обозначена эндокардиальная сторона. Б. Общая площадь флуоресценции в

препаратах от крыс разного возраста, которая пропорциональна количеству β_1 -адренорецепторов в миокардиальной ткани легочных вен.

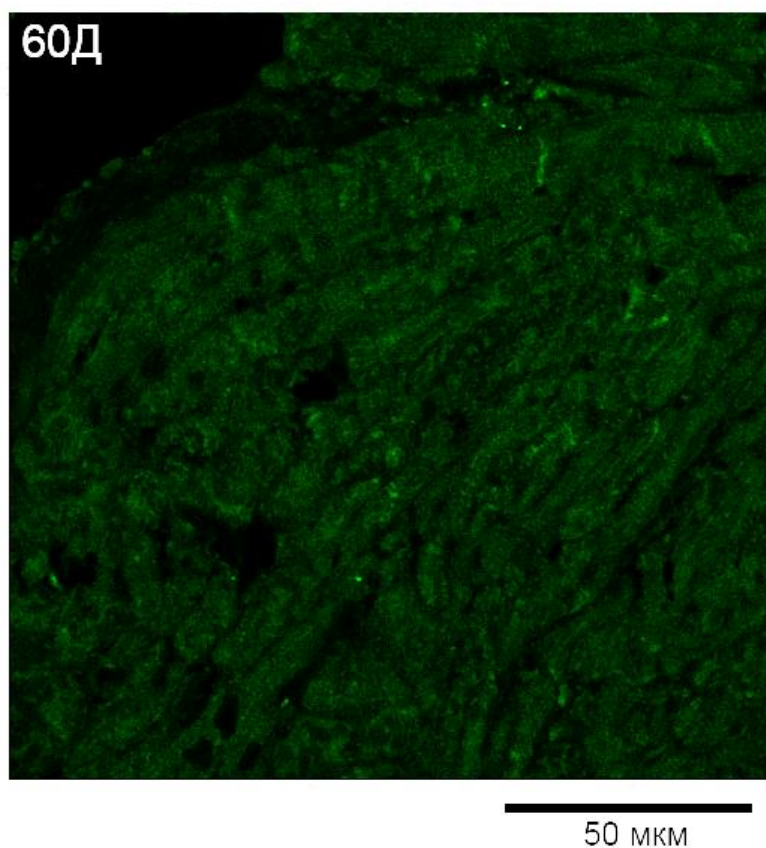


Рис. 3.42. Фотографии, полученные с помощью конфокального микроскопа, отражающие распределение β -адренорецепторов в миокардиальной ткани левого предсердия взрослой крысы (60Д).

3.7. Электрофизиологические свойства миокарда легочных вен у десимпатизированных животных

На предыдущих этапах исследования было установлено, что электрофизиологические свойства миокарда легочных вен изменяются в ходе постнатального развития, и временные интервалы этих изменений совпадают у крыс с периодом формирования симпатической иннервации миокарда. Данный этап работы направлен на выявление роли симпатической иннервации в преобразовании электрофизиологического фенотипа миокарда легочных вен. Для этого исследовали биоэлектрическую активность в легочных венах у животных с хронической неонатальной десимпатизацией. В данной серии экспериментов возрастную группу новорожденных животных (1 сут) не использовали, так как для легочных вен в этот период характерна базальная спонтанная активность.

3.7.1. Потенциал покоя и потенциал действия в легочных венах десимпатизированных животных на разных этапах постнатального развития

Электрически вызванные потенциалы действия

У десимпатизированных крыс ПД предсердного типа в легочных венах наблюдали также как и у контрольных животных, во всех возрастных группах (начиная с 7-и сут постнатального развития).

ДПД90% в препаратах ЛВ, полученных от крыс в возрасте 7Д, 14Д, 21Д, 60Д, составила 25 ± 5 мс, 23 ± 2 мс, 29 ± 3 мс, 42 ± 10 мс, соответственно (Рис.3.43.А, $n=4$ для каждой из групп). Значения ДПД90% в группах 7-, 14-, 21-дневных крыс статистически значимо отличались от таковых у взрослых крыс ($p < 0,05$). ДПД50% у крыс тех же возрастов составила 10 ± 3 мс, 7 ± 1 мс, 8 ± 1 мс, 15 ± 4 мс, соответственно (Рис.3.43.Б, $n=4$ для каждой из групп). Статистически значимые различия были обнаружены для групп 7-, 14- и 21-дневных крыс по сравнению со взрослыми животными ($p < 0,05$). При сравнении длительности ПД (ДПД90% и ДПД50%) у контрольных и десимпатизированных животных в соответствующих возрастных группах статистически значимых отличий обнаружено не было (Рис.3.44.). Таким образом, постнатальное увеличение длительности вызванных ПД в легочных венах сходно у контрольных и десимпатизированных крыс.

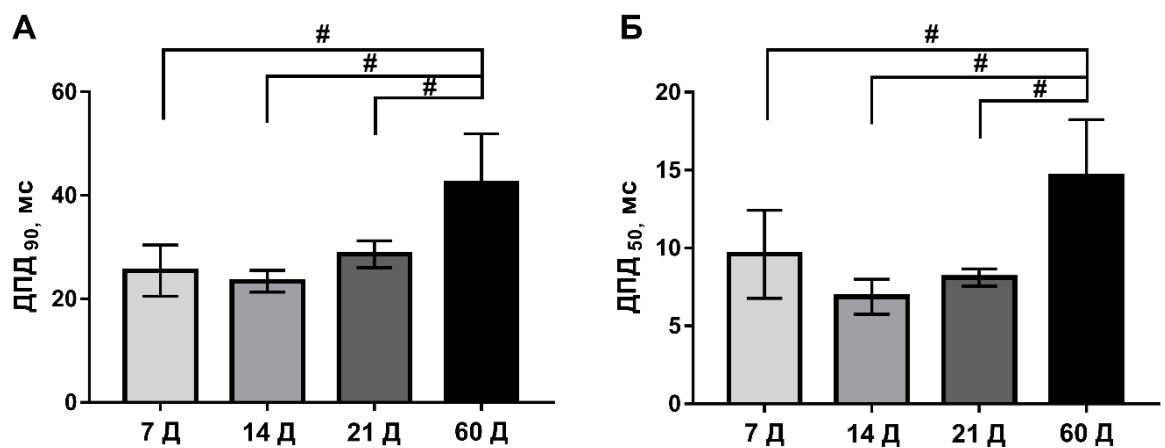


Рис. 3.43. Длительность ПД на уровне 90% (А) и 50% (Б) реполяризации в миокардиальной ткани ЛВ у десимпатизированных крыс разных возрастов. 7Д, 14Д, 21Д, 60Д – крысы, возрастом, 7, 14, 21 и 60 суток, соответственно. # - $p < 0,05$ (ANOVA), $n=4$ для каждой из групп.

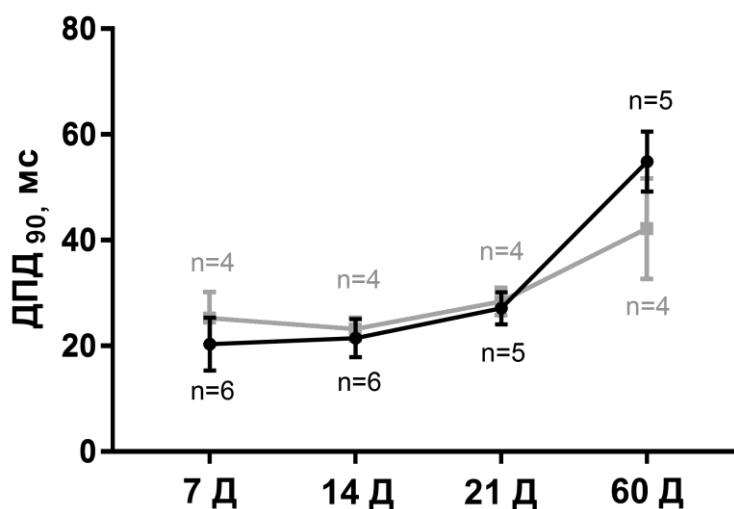


Рис. 3.44. Длительность ПД на уровне 90% реполяризации в миокардиальной ткани ЛВ у десимпатизированных (серый цвет) и контрольных (черный цвет) крыс разных возрастов. 7Д, 14Д, 21Д, 60Д – крысы, возрастом, 7, 14, 21 и 60 суток, соответственно.

Потенциал покоя

Потенциал покоя оценивали как в электрически стимулируемых, так и в покоящихся многоклеточных препаратах легочных вен десимпатизированных крыс (Рис.3.45.). Так, у крыс возрастом 7 сут в стимулируемом миокарде ПП составил -86 ± 5 мВ (n=5); ПП в покоящемся миокарде составил -85 ± 5 мВ (n=5). В данной серии экспериментов в миокарде ЛВ крыс возрастом 14 сут ПП при ритмической стимуляции составлял -79 ± 5 мВ (n=6), в покоящемся миокарде в этой возрастной группе -74 ± 4 мВ (n=5); у крыс возрастом 14 сут спонтанная деполяризация ПП не была статистически значимой и составляла 5 ± 4 мВ.

У крыс возрастом 21 сут ПП при стимуляции составил -80 ± 5 мВ (n=5), а ее прекращении -66 ± 3 мВ (n=4); спонтанная деполяризация ПП в данном случае была статистически значимой и составляла 14 ± 5 мВ. У взрослых десимпатизированных крыс ПП в ритмически стимулируемых легочных венах составил -81 ± 3 мВ (n=5), при отключении стимуляции наблюдали статистически значимый сдвиг потенциала покоя на 10 ± 5 мВ; ПП в покоящихся препаратах взрослых крыс составил -71 ± 5 мВ (n=4).

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.3.46.). Таким образом, постнатальное появление феномена спонтанной деполяризации ПП в миокарде легочных вен происходит у контрольных и десимпатизированных животных одинаково.

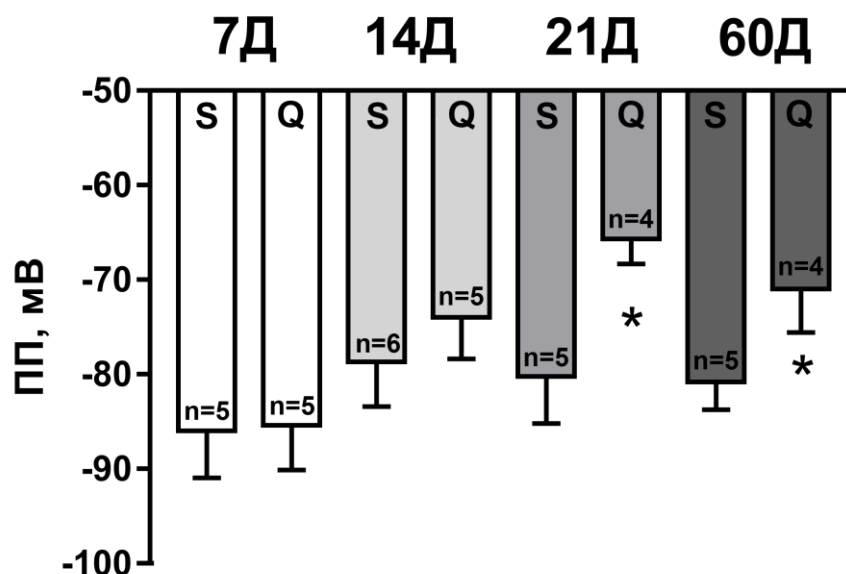


Рис. 3.45. Потенциал покоя в стимулируемых (S) и нестимулируемых (Q) препаратах ЛВ десимпатизированных крыс 7-, 14- и 21-суточного возраста и у взрослых крыс (60Д). *- $p < 0,05$.

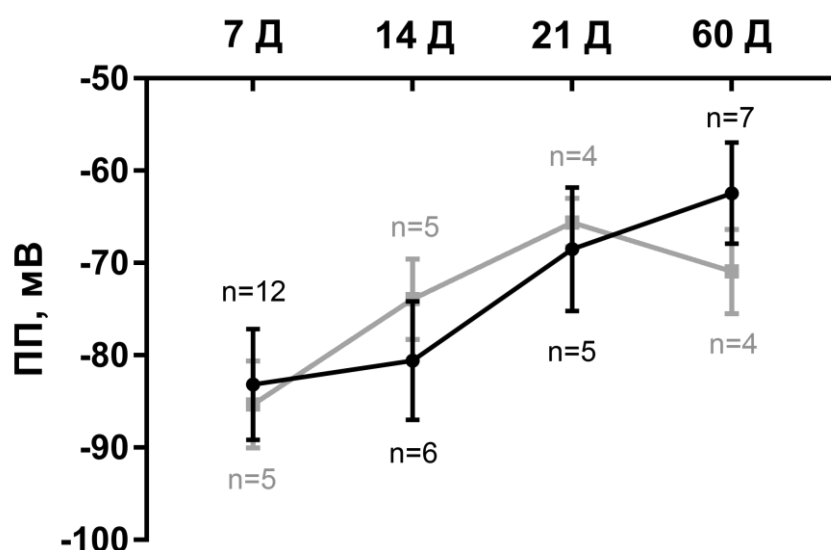


Рис. 3.46. Потенциал покоя в миокарде легочных вен десимпатизированных (серый цвет) и контрольных (черный цвет) крыс на разных этапах онтогенеза. 7Д, 14Д, 21Д, 60Д – крысы, возрастом, 7, 14, 21 и 60 суток, соответственно.

Спонтанная (автоматическая) активность в контрольных условиях

Спонтанные (автоматические) ПД в покоейся миокардиальной ткани ЛВ десимпатизированных крыс возрастом 7- (n=5), 14 (n=6), и 21 сут (n=5) и у взрослых крыс (60 сут, n=4) в контрольных условиях не наблюдали ни в одном из экспериментов. В отдельных экспериментах (не больше одного случая для каждой из возрастных групп) наблюдали

единичные ПД, возникающие во время стабилизации ПП после прекращения стимуляции. Данные ПД не рассматривали как автоматическую активность. Таким образом, десимпатизированные крысы не отличались от контрольных крыс по такому параметру, как склонность к формированию автоматической активности в базальных (контрольных) условиях.

3.7.2. Влияние норадреналина на биоэлектрическую активность миокарда легочных вен у десимпатизированных животных на разных этапах онтогенеза

Напомним, что как указано в разделе 3.3.1, норадреналин вызывает в легочных венах спонтанную активность залпового или регулярного характера. Способность НА индуцировать спонтанные ПД различна для легочных вен, полученных от крыс разного возраста: норадреналин вызывает спонтанную активность только в 20-30% случаев до окончания 2-й недели постнатального развития у контрольных животных, а к окончанию третьей недели жизни НА уже вызывает автоматию в 100% экспериментов.

В экспериментах с миокардиальными препаратами ЛВ, полученными от десимпатизированных животных возрастом 7 (n=6) и 14 (n=7) сут норадреналин (10 мкМ) не вызывал спонтанных ПД ни в одном случае.

У животных в возрасте 21 сут норадреналин (10 мкМ) вызывал спонтанную активность только в 50% препаратов (3 из 6). Спонтанная активность имела при этом только регулярный характер; частота следования спонтанных ПД при этом составила $0,75 \pm 0,5$ Гц, что существенно ниже частоты ПД, наблюдаемой при действии НА у контрольных животных. В двух случаях спонтанные потенциалы действия имели фазу МДД (Рис.3.47.).

В многоклеточных препаратах ЛВ, полученных от взрослых животных (60Д) НА (10 мкМ) индуцировал спонтанную активность регулярного характера также только в 50% случаев (в 3 препаратах из 6), частота спонтанных ПД не превышала $1,5 \pm 0,4$ Гц (в ЛВ взрослых контрольных животных частота спонтанных ПД составляла $3 \pm 0,5$ Гц по совокупности нескольких серий). Спонтанные потенциалы действия только в одном случае из трех имели фазу МДД.

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 (Рис. 3.48.).

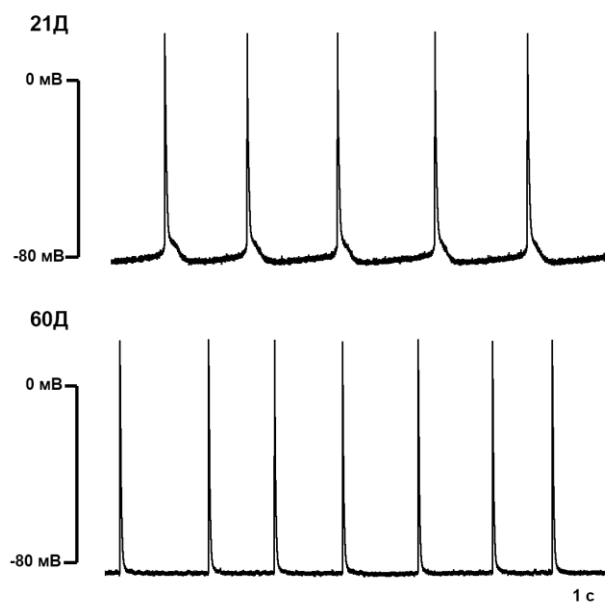


Рис. 3.47. Репрезентативные примеры спонтанной активности, вызываемой норадреналином (10 мкМ) в миокардиальной ткани легочных вен десимпатизированных крыс возраста 21 сут (21Д) и взрослых животных (60Д). На примере 21-дневных крыс показаны спонтанные потенциалы действия, имеющие фазу медленной диастолической деполяризации, на примере взрослых животных – без МДД.

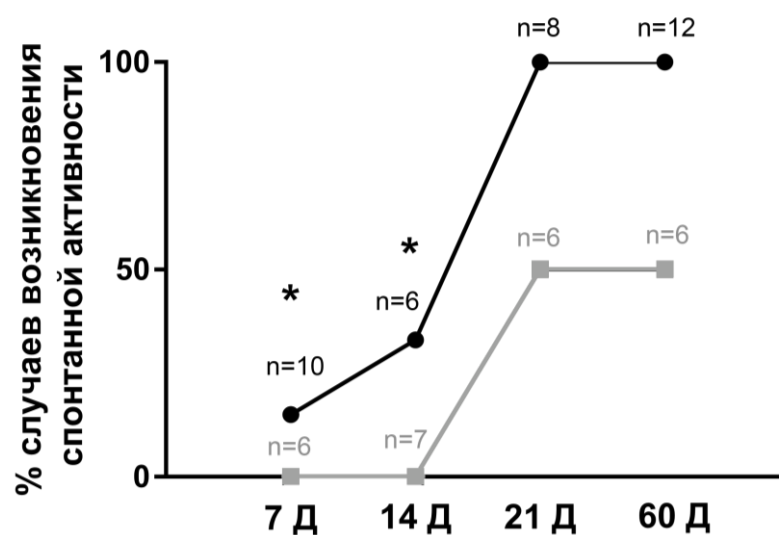


Рис. 3.48. Процент случаев возникновения спонтанной активности при действии норадреналина (10 мкМ) в миокарде легочных вен контрольных (черный цвет) и десимпатизированных (серый цвет) крыс (* - $p < 0,05$, точный тест Фишера).

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Особенности биоэлектрических свойств миокардиальной ткани легочных вен крыс в ходе постнатального онтогенеза

4.1.1. Особенности электрофизиологических свойств, характерных для зрелого миокарда легочных вен

В наших экспериментах регистрировали (1) ПД, возникающие при ритмической стимуляции тканевых венозно-предсердных препаратов возбуждающими стимулами (т.е. «электрически-вызванные» ПД), а также (2) биоэлектрическую активность в отсутствии электрической стимуляции. В обоих случаях регистрировали и оценивали ПП. Указанные два режима работы тканевых препаратов моделируют, в определенной степени (1) «естественные» условия, когда ткань легочных вен находится под ритмическим контролем ритмоводителя сердца, а также (2) «патологические» условия, когда возбуждение ткани легочных вен импульсами ритмоводителя заблокировано. В тех условиях, когда электрическая стимуляция отсутствует возникновение проаритмической активности более вероятно.

Особенности потенциалов действия

В наших экспериментах в базальных условиях в электрически стимулируемой ткани ЛВ взрослых крыс наблюдали ПД, сходные по конфигурации с таковыми в рабочем предсердном миокарде. Однако, длительность ПД в легочных венах была значимо больше, чем в трабекулярной части ЛП. Согласно литературным данным у крыс и морских свинок длительность ПД в области устья ЛВ, а также в самих ЛВ была больше, чем в ушке левого предсердия (Egorov et al., 2015; Miyauchi et al., 2005; Tsuneoka et al., 2017). В наших экспериментах (данные не представлены в работе) показано, что длительность ПД в устьях легочных вен мышей линии BALB/c значимо выше, чем в предсердном рабочем миокарде и дистальных участках легочных вен (Potekhina et al., 2019). Однако, у более крупных млекопитающих, например, у собак, наоборот, длительность ПД в миокарде ЛВ значительно меньше, чем в левом предсердии (Ehrlich et al., 2003). Можно предположить, что распределение длительностей ПД в разных участках венозно-предсердного препарата является видоспецифичным и, скорее всего, зависит от локального уровня экспрессии калиевых реполяризирующих токов, таких как K_{2P} и I_{K1} , реполяризирующего ионного тока I_{to} . Установлено, что у мышей линии MF1 длительность ПД увеличена в задней стенке предсердия. Этот участок ткани, как указано в разделе 1.3.1. является, по сути, частью миокарда легочных вен.

Увеличенная длительность ПД у мышей MF1 обусловлена сниженным уровнем экспрессии гена *Kcna4*, кодирующего канал Kv1.4, формирующим часть тока I_{to} . (Holmes et al., 2016).

В свою очередь, подавленная экспрессия *Kcna4*/ Kv1.4 в легочных венах может являться результатом пониженного уровня транскрипционных факторов, ответственных за поддержание электрофизиологических характеристик «рабочего миокарда» - Nkx2-5, Tbx 5, GATA4 (Mahida, 2014). Данные транскрипционные факторы определяют фенотип рабочего (предсердного или желудочкового) миокарда, за счет молекул, обеспечивающих быструю проводимость в кардиомиоцитах (коннексины Cx40, Cx43, каналы Nav1.5), а также стабильный, гиперполяризованный ПП (каналы Kir2.1/2.3). В ряде исследований прямо показано, что профиль экспрессии транскрипционных факторов в миокарде легочных вен существенно изменен (Boutilier et al., 2017), например, уровень Nkx2-5 существенно подавлен за счет антагонизма с фактором Shox2 (Mommersteeg et al., 2007, 2009; Ye et al., 2015).

В итоге, можно предположить, что увеличенная длительность электрически вызванных ПД в ЛВ является, в конечном итоге, отражением и результатом снижения уровня некоторых транскрипционных факторов.

Особенности потенциала покоя

Для миокарда легочных вен взрослых крыс характерен спонтанный сдвиг (или спонтанная деполяризация) потенциала покоя. Сдвиг ПП наблюдается в покоящихся препаратах, то есть тех препаратах, которые не генерируют ПД ритмически. В наших экспериментах сразу после прекращения электрической стимуляции легочных вен ПП начинает спонтанно (то есть без каких-либо дополнительных воздействий) сдвигаться в сторону менее отрицательных значений и устанавливается на новом уровне в течение 3-5 минут.

Спонтанный сдвиг ПП и менее негативное значение ПП по сравнению с рабочим миокардом предсердий, более близкое к уровню максимального диастолического потенциала в САУ, описан в легочных венах у целого ряда лабораторных животных: крыс (Doisne et al., 2009), мышей различных линий морских свинок (Tsuneoka et al., 2012). В настоящее время считается, что такая особенность миокарда ЛВ может быть обусловлена целым рядом механизмов: повышенная натриевая проводимость покоя, обусловленная особенностями инактивации потенциалуправляемых натриевых каналов Nav1.5 (Malécot et al., 2015), повышенная хлорная проводимость в сочетании с высоким цитоплазматическим уровнем Cl^- и равновесным потенциалом для Cl^- (Okamoto et al., 2014), сниженный уровень экспрессии каналов Kir2.x, проводящих трансмембранный калиевый ток I_{K1} (Tsuneoka et al., 2017). Как и в случае с электрически вызванными ПД, можно предположить, что причиной такой электрофизиологической особенности легочных вен, как сниженный уровень ПП является

измененный (по сравнению с рабочим миокардом) паттерн экспрессии транскрипционных факторов.

Как указано в разделе 1.3.2. миокардиальная ткань легочных вен формируется из тех клеток предшественников, для которых характерен «нормальный» уровень транскрипционных факторов, «ответственных» за электрофизиологический фенотип рабочего миокарда. В настоящее время остается не понятным, что является причиной снижения уровня транскрипционных факторов рабочего миокарда, а также, когда в ходе онтогенеза происходят предполагаемые изменения.

4.1.2. Изменение основных электрофизиологических свойств миокардиальной ткани легочных вен крыс в ходе постнатального онтогенеза

Потенциалы действия

В наших экспериментах ПД предсердного типа в миокардиальной ткани легочных вен наблюдали на всех протестированных этапах постнатального онтогенеза. Уже начиная с первых суток постнатального развития, миокардиальная ткань ЛВ способна отвечать на электрическую стимуляцию потенциалами действия, конфигурация которых сходна с таковой в рабочем миокарде предсердий. Длительность ПД по мере развития менялась сложным образом: у новорожденных крыс длительность ПД была больше, чем у 7-дневных крыс, однако у последующих возрастов этот параметр увеличивался, достигая максимума у взрослых крыс.

Известно, что для рабочего миокарда предсердий крысы (Пустовит и др., 2018), а также желудочков и предсердий мыши (Hoshino et al., 2012; Trépanier-Boulay et al., 2004) характерно постепенное снижение длительности ПД в ходе постнатального онтогенеза. Это связывают с изменением плотности калиевых трансмембранных токов, контролирующих реполяризацию ПД. В ходе первых двух - трех недель постнатального развития в рабочем миокарде грызунов снижается уровень экспрессии ионных каналов, формирующих т.н. токи задержанного выпрямления, к которым относятся I_{Kur} , I_{Kr} . Одновременно с этим происходит увеличение уровня экспрессии каналов, формирующих токи I_{ss} и I_{to} , которые обеспечивают возможность более быстрой реполяризации ПД (Hoshino et al., 2012; Nerbonne, 1998). Физиологическое значение данного явления, вероятно, заключается в адаптации электрической активности миокарда к высокой частоте сердечных сокращений. В ходе раннего постнатального развития у грызунов, в отличие от людей, ритм, генерируемый САУ значительно возрастает (Smotherman et al., 1991; Zehendner, Luhmann, and Yang, 2013). В связи с этим возникает необходимость приспособить ПД в рабочем миокарде таким образом, чтобы сохранить электрическую диастолу и исключить возникновение рефрактерных интервалов в ходе сердечного цикла.

Возможно, что в миокарде ЛВ в ходе постнатального онтогенеза также происходит изменение и экспрессии ионных каналов, а также величин реполяризующих токов формирующих фазу реполяризации ПД (Nerbonne et al., 2005; Niwa, 2010). Однако эти изменения должны быть противоположны тем изменениям, которые происходят в рабочем миокарде предсердий и желудочков, так как приводят не к уменьшению длительности ПД в ходе онтогенеза, а к ее увеличению. Функциональное значение обнаруженного изменения ПД в легочных венах остается неясным. Известно, что единственным участком сердца, где у взрослых грызунов сохраняется реполяризующий ток задержанного выпрямления I_{K1} является синоатриальный узел. В пользу того, что I_{K1} присутствует в миокарде легочных вен взрослых крыс указывают эксперименты, в которых высокоселективный блокатор этого тока вызывал в препаратах ЛВ увеличение длительности ПД (Егоров et al., 2012). Возможно, что увлечение длительности ПД в ходе онтогенеза является косвенным подтверждением процесса потери легочными венами фенотипа, характерного для рабочего миокарда.

Потенциал покоя

В наших экспериментах мы оценивали ПП как в электрически стимулируемом, так и в покоем миокарде ЛВ крысы на разных этапах постнатального онтогенеза. Мы выяснили, что спонтанная деполяризация ПП, которая наблюдается в легочных венах взрослых млекопитающих, отсутствует у новорожденных крыс, но увеличивается по мере развития, достигая максимума у взрослых животных.

Потенциал покоя определяется работой таких ионных насосов и каналов как Na/K-АТФаза, калиевые каналы утечки (K_{2P}), калиевые каналы аномального выпрямления ($Kir2.x$), хлорные токи. Однако известно, что наибольший вклад в стабильный потенциал покоя в рабочем миокарде вносят каналы $Kir2.x$, проводящие калиевый ток аномального выпрямления I_{K1} . В ряде работ показано, что плотность этого тока увеличивается в ходе постнатального онтогенеза в желудочковых кардиомиоцитах мыши (Grandy, 2007), крысы (Masuda et al., 1993; Wahler, 1992) и кролика (Huynh et al., 1992), а также в предсердных кардиомиоцитах мыши (Trépanier-Boulay et al., 2004). С другой стороны, также есть исследования, в которых показано, что по крайней мере в желудочковых кардиомиоцитах мыши плотность тока I_{K1} по мере развития может уменьшаться, а ПП становится менее негативным (Hoshino et al., 2012). В целом, большая часть литературных данных указывает на то, что в ходе постнатального онтогенеза происходит изменение экспрессии каналов и величины ионных токов, определяющих ПП. Возможно, это изменение в рабочем миокарде направлено на стабилизацию ПП на негативном уровне. В легочных венах наблюдается обратный феномен – сдвиг ПП в сторону более положительных значений, чем в рабочем миокарде. Такое изменение ПП в ходе

онтогенеза, в первую очередь, заставляет предположить снижение экспрессии Kir2.x и уменьшение плотности тока I_{K1} . Предположение о снижении уровня экспрессии Kir2.x косвенно подтверждаются нашими экспериментами с хлорохином (см. раздел 3.4.5). Хлорохин является блокатором калиевых каналов аномального выпрямления, к которым относятся Kir2.x. Хлорохин усиливал спонтанную деполяризацию ПП в легочных венах крыс 7 и 14 суток, у которых в контрольных условиях она была незначительной. Кроме того, хлорохин потенцировал эффекты норадреналина: на фоне хлорохина в ЛВ крыс возрастом 7 и 14 сут: спонтанная активность возникала почти также часто, как и у взрослых животных. Таким образом, подавление тока I_{K1} на ранних стадиях онтогенеза имитирует биоэлектрические свойства легочных вен у взрослых животных.

Следует отметить, что снижение количества TREK-1 ($K_{2P2.1}$) или TASK-1 каналов, изменение активности или экспрессии Na/K-АТФазы, изменение регуляции натриевых каналов Nav1.5, а также увеличение уровня фетального транспортера ионов хлора NKCC1, способствующего увеличению $[Cl^-]_i$ может также служить причиной «деполяризованного» уровня ПП у взрослых животных.

В итоге, результаты данной части работы позволяют предположить, что электрофизиологические особенности миокарда ЛВ, характерные для взрослых животных, не присущи этой ткани на ранних этапах развития, а формируются в ходе постнатального онтогенеза. В первые две-три недели постнатальной жизни (за исключением 1 суток) миокард легочных вен крысы по электрофизиологическим свойствам похож на рабочий миокард предсердий.

Базальная автоматия первых суток постнатальной жизни

В нашей работе мы впервые обнаружили склонность к автоматической активности миокардиальной ткани ЛВ неонатальных (1 сут) крыс. Мы установили, что все препараты ЛВ, полученные от крыс в конце первых суток после рождения, демонстрировали перманентную автоматию в контрольных условиях. Эта особенность у крыс сохраняется до 2-3 сут постнатальной жизни. Следует отметить, что миокард легочных вен неонатальных животных обладал еще одной особенностью. В ЛВ крыс возрастом 1 сут длительность электрически вызванных ПД была существенно больше, чем на 7-21 сутки постнатальной жизни. На данном этапе работы нельзя дать четкий ответ, почему миокард легочных вен в период, следующий непосредственно за рождением, обладает ярко выраженной способностью к автоматии, которая быстро исчезает, видимо, в течение 1-2 суток. Однако известно, что перинатальный период сопровождается резким изменением работы всех систем плода, в том числе эндокринной. Роды

сопровожаются сильным повышением уровня катехоламинов в плазме крови матери и плода, в том числе за счет активации высвобождения норадреналина из надпочечников плода (Ronca et al., 2006). Возможно, что наблюдаемая нами автоматия «1-х суток» в легочных венах, является результатом перинатальной стимуляции миокарда катехоламинами или другими регуляторными соединениями, а прекращение автоматии в течение первых суток является результатом постнатального снижения и стабилизации уровня регуляторных соединений.

Результаты данного исследования позволяют предположить и другую причину феномена автоматии в легочных венах новорожденных крыс. Известно, что фетальный миокард способен продуцировать катехоламины. Источником норадреналина являются либо специализированные клетки (ICA клетки, см. раздел 1.9), либо сами неонатальные кардиомиоциты (Ebert and Taylor, 2006). Предполагается, что эндогенный норадреналин служит для стимуляции частоты сердечных сокращений и сократимости миокарда в перинатальный период, тогда, когда симпатическая иннервация отсутствует, а циркулирующих катехоламинов недостаточно. Возможно, что автоматия первых суток в легочных венах обусловлена норадреналином, высвобождаемым самим миокардом легочных вен. Косвенным подтверждением этого предположения является то, что в препаратах ЛВ неврожденных животных наблюдался гораздо более высокий уровень делокализованной флюоресценции аддуктов катехоламинов и глиоксиловой кислоты, чем в препаратах, полученных от крыс на более поздних этапах жизни. Повышенный уровень флюоресценции может свидетельствовать о повышенном ненейрональном содержании (и его высвобождении) катехоламинов в неонатальном миокарде легочных вен. Прекращение перманентной автоматии в ЛВ спустя несколько суток может быть результатом прекращения активности ICA клеток.

Такой феномен как увеличенная длительность ПД у новорожденных крыс, возможно, обусловлен также влиянием катехоламинов миокардиального происхождения. Вероятно, что у новорожденных животных длительность ПД увеличена в результате вызванного катехоламинами повышения $[Ca^{2+}]_i$ стимуляции деполяризующего кальциевого тока L-типа (I_{CaL}) и деполяризующей компоненты I_{NCX} .

4.2. Эффекты агонистов адренорецепторов на биоэлектрическую активность миокардиальной ткани легочных вен у крыс на разных этапах онтогенеза

4.2.1. Действие норадреналина, фенилэфрина и изопротеренола на миокард легочных вен взрослых крыс

В наших экспериментах в миокарде легочных вен взрослых крыс норадреналин вызвал двухфазное изменение потенциала покоя, которое предшествовало инициации спонтанных

потенциалов действия. Норадреналин вызвал спонтанные ПД в 100% случаев. Агонисты α_1 - и β -адренорецепторов по отдельности приводили только к однофазным изменениям ПП: деполяризации или гиперполяризации, которые также наблюдались в 100% экспериментов. Селективная активация адренорецепторов не приводила к индукции спонтанной активности. Таким образом, эктопическая адренергическая автоматия является атрибутом миокарда легочных вен взрослых крыс.

Согласно литературным данным, в ответ на адренергическую стимуляцию миокардиальная ткань ЛВ большого количества видов млекопитающих генерирует спонтанные ПД. Эта особенность показана для грызунов (крысы, морские свинки) собак, кроликов, продемонстрирована в кардиомиоцитах ЛВ человека (исследования проводились на изолированных кардиомиоцитах) (Chen et al., 2002; Chen et al., 2000; Egorov et al., 2015; Lai et al., 2008; Namekata et al., 2010; Okamoto et al., 2014; Tsuneoka et al., 2012). Вероятно, реакция на норадреналин сходна в зрелом миокарде легочных вен всех млекопитающих. Однако эффекты действия селективных агонистов α_1 - и β -адренорецепторов являются видоспецифичными. Так, было показано, что у морских свинок стимуляция α_1 -адренорецепторов или совместная активация α_1 - и β -адренорецепторов приводит к формированию спонтанной активности, тогда как активация исключительно β -адренорецепторов её не вызывает (Irie et al., 2017). В миокарде ЛВ мыши спонтанная активность возникает как при совместной активации α_1 - и β -адренорецепторов норадреналином, так и при селективной активации отдельно α_1 -адренорецепторов (фенилэфрином) и β -адренорецепторов (изопротеренолом) (Lai et al., 2008; Tsuneoka et al., 2012). Результаты наших экспериментов соответствуют литературным данным. В литературе описано, что у крыс только одновременная активация α_1 - и β -адренорецепторов норадреналином приводит к возникновению спонтанной активности; по отдельности агонисты α_1 - и β -адренорецепторов приводят лишь к разнонаправленному изменению потенциала покоя (Doisne et al., 2009). В экспериментах с регистрацией механической активности изолированных полосок ЛВ крыс было показано, что эктопические сокращения возникают при действии норадреналина, но не фенилэфрина или изопротеренола (Mauroil et al., 2007). У крыс, как видно из литературных данных и наших экспериментов, и, вероятно, у большинства млекопитающих для возникновения спонтанной активности необходима именно аддитивная активация обоих подтипов адренорецепторов.

Возможно, что α_1 - и β -адренорецепторы в легочных венах играют различную роль. Предполагается, что α_1 -адренорецепторы оказывают «пермиссивное» или «триггерное» действие, в то время как β -адренорецепторы определяют паттерн эктопической автоматии (Tsuneoka et al., 2017). Активация α -адренорецепторов приводит к сдвигу (деполяризации) мембранного потенциала до критического уровня, при котором спонтанная инициация

потенциалов действия становится возможной. Вклад β -адренорецепторов может заключаться в контроле факторов, регулирующих частоту спонтанных ПД, коим может быть увеличение диастолического уровня цитоплазматического кальция и амплитуды «кальциевых волн». В разделе 4.3 приводится обсуждение вероятных внутриклеточных механизмов, обуславливающих триггерный эффект активации α_1 -адренорецепторов, а также эффект активации β -адренорецепторов.

На основании наших экспериментов с норадреналином, фенилэфрином и изопротеренолом очевидно, что α_1 - и β -адренергические эффекты имеют различную динамику: β -адренергическая гиперполяризация ПП в легочных венах крыс развивается гораздо быстрее, чем деполяризация, вызванная стимуляцией α_1 -адренорецепторов. Целый ряд факторов может обуславливать такие различия в динамике. Среди них следует указать разницу в количестве α_1 - и β -рецепторов в мембране кардиомиоцитов. Еще одной причиной может быть ядерное расположение α_1 -адренорецепторов. В ходе этой работы установлено, что в кардиомиоцитах ЛВ взрослых крыс действительно значительная часть α_{1A} -адренорецепторов имеет ядерное расположение. Как известно, для активации ядерных α_1 -адренорецепторов необходим трансмембранный транспорт нейромедиатора и накопление его в околоядерной цитоплазме, что занимает существенное время и замедляет процесс активации сопряженных с рецепторами сигнальных каскадов (Wu and O'Connell, 2014).

4.2.2. Действие норадреналина, фенилэфрина и изопротеренола на миокард легочных вен в ходе раннего постнатального развития

В данной работе установлено, что в ходе постнатального развития влияние норадреналина, а также селективных агонистов адренорецепторов на биоэлектрическую активность легочных вен усиливается. На 7-е и 14-е сут жизни норадреналин вызывал спонтанную активность в 20% и 33% случаев, а на 21-е сутки – уже в 100% экспериментов, как и у взрослых животных.

Гиперполяризующий эффект активации β -адренорецепторов изопротеренолом, а также деполяризация потенциала покоя при активации α_1 -адренорецепторов фенилэфрином возрастает в ходе постнатальной жизни, статистически значимого уровня эффекты достигают на 21 сут жизни (Рис. 3.11.).

Гиперполяризация, вызываемая норадреналином – хорошо описанное явление. В рабочем предсердном и желудочковом миокарде, где ПП стабилен и достигает -82 - -84 мВ, норадреналин и ацетилхолин вызывают гиперполяризацию на 1,5-3 мВ. Этот эффект обусловлен способностью $\beta\gamma$ -субъединицы некоторых рецепторов активировать каналы Kir3.1/3.4, проводящие гиперполяризующий, ацетилхолинзависимый ток $I_{K_{ACH}}$. Механизмы β -

адренергической гиперполяризации в легочных венах будут рассмотрены в разделе 4.3. Однако, постнатальное увеличение гиперполяризующего эффекта изопротеренола можно связать с появлением спонтанной деполяризации потенциала покоя в легочных венах в ходе онтогенеза. Гиперполяризация в миокарде возможна только вплоть до некоторой величины, которая близка к равновесному потенциалу K^+ . Как это описано выше, в ходе развития ПП в легочных венах становится все менее отрицательным, что позволяет и быть большему сдвигу мембранного потенциала при гиперполяризации.

Влияние активации α_1 -адренорецепторов на ПП также растет в ЛВ в ходе постнатальной жизни. Однако, эта особенность не может быть объяснена так просто, как в предыдущем случае. Вероятно, что в основе постнатального увеличения эффекта фенилэфрина лежит изменение цитоплазматической концентрации ионов, изменение экспрессии ионных каналов и переносчиков.

Постнатальное усиление эффектов катехоламинов можно было бы объяснить таким простым фактом, как появление или увеличение количества адренорецепторов в мембране кардиомиоцитов ЛВ не ранее определенного этапа онтогенеза. Однако, как показали наши исследования, адренорецепторы присутствуют в кардиомиоцитах уже неонатальных легочных вен, более того - их количество вплоть до 2-го месяца жизни меняется незначительно. Соответственно, следует предполагать более тонкие механизмы, обуславливающие изменения чувствительности к адренергической стимуляции. Такие механизмы могут быть связаны с дополнительным действием на миокард легочных вен котрансмиттеров, которые начинают высвобождаться вместе с основным нейромедиатором при созревании и активации симпатической иннервации.

Итак, электрофизиологические реакции легочных вен на адренергические воздействия изменяются в ходе постнатального онтогенеза. Эти изменения протекают в тот же временной период, что и изменения собственных биоэлектрических свойств (т.е. свойств, наблюдаемых в контрольных условиях) легочных вен. Миокард ЛВ приобретает способность генерировать спонтанную эктопическую активность при действии норадреналина. Этот феномен служит подтверждением того, что проаритмогенные свойства легочные вены приобретают только в ходе постнатального онтогенеза.

4.3. Возможные механизмы действия агонистов адренорецепторов в миокарде легочных вен крыс

4.3.1. Возможные механизмы деполяризации, вызываемой фенилэфрином в миокарде легочных вен крысы

Как было указано выше, в наших экспериментах активация α_1 -адренорецепторов ФЭ в покоящихся препаратах ЛВ крысы приводила к деполяризации мембранного потенциала начиная с 21-го дня жизни. Известно, что стимуляция α_1 -адренорецепторов приводит к активации внутриклеточного сигнального каскада, последовательными элементами которого являются фосфолипаза C и различные типы протеинкиназы C [Steinberg, 2012]. В наших экспериментах мы использовали ингибитор фосфолипазы PLC β -1 (наиболее распространенная форма в кардиомиоцитах), а также ингибитор PKC, чтобы выявить роль этого каскада в регуляции ПП в легочных венах крысы. В наших экспериментах ни ингибитор PLC, ни ингибитор PKC не подавляли деполяризацию, вызываемую фенилэфрином. Соответственно, роль каскада PKC в α -адренергической деполяризации, оказывается под вопросом. Можно предположить, что α -адренергическая деполяризация обусловлена PLC- и PKC-независимыми механизмами.

Известно, что в кардиомиоцитах стимуляция α_1 -адренорецепторов может приводить к активации фосфолипазы D (Mier et al., 2002). Активация PLD может происходить как посредством PKC, так и независимо от протеинкиназы [Balboa, 1998]. В наших экспериментах блокатор PLD не оказывал существенного влияния на сдвиг ПП, вызываемый фенилэфрином. Таким образом, роль данного внутриклеточного пути в реализации эффектов фенилэфрина, также остается под вопросом.

Имеется большой объем литературных данных, указывающих на существование множества хлорных ионных каналов в кардиомиоцитах. По разным данным равновесный потенциал для хлора (E_{Cl}) в миокарде колеблется от -80 до -40 мВ (Hiraoka et al., 1998; Huang, 2011). Как и в других клетках значение E_{Cl} определяется уровнем $[Cl^-]_i$ и соотношением активности двух трансмембранных транспортеров этого иона: NKCC1, преимущественно экспрессируемого в фетальных клетках, и KCC2. В том случае, когда преобладает активность NKCC1, E_{Cl} имеет значения, положительнее ПП, и усиление хлорной проводимости будет приводить к деполяризации. Этот эффект может наблюдаться даже в миокарде легочных вен крысы, где ПП = -65 мВ. Данные о рецепторных и внутриклеточных механизмах регуляции хлорных токов многообразны и противоречивы, однако есть сведения, что стимуляция α_1 -адренорецепторов может приводить к усилению хлорной проводимости. Такие эффекты показаны для гладкомышечной ткани (Gould, 1996; Lamb, 2000). Поэтому мы решили изучить

возможный вклад хлорных токов в деполяризацию, вызываемую активацией α_1 -адренорецепторов. Неселективный блокатор хлорных токов SITS вызывал сдвиг ПП в сторону отрицательных значений мембранного потенциала в контрольных условиях. Таким образом, хлорные токи, скорее всего действительно принимают участие в спонтанной деполяризации, наблюдаемой в миокарде легочных вен крысы. Однако, SITS не оказывал влияния на деполяризующий эффект фенилэфрина. То есть роль хлорных токов в α_1 -адренорецепторзависимой деполяризации в миокарде легочных вен опять же, оказывается, под вопросом.

Потенциал покоя в рабочих кардиомиоцитах определяется током аномального выпрямления I_{K1} . Как известно, для кардиомиоцитов синоатриального узла сердца свойственно низкое значение ПП именно благодаря отсутствию I_{K1} . Следует отметить, что медленная диастолическая деполяризация и спонтанная генерация ПД в САУ возможны только при низком значении потенциала покоя. В ряде работ было показано, что одной из причин нестабильного потенциала покоя в миокарде легочных вен является низкая плотность тока I_{K1} (Melnyk et al., 2005).

Активация как α -, так и β -адренорецепторов приводит к ингибированию тока I_{K1} (Anumonwo, 2010). Как указано выше (раздел 1.8.3), величина эффекта агонистов адренорецепторов зависит от преобладающего подтипа каналов Kir2.x в том или ином отделе сердца. Были проведены исследования, в которых каналы Kir2.x коэкспрессировали с α_{1A} -адренорецепторами в клетках *Xenopus*. Установлено, что фенилэфрин оказывал ингибиторный эффект только на Kir2.2 и Kir2.3, но не на Kir2.1 каналы. Кроме того, было показано, что подавление тока, проводимого Kir2.2 опосредовано src-тирозинкиназой, т.е. независимо от РКС, тогда как ингибирование Kir2.3 связано с действием РКС (Wang et al., 2001). Также известно, что $\beta\gamma$ -субъединица активированных G-белков, напрямую связывается с каналами Kir2.x и вызывает уменьшение проводимого ими тока (Cohen et al., 1996).

Таким образом, наиболее вероятным механизмом PLC-, РКС-независимой деполяризации, обусловленной активацией α_1 -адренорецепторов, является подавление тока I_{K1} $\beta\gamma$ -субъединицей G-белка, которое в миокарде легочных вен может приводить к сильному сдвигу ПП за счет исходно низкой плотности каналов Kir2.x. Однако, и другие механизмы могут лежать в основе вышеуказанного явления, например, подавление калиевых токов утечки I_{leak} .

Сердечные патологии (суправентрикулярные аритмии, сердечная недостаточность), часто сопровождаются генетически опосредованными нарушениями работы каналов, проводящих ток I_{K1} . Подавление тока I_{K1} способствует возникновению спонтанной активности

и соответствующему возникновению аритмий. Поэтому, чрезмерная симпатическая активация усиливает проаритмогенные изменения в миокарде легочных вен.

4.3.2. Возможные механизмы гиперполяризации, вызываемой изопротеренолом в миокарде легочных вен

В наших экспериментах β -агонист изопротеренол вызывал гиперполяризацию ПП в миокарде легочных вен крысы. Стимуляция β -адренорецепторов приводит к активации внутриклеточного сигнального каскада, последовательными элементами которого являются аденилатциклаза и протеинкиназа А (Saucerman, 2006; Xiao et al., 2006).

Форсколин – активатор аденилатциклазы, приводил к гиперполяризации, практически равной по величине с таковой, вызываемой ИЗО, то есть, эффект активации АЦ совпадал с эффектом активации β -адренорецепторов. Неселективный ингибитор фосфодиэстераз IBMX также вызывал в миокарде ЛВ гиперполяризацию, как и ИЗО, хоть и меньшую по величине. Фосфодиэстеразы являются ферментами, расщепляющими циклические нуклеотиды в клетке (сAMP, сGMP), тем самым снижая их активность (Fischmeister et al., 2006). Ингибирование фосфодиэстераз приводит к повышению уровня сAMP при базальной активности АЦ. В наших экспериментах эффект IBMX (гиперполяризация) составил только 60% от эффекта активации АЦ форсколином, а также от эффекта активации β -адренорецепторов изопротеренолом. Таким образом, результаты опытов с форсколином и IBMX позволяют предположить, что β -адренергическая гиперполяризация в ЛВ крысы большей частью определяется АЦ и сAMP, и, скорее всего не связана с эффектами $G_{\beta\gamma}$ -субъединицы Gs-белка.

Ингибирование протеинкиназы А посредством блокатора KT5720 приводило к подавлению эффекта ИЗО на 67%, посредством блокатора H-89 - на 42%, Rp-adenosine-cAMP блокировал эффект ИЗО на 30%. – то есть каждый из используемых блокаторов РКА подавлял эффект активации β -АР, но не полностью. Таким образом, гиперполяризация, наблюдаемая в покое миокарде ЛВ крысы в ответ на активацию β -адренорецепторов ИЗО, в значительной степени обусловлена активацией «классического» внутриклеточного сAMP-зависимого сигнального каскада и РКА.

В отдельной серии экспериментов нами был использован блокатор аденилатциклазы MDL. Блокирование АЦ приводило к деполяризации ПП в миокарде легочных вен. Эффект, оказываемый блокатором аденилатциклазы на потенциал, а также сохранение эффекта изопротеренола при действии блокатора АЦ также остается неясным. Возможно, что для кардиомиоцитов ЛВ, как для пейсмекерных кардиомиоцитов синусного узла, характерен высокий базальный уровень активности АЦ. Сохранение эффектов изопротеренола на фоне

MDL можно объяснить более высокой эффективностью или сродством естественного агониста (в данном случае, активированной $G\alpha$ -субъединицы) по сравнению с блокатором (MDL).

Наши эксперименты позволяют предположить, что часть эффекта ИЗО может реализовываться и без участия РКА. Известно, что cAMP способен напрямую связываться с некоторыми ионными каналами. Наиболее известным примером являются HCN каналы (cyclic nucleotide gated channels), которые в синоатриальном узле сердца обеспечивают, так называемый, пейсмекерный ток I_f (Clair et al., 2013). Вклад тока I_f в эффект ИЗО в наших экспериментах является маловероятным, так как β -адренергическая стимуляция приводит к усилению тока I_f и деполяризации, а не к гиперполяризации мембранного потенциала (как происходило в нашей работе). Возможно, что в кардиомиоцитах ЛВ крысы cAMP оказывает прямое влияние на калиевые каналы токов задержанного выпрямления (hERG), как это показано в желудочковом миокарде (Cui et al., 2000). Показано, что cAMP способен РКА-независимо стимулировать экзоцитоз пресинаптических везикул (Seino, 2005). In vivo РКА-независимая составляющая β -адренергической гиперполяризации может быть связана со стимуляцией cAMP-зависимого высвобождения нейромедиаторов вегетативных интрамуральных постганглионарных окончаний, сохраняющихся в многоклеточных миокардиальных препаратах. Например, высвобождение ацетилхолина из парасимпатических постганглионаров может вызывать гиперполяризацию в кардиомиоцитах легочных вен.

Также известно, что при стимуляции β -адренорецепторов, cAMP может активировать не только РКА, но и белки Ерас (Exchange protein directly activated by cAMP - обменные белки, активируемые cAMP) (Kawasaki et al., 1998; Rooij de et al., 1998). Показано, что в кардиомиоцитах крыс есть два вида Ерас: Ерас1 и Ерас2, их активация приводит к разным эффектам, однако до конца их роль не изучена. Считается, что активация Ерас1 связана с развитием гипертрофии миокарда, тогда как активация Ерас2 может приводить к развитию желудочковых аритмий за счет изменения кальциевой динамики в кардиомиоцитах. В случае активации Ерас2 происходит СаМКП-зависимая стимуляция выброса кальция, который происходит через рианодиновые рецепторы СРР, подвергшиеся фосфорилированию (Pereira et al., 2015). Также было показано, что неселективная активация Ерас приводит к увеличению длительности ПД в желудочковых кардиомиоцитах крысы за счет ингибирования реполяризирующего тока I_{ss} (Brette et al., 2013). Возможно, в наших экспериментах гиперполяризация, вызываемая действием ИЗО, частично связана с активацией Ерас, и происходит за счет изменения кальциевой динамики.

В итоге, результаты наших экспериментов позволяют предположить, что гиперполяризация ПП в миокардиальной ткани легочных вен при активации β -адренорецепторов обусловлена «классическим» каскадом АС/cAMP/РКА и частично РКА-

независимыми механизмами. Можно предположить, что соотношение указанных путей в реализации эффектов β -адренорецепторов может меняться в ходе онтогенеза.

4.3.3. Роль Na/K-АТФазы в сдвиге потенциала покоя, вызываемого адренергическими воздействиями

Активированная РКА оказывает влияние на Na/K-АТФазу (НКА) за счет фосфорилирования PLM, преимущественно, по Ser68. При этом, происходит активация НКА, увеличение аффинности Na/K-АТФазы к натрию (Pavlovic, 2013). Имеются работы, в которых показано, что β -адреностимуляция, как и α -адреностимуляция, может приводить к подавлению работы НКА (Gao et al., 1998; Ishizuka, 1993). Показано, что РКА-зависимое ингибирование работы НКА происходит при сниженном уровне $[Ca^{2+}]_i$, наблюдающемся при различных патологиях. Однако, в большинстве экспериментальных исследований наблюдали как РКС-зависимую, так и РКА-зависимую стимуляцию НКА, но не подавление её работы. При этом происходило увеличение скорости работы помпы (по крайней мере в желудочковых кардиомиоцитах мыши) (Bossuyt et al., 2009). Стимуляция НКА приводит к усилению, генерируемого ей гиперполяризующего ионного тока (I_p). Этот ток, хотя бы отчасти, может лежать в основе гиперполяризации в миокарде легочных вен крысы, вызываемой β -адреностимуляцией.

Как указано выше (раздел 1.8.1), величина сдвига мембранного потенциала, вызванная током I_p , в рабочем миокарде лежит в диапазоне нескольких милливольт. Однако величина I_p критически зависит от цитоплазматической концентрации Na^+ . Как известно, входящий быстрый натриевый ток отсутствует в центральной части синусного узла, поэтому в этой области $[Na^+]_i$ ниже, чем в рабочем миокарде. Хорошо известно, что наиболее отрицательное значение ПП в САУ гораздо меньше, чем в рабочем миокарде. Наряду с другими причинами, такой уровень ПП определяется низким значением $[Na^+]_i$, низкой интенсивностью работы НКА и незначительным током I_p . Уровень $[Na^+]_i$ в поющих кардиомиоцитах легочных вен крысы, неизвестен. Однако, есть сведения, что проводимость покоя по Na^+ в легочных венах гораздо больше, чем в предсердном миокарде. Если $[Na^+]_i$ велика, то РКА-зависимая гиперполяризация, определяемая вкладом тока помпы I_p , может достигать 10 мВ.

Таким образом, повышенный уровень $[Na^+]_i$ должен способствовать поддержанию ПП в легочных венах на уровне, характерном для рабочего миокарда. Однако этого не происходит (ПП в контрольных условиях составляет -65 мВ). Возможно, что для легочных вен характерна низкая плотность НКА, либо ее специфическая регуляция, в результате чего НКА активируется только при стимуляции β -адренорецепторов.

Возникает вопрос, почему активация РКС не приводит к гиперполяризации за счет I_p ? В литературе представлены данные, указывающие на то, что активированная РКС может как стимулировать, так и подавлять работу Na/K-АТФазы (Han et al., 2006; Lundmark et al., 1999; White et al., 2009). Предполагается, что действие РКС на Na/K-АТФазу зависит от уровня цитоплазматического кальция. Известно, что в сердце экспрессируется ряд изоформ РКС, различающихся по чувствительности к $[Ca^{2+}]_i$. Для различных изоформ РКС характерен разный паттерн фосфорилирования PLM. Активация агонистом α -адренорецепторов, в зависимости от состояния кардиомиоцита, может приводить к активации («рекрутингу») различных наборов протеинкиназ C, что определяет характер итогового суммарного влияния на NKA.

4.3.4. Роль NCX в сдвиге потенциала покоя, вызываемого адренергическими воздействиями в легочных венах

В том случае, когда ритмическое возбуждение кардиомиоцитов рабочего миокарда и генерация ПД отсутствуют, уровень цитоплазматического Ca^{2+} остается на постоянном низком «диастолическом» уровне (10-50 нМ). В таких условиях равновесный потенциал для NCX (E_{NCX}) составляет около -40 мВ (Blaustein et al., 1999). Это значит, что при потенциале покоя NCX будет генерировать деполяризующий ток. В нормальных условиях величина деполяризующей составляющей I_{NCX} при ПП невелика у крыс, однако увеличение диастолического уровня $[Ca^{2+}]_i$ приводит к усилению деполяризующего «диастолического» тока I_{NCX} . Согласно одной из гипотез, деполяризующий компонент I_{NCX} играет существенную роль в формировании автоматии в сино-атриальном узле сердца. Диастолический уровень $[Ca^{2+}]_i$ выше в пейсмекерных кардиомиоцитах, чем в работающих кардиомиоцитах правого или левого предсердий (Jones et al., 2008). На заключительной стадии медленной диастолической деполяризации (МДД), уровень цитоплазматического кальция в САУ еще выше, чем в начальную фазу электрической диастолы. В эту фазу NCX обеспечивает деполяризующий ток, который ускоряет МДД, способствуя более быстрому достижению потенциала активации кальциевых каналов L-типа и «запуска» ПД в пейсмекере (Karoog et al., 2015). Можно было бы предположить, что I_{NCX} способствует сдвигу ПП в сторону положительных значений в покоящихся клетках легочных вен.

Фосфорилирование обменника протеинкиназой A приводит, как описано выше, к одинаковому усилению компонент тока I_{NCX} . Это значит, что NCX не должен лежать в основе гиперполяризации, вызываемой активацией β -адренорецепторов в легочных венах, поскольку, согласно теоретическим представлениям, в диапазоне мембранного потенциала -80 - -60 мВ генерирует деполяризующий ток.

Представления о механизме работы NCX позволяют сделать еще одно важное предположение: применение блокаторов NCX в контрольных условиях в покоем миокарде легочных вен должно приводить к гиперполяризации ПП. Однако, в наших экспериментах применение двух разных блокаторов NCX приводило к противоположному эффекту – деполяризации. Причины этого явления остаются не до конца понятными. Как известно, значение равновесного потенциала для I_{NCX} рассчитывается по следующей формуле:

$$E_{Na/Ca} = 3E_{Na} - 2E_{Ca},$$

где E_{Na} – равновесный потенциал для Na^+ , E_{Ca} – равновесный потенциал для Ca^{2+} . Соответственно, увеличение цитоплазматической концентрации Na^+ , будет приводить к сдвигу $E_{Na/Ca}$ в отрицательную сторону. Для того, чтобы $E_{Na/Ca}$ достиг значения -70 мВ $[Na^+]_i$ должен измениться с 12-16 (характерно для крысы) до 24 мМ. NCX будет генерировать гиперполяризующий ток, если его равновесный потенциал отрицательнее мембранного (например $E_{Na/Ca} = -70$ мВ). Если принять $E_{Na/Ca} = -70$ мВ, то при наблюдаемом ПП в легочных венах -65 мВ NCX в покое в контрольных условиях должен генерировать гиперполяризующий ток, а применение блокаторов NCX будет приводить к деполяризации. Более того, подавление такого тока будет облегчать возникновение спонтанной активности или приводить к увеличению частоты следования спонтанных ПД (что и наблюдали в опытах с бензамилем). Таким образом, наблюдаемые в наших экспериментах, явления могут быть объяснены высокой натриевой проводимостью в легочных венах в состоянии покоя.

В кардиомиоцитах разных видов животных молекулы NCX преимущественно располагаются на цитоплазматической мембране Т-тубул в непосредственной близости от Na/K-АТФазы и RyR (локализованных на мембране латеральных цистерн СПР). Имеются данные о колокализации NCX и IP_3R в кардиомиоцитах легочных вен крысы (Okamoto et al., 2012). Неравномерное распределение молекул NCX в мембране имеет функциональное значение. В результате тесного взаиморасположения с RyR или IP_3R работа NCX преимущественно определяется локальной концентрацией ионов кальция и натрия, и практически не зависит от «средней» цитоплазматической концентрации ионов. Следствием локальной регуляции NCX является то, что при незначительном изменении «среднего» $[Ca^{2+}]_i$ или $[Na^+]_i$, возможен значительный локальный сдвиг мембранного потенциала за счет I_{NCX} , вызванной локальным выбросом Ca^{2+} , либо локальным увеличением Na^+ . Поэтому, один из механизмов, лежащий в основе аритмогенных постдеполяризаций связан именно с локальной активацией I_{NCX} .

4.3.5. Роль цитоплазматического кальция в гиперполяризации, вызываемой β -адренергической стимуляцией в легочных венах

Одним из классических эффектов β -адренергической стимуляции и активации РКА в кардиомиоцитах является увеличение уровня $[Ca^{2+}]_i$ и амплитуды «кальциевых волн». В наших экспериментах мы попытались выяснить как увеличение уровня $[Ca^{2+}]_i$ влияет на уровень мембранного потенциала в миокарде легочных вен. Известно, что кофеин в высокой концентрации применяется как агент, стимулирующий выброс кальция из СПР. В наших экспериментах кофеин приводил к гиперполяризации в миокарде легочных вен, которая по величине была сходна с эффектом β -агониста изопротеренола. Как известно, кофеин оказывает влияние не только на RyR, но и на другие мишени (является блокатором пуриновых рецепторов, ингибитором внеклеточной ацетилхолинэстеразы, ингибитором фосфодиэстераз). То есть, возникающий при использовании кофеина сдвиг мембранного потенциала может развиваться не только за счет стимуляции выброса кальция, но и за счет других механизмов, опять же, например, за счет активации РКА. Поэтому, на следующем этапе работы мы использовали рианодин, который, в соответствующей концентрации, оказывает стимулирующее действие только на рианодиновые рецепторы саркоплазматического ретикулума. При действии рианодина эффект был меньше, чем при действии кофеина, однако гиперполяризация в покое миокарде легочных вен крысы сохранялась. Таким образом, можно предположить, что увеличение диастолического уровня $[Ca^{2+}]_i$ действительно приводит к гиперполяризации в миокарде легочных вен взрослых крыс.

Оставалось неизвестным, приводят ли адренергические воздействия к изменению уровня $[Ca^{2+}]_i$ в миокарде легочных вен, как это происходит, согласно классическим представлениям, в рабочем миокарде. Для решения данного вопроса был использован метод кальциевого имиджинга. Опыты по оценке уровня $[Ca^{2+}]_i$ проводили с использованием препаратов предсердий и легочных вен мышей. Ранее, в наших экспериментах было показано, что миокард легочных вен мыши обладает очень сходными биоэлектрическими свойствами с миокардом ЛВ крысы – у мышей также наблюдается спонтанный сдвиг ПП в покоящихся препаратах ЛВ (Potekhina et al., 2019). Поскольку все задачи, поставленные в данной работе, решали с использованием миокардиальных препаратов ЛВ крыс, то эксперименты с легочными венами мышей вынесены в раздел «Обсуждение».

В наших экспериментах, как и следовало ожидать в соответствии с литературными данными, изопротеренол приводил к увеличению амплитуды кальциевых волн в ритмически возбуждаемых препаратах предсердий (n=4) и легочных вен (n=2,) мыши (Рис. 4.1.), а также к увеличению диастолического уровня $[Ca^{2+}]_i$ в покоящихся препаратах ЛВ (n=2) и предсердий

($n=2$, Рис. 4.2.). Таким образом, уровень $[Ca^{2+}]_i$ в миокарде легочных вен действительно повышается при β -адренергической стимуляции.

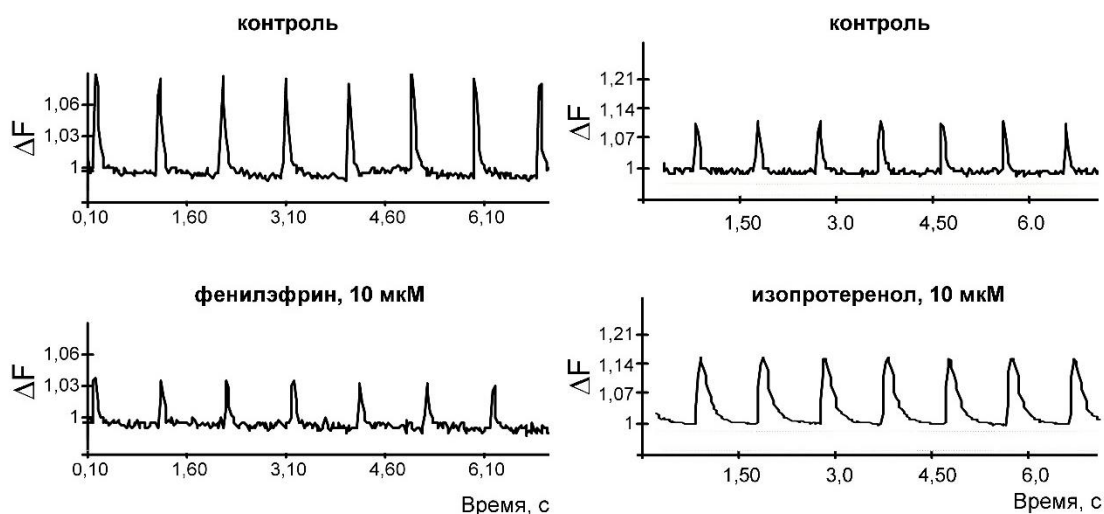


Рис. 4.1. Примеры флуоресцентных сигналов, пропорциональных уровню $[Ca^{2+}]_i$ в многоклеточных, ритмически стимулируемых, препаратах легочных вен мышей в контроле (сверху), а также при действии фенилэфрина (10 мкМ) или изопротеренола (10 мкМ, снизу). По оси ординат – уровень флуоресценции (ΔF) в относительных единицах. Видно, что фенилэфрин подавляет, а изопротеренол увеличивает амплитуду «кальциевых волн».

В то же время, фенилэфрин подавлял амплитуду кальциевых волн в ритмически возбуждаемых препаратах предсердий ($n=6$) и ЛВ ($n=2$) мыши (Рис.4.1.), но не вызывал увеличения базального (диастолического) уровня кальция в покоещихся препаратах предсердий ($n=2$) и легочных вен ($n=2$, Рис.4.2.). Если предположить, что регуляция ПП в миокарде легочных вен крыс и мышей действительно сходна, то приведенные выше результаты указывают на то, что деполяризация, наблюдаемая при α -адренергической стимуляции в покоещихся препаратах легочных вен, не связана с увеличением уровня цитоплазматического кальция.

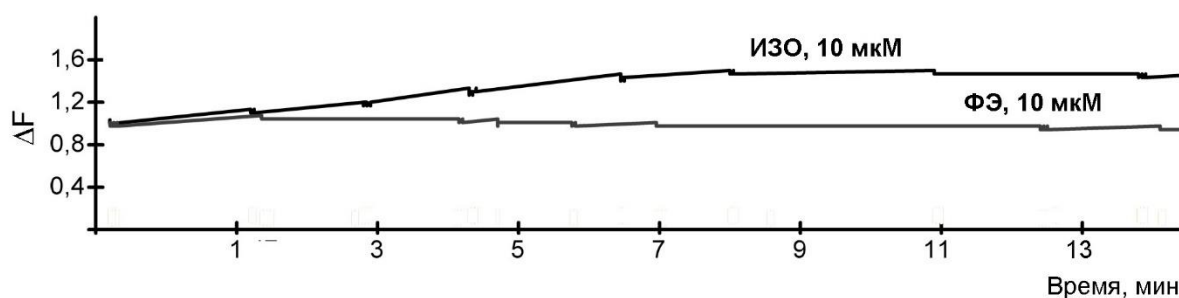


Рис. 4.2. Примеры записи флуоресцентных сигналов, пропорциональных уровню диастолического $[Ca^{2+}]_i$ в многоклеточных покоящихся препаратах легочных вен мышей при действии изопротеренола (ИЗО, 10 мкМ) или фенилэфрина (ФЭ, 10 мкМ). По оси ординат – уровень флуоресценции (ΔF) в относительных единицах. Уровень флуоресценции в контроле равен единице. Видно, что изопротеренол увеличивает диастолический уровень $[Ca^{2+}]_i$, в то время как фенилэфрин не оказывает влияния на $[Ca^{2+}]_i$.

С другой стороны, β -адренорецептор-зависимая/РКА-зависимая гиперполяризация в миокарде легочных вен может быть действительно обусловлена увеличением $[Ca^{2+}]_i$. Механизмы, посредством которых $[Ca^{2+}]_i$ приводит к гиперполяризации не выяснены. Однако, таким механизмом может быть активация кальций-зависимых калиевых токов.

4.3.6. Роль тока Са-зависимых К-каналов (I_{KCa}) в гиперполяризации, вызываемой β -адренергической стимуляцией в легочных венах

Гиперполяризация ПП, вызванная увеличением диастолического уровня $[Ca^{2+}]_i$, может происходить в результате усиления I_{KCa} . В таком случае, подавление токов I_{KCa} теоретически должно приводить к увеличению длительности ПД или сдвигу ПП в сторону положительных значений мембранного потенциала. В наших экспериментах мы использовали блокаторы токов I_{KCa} в контрольных условиях, а также на фоне кофеина, вызывавшего гиперполяризацию ПП в миокарде ЛВ крысы. Ни один из блокаторов I_{KCa} (селективных или неселективных) не оказывал влияния на ПП легочных вен крысы, а также не подавлял гиперполяризацию, индуцированную кофеином. Таким образом, нам не удалось выявить вклада калиевых-кальцийзависимых токов I_{KCa} , формируемых каналами IK и SK, в регуляцию ПП в легочных венах. Возможно, что кальций-зависимые калиевые токи либо не играют роли, либо вносят слишком малый вклад в потенциал покоя в миокарде ЛВ крысы.

В итоге можно заключить, что мы впервые показали феномен кальций-индуцируемой гиперполяризации в миокарде легочных вен крысы, однако для выяснения его механизмов требуются дальнейшие исследования.

4.3.7. Иные возможные механизмы регуляции биоэлектрической активности в легочных венах

Показано, что $\beta\gamma$ -субъединица G-белка, связанного с β -адренорецепторами, способна связываться и активировать каналы Kir3.1/3.2/3.4, переносящие калиевый гиперполяризующий ацетилхолин-зависимый ток – I_{KACH} (Sorota et al., 1999). Активация этого тока, при действии изопротеренола, может быть еще одним механизмом β -адренорецептор-зависимой

гиперполяризации в миокарде легочных вен крысы. Однако, функциональная значимость данного механизма требует дальнейшего экспериментального подтверждения.

Согласно одной из гипотез, определенную роль в формировании медленной диастолической деполяризации и ритма в сино-атриальном узле сердца играет ток активируемы-гиперполяризацией - I_f . Утверждается, что I_f -ток является одним из основных токов, активация которых определяет спонтанную активность САУ. Ток I_f активируется при адреностимуляции, что приводит к ускорению МДД и увеличению частоты спонтанных ПД [DiFrancesco, 2010]. Возникновение спонтанной активности в ЛВ при действии норадреналина можно было бы связать с активацией тока I_f . Однако, было показано, что автоматическая активность кардиомиоцитов ЛВ, по крайней мере, у некоторых млекопитающих, не связана с I_f -током: ионные каналы, переносящие ток I_f , в клетках рукавов ЛВ отсутствуют (Yamamoto et al., 2006).

4.4. Пуриновые комедиаторы не способствуют адренергической спонтанной активности в миокарде легочных вен крыс

В нашей работе мы впервые предприняли попытку выявить роль НАД⁺, АТФ и ДАТФ как комедиаторов симпатической нейротрансмиссии в миокардиальных рукавах легочных вен.

Как показано в данной работе, созревание симпатической иннервации легочных вен по времени совпадает с приобретением миокардом ЛВ аритмогенных свойств, и возможно, оказывает на этот процесс непосредственное влияние. Возможно, что факторами модулирующими эффекты норадреналина, являются пуриновые соединения. Известно, что НАД⁺, АТФ и ДАТФ могут выделяться из симпатических терминалей вместе с НА, то есть данные соединения являются комедиаторами симпатической нейротрансмиссии (Smyth et al., 2004; Smyth, 2006; Vassort, 2001). Влияние пуриновых комедиаторов на электрическую активность в легочных венах становится возможным с момента «созревания» симпатической иннервации и начала высвобождения пресинаптических везикул. В нашей работе мы исследовали действие НАД⁺, АТФ и ДАТФ не только на способность миокарда ЛВ формировать спонтанную, аритмогенную активность при адренергической активации (то есть мы моделировали ситуацию, когда пуриновые комедиаторы выделяются вместе с НА из нервных терминалей), но и на параметры ПД и ПП в ходе постнатального онтогенеза.

4.4.1. Действие НАД⁺, АТФ и диаденозинтетрафосфата на основные электрофизиологические характеристики миокарда легочных вен крыс в ходе онтогенеза

Электрически вызванные потенциалы действия

В наших экспериментах была обнаружена способность НАД⁺, АТФ и ДАТФ существенно уменьшать длительность ПД в легочных венах на разных этапах постнатального онтогенеза. Эффекты пуриновых соединений несколько отличались. Так, эффекты НАД⁺ на ДПД с возрастом уменьшались: самый большой эффект наблюдали у новорожденных крыс, тогда как у взрослых особей длительность ПД при действии данного вещества снижалась в меньшей степени. Эффект АТФ, однако, был наиболее выражен у взрослых животных, а меньше всего у 14-дневных животных. Эффект ДАТФ на длительность ПД не изменялся в ходе постнатального онтогенеза и был одинаков у всех изучаемых возрастных групп.

Потенциал покоя

Пуриновые соединения вызывали гиперполяризацию потенциала покоя в миокарде легочных вен крыс. Влияние НАД⁺, АТФ и ДАТФ на потенциал покоя в миокарде ЛВ крыс увеличивалось с возрастом. Так, у новорожденных крыс мы не наблюдали никакого эффекта данных веществ на ПП (также данные соединения не прекращали спонтанную автоматическую активность 1-х суток жизни, наблюдаемую в контрольных условиях). Наибольшее влияние на ПП пуриновые соединения оказывали у 21-дневных крыс, как и у взрослых животных. Механизм действия пуриновых комедиаторов на ПД и ПП скорее всего связан с активацией P2Y рецепторов (Burnstock, 2007; Burnstock., 2009; Vassort, 2001).

4.4.2. Влияние НАД⁺, АТФ и диаденозинтетрафосфата на электрофизиологические эффекты норадреналина в миокарде легочных вен крыс в ходе постнатального развития

В легочных венах взрослых крыс НАД⁺ и АТФ вызывали снижение частоты следования ПД и снижение длительности спонтанных ПД при регулярном типе спонтанной активности, вызванной норадреналином. Кроме того, НАД⁺ и АТФ вызывали увеличение интервалов времени между залпами потенциалов действия («пачками»). В дополнение, АТФ вызывал снижение длительности периодов спонтанной активности, количества ПД в «пачках», вызванных норадреналином. Сходные эффекты НАД⁺ и АТФ вызывали в легочных венах крыс возрастом 14 и 21 сут.

В отличие от НАД⁺ и АТФ, которые у взрослых животных никогда не вызвали полного подавления спонтанной активности, вызванной НА, а лишь модулировали ее, ДАТФ у взрослых крыс полностью ингибировал норадреналиновую спонтанную активность. Такой же эффект ДАТФ вызывал в легочных венах, полученных от крыс возрастом 21 сут.

Возникновение эктопических аритмогенных очагов в ЛВ тесно связывают с усилением активности вегетативных, и, в частности, симпатических нервов (Schotten et al., 2011). Снижение рефрактерного периода на фоне спонтанной нерегулярной эктопической активности, вызванной симпатической активацией или норадреналином, в отличие от стабильного ритма,

может обладать проаритмическим действием. Поэтому, внеклеточные НАД⁺, АТФ, а также ДАТФ, высвобождающиеся совместно с норадреналином, теоретически, могут способствовать усилению аритмогенности легочных вен. Тем не менее, в наших экспериментах данные соединения хоть и приводили к снижению длительности потенциалов действия, но не вызывали увеличения частоты ПД при спонтанной активности, вызванной норадреналином. Более того, увеличивая интервалы периодов покоя между пачками спонтанных ПД, снижая длительность «пачек», НАД⁺ и АТФ уменьшали общее время, в течение которого потенциальный эктопический очаг в легочных венах является активным: ДАТФ полностью подавлял автоматию, вызываемую норадреналином, в миокарде ЛВ крыс.

Сопоставляя целый ряд параметров электрической активности, можно сказать, что НАД⁺ и АТФ, а в большей степени ДАТФ ослабляют адренергическую аритмогенную активность в миокарде легочных вен крысы. Можно сделать вывод, что НАД⁺ и АТФ, а также ДАТФ ограничивают эффекты симпатической стимуляции в миокарде легочных вен крысы.

Из литературных данных известно, что физиологическая роль такого пуринового соединения, как аденозин связана с ограничением адренергических влияний в зрелом сердце млекопитающих (Ralevic, 1995; Smyth et al., 2004c). Однако не понятно, какова роль пуриновых комедиаторов на ранних этапах постнатального онтогенеза, когда симпатическая иннервация сердца еще не сформирована в полной мере. С одной стороны, на основе результатов наших экспериментов с определением влияния НАД⁺, АТФ и ДАТФ на длительность ПД в ЛВ в ходе постнатального онтогенеза можно предположить, что функциональные пуриновые рецепторы присутствуют уже начиная с самых ранних стадий постнатальной жизни. С другой стороны, мы выяснили, что в ЛВ данные пуриновые соединения ограничивают эктопическую активность при адренергической активации у взрослых животных. Кроме того, как показано в данной работе (раздел 3.6.2), аденорецепторы уже присутствуют в миокарде ЛВ новорожденных крыс, и несмотря на то, что симпатические волокна еще не сформировались в полной мере, работа сердца подвержена влиянию катехоламинов, выделяющихся надпочечниками и поступающих в кровотока, а также синтезирующихся в самом миокарде специализированными ИСА клетками. Таким образом, возможно, что НАД⁺, АТФ и ДАТФ на ранних стадиях постнатального онтогенеза модулируют действие катехоламинов, но не являются необходимым фактором, который способствует преобразованию миокарда ЛВ и приобретению им аритмогенных свойств в ходе постнатального онтогенеза, как мы предполагали ранее. Остается непонятным, что может служить источником внеклеточных пуриновых соединений *in vivo* у новорожденных животных, когда высвобождение везикул из симпатических терминалей еще не происходит. Возможно, НАД⁺, АТФ и ДАТФ высвобождаются локально ненейрональными тканями

4.5. Связь формирования симпатической иннервации и паттерна рецепторов адреналина в ходе онтогенеза с формированием проаритмического фенотипа в легочных венах

Из литературных данных известно, что на ранних этапах постнатального онтогенеза симпатическая иннервация сердца полностью не сформирована - полноценная функциональная симпатическая регуляция сердца у крыс появляется лишь на 2-3 неделе жизни (Hildreth et al., 2009; Lau et al, 1982).

В результате наших экспериментов по визуализации катехоламин-положительных нервных волокон с помощью глиоксильной кислоты мы выяснили, что в ткани ЛВ симпатическая иннервация также развивается не сразу. Так, у новорожденных крыс не было обнаружено катехоламин-содержащих волокон ни в одном из препаратов ЛВ, у 7-дневных крыс симпатические волокна начинают появляться: в препаратах видны 2-3 крупных волокна; у 14-дневных крыс сеть симпатических волокон развита достаточно, но ее плотность значимо ниже, чем у взрослых животных; у 21-дневных крыс плотность волокон уже такая же, как и у взрослых животных. Таким образом, мы выяснили, что, судя по морфологическим признакам, в легочных венах симпатическая иннервация полностью формируется на 2-3 неделе постнатального развития, как и в рабочем миокарде.

В литературных данных показано, что несмотря на отсутствие симпатических нервных терминалей, в сердце плода и новорожденных животных присутствуют функциональные адренорецепторы (Deng et al., 1998; Hildreth et al., 2009), а циркулирующие в крови катехоламины, вырабатываемые надпочечниками, компенсируют отсутствие симпатических влияний, оказывая модулирующее влияние на работу сердца. Кроме того, было показано, что катехоламины могут выделяться и в самом сердце специализированными (ICA) клетками (Natarajan et al., 2004). ICA клетки были обнаружены в сердце новорожденных и взрослых крыс (Huang et al., 1996). Возможно, что высокий уровень делокализованной флюоресценции в легочных венах новорожденных крыс свидетельствует о значительном количестве нейрональных катехоламинов в ткани.

Поскольку период появления проаритмогенного эффекта норадреналина совпадает с интервалом формирования симпатической иннервации ЛВ, нами было сделано предположение (после исключения проаритмической роли пуриновых медиаторов), что изменение экспрессии типа адренорецепторов или их соотношения под действием симпатической иннервации может являться важным фактором, регулирующим свойства ткани. Влияние симпатической иннервации на экспрессируемые адренорецепторы показано во многих тканях (Habecker, Malec, and Landis, 1996). Можно было бы предположить, у новорожденных животных в легочных венах могли бы иметься только α_1 -адренорецепторы в небольшом

количестве, а рецепторы β -типа могли бы экспрессироваться только на 2-й, 3-й неделе жизни. Однако, в нашей работе с помощью иммунофлюоресцентных методов мы показали, что в кардиомиоцитах как α_1 -, так и β -адренорецепторы обнаруживаются уже на 1 сут постнатальной жизни. Более того, общее количество рецепторов обоих типов и их соотношение меняется в ходе онтогенеза незначительно. Существенно изменяющейся характеристикой в ходе онтогенеза было лишь увеличение количества крупных кластеров α_1 -адренорецепторов, которое может быть сопряжено с накоплением их в ядерной мембране. Однако, перераспределение α_1 -адренорецепторов в ходе развития происходит и в рабочем миокарде (O'Connell et al., 2014b). Таким образом, наши результаты не позволяют сказать, что формирование симпатической иннервации приводит к изменению паттерна адренорецепторов, и таким образом стимулирует проаритмические свойства в легочных венах.

Однако, хорошо известно, что симпатические нервы оказывают трофическое действие на иннервируемую ткань (Fronek, 1983; Puzdrova et al., 2014). В сердце трофическое влияние симпатической иннервации способствует как структурным, так и функциональным перестройкам кардиомиоцитов (Zaglia et al., 2013; Zaglia and Mongillo, 2017). Трофическое действие симпатических нервов может заключаться, например, в стимуляции колокализации адренорецепторов и аденилатциклазы, NCX, NKA в мембране Т-тубул, способствовать сопряжению адренорецепторов с молекулами саркоплазматического ретикулума (IP3R, RyR, SERCA), ответственными за внутриклеточную кальциевую динамику. В таком случае, предотвращение формирования симпатической иннервации должно оказывать влияние на характер биоэлектрической активности легочных вен или их реакции на адренергические воздействия независимо от количества адренорецепторов в плазматической мембране.

В данной работе в экспериментах с крысами после хронической неонатальной десимпатизацией было проверено предположение о влиянии симпатической иннервации на становление аритмогенных свойств миокарда ЛВ. Эксперименты проводили на препаратах легочных вен, полученных от десимпатизированных крыс возрастом 7, 14, 21 и 60 дней. Мы выяснили, что в ходе развития длительность ПД и значения ПП в легочных венах изменяются у десимпатизированных крыс так же, как и у обычных, контрольных животных. Однако, нами были обнаружены значительные различия в способности к формированию спонтанной активности при адренергической активации между указанными двумя группами. У десимпатизированных крыс старше 21-дневного возраста НА вызывал спонтанную активность лишь в 50% случаев, кроме того, такая спонтанная активность имела низкую частоту.

Таким образом, формирование симпатической иннервации действительно приводит к проаритмическому преобразованию электрофизиологического фенотипа, но не за счет сильного влияния на экспрессию адренорецепторов. «Трансформирующее» действие симпатической

иннервации может заключаться в сопряжении адренорецепторов с их мишенями внутри клетки или в колокализации комплексов адренорецепторов и ионных транспортеров в плазматической мембране.

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 котрансммитерами. 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-инозитольного 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 СОКРАЩЕНИЙ

АВ-узел – атриовентрикулярный узел

АТФ – аденозинтрифосфат

АЦ – аденилатциклаза

АЦП – аналого-цифровой преобразователь

ВНС - вегетативная нервная система

ДАТФ - диаденозинтетрафосфат

ДПД₉₀ – длительность ПД на уровне 90% реполяризации

ИЗО, ISO - изопротеренол

ЛВ - миокардиальная обкладка легочных вен

ЛП – левое предсердие

мРНК – матричная РНК

МДД – медленная диастолическая деполяризация

НА – норадреналин

НАД⁺ - никотинамидадениндинуклеотид

ПД – потенциал действия

ПП – потенциал покоя

САУ – синоатриальный узел

СПР - саркоплазматический ретикулум

ФП - фибрилляция предсердий

ФЭ – фенилэфрин

цАМФ - циклический аденозинмонофосфат

СаМ - кальмодулин

DAD – delayed afterdepolarisation, задержанные постдеполяризации

DAG – диацилглицерол

EAD – early afterdepolarisation, ранние постдеполяризации

EMT/OCT3 - (extraneuronal monoamine transporter/organic cation transporter-3)
вненейрональный транспортер моламинов/транспортер органических катионов-3

GPCRs – G-белок связанные рецепторы

IP₃ - инозитолтрифосфат

IP₃R - инозитольные рецепторы

MAPKs - митоген-активируемые протеинкиназы

NCX - Na/Ca-обменник

NKA - Na/K-АТФаза

PIP₂ - фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат

PI₃K - фосфоинозитид-3-киназа

PKA – протеинкиназа А

PKC - протеинкиназа С

PLC-β - фосфолипаза С

PLM - фосфолеппман

PS – фосфатидилсерин

RACKs - Receptors for activated C kinase

RyR – рианодинные рецепторы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бернгардт Э.Р. Роль Автономной Нервной Системы в Развитии Фибрилляции Предсердий // Бюллетень Федерального Центра Сердца, Крови и Эндокринологии Им. В.А.Алмлозова. – 2011. – Т. 1. - № 6. - С. 68–71.
2. Егоров Ю.В., Столбова В.И., Кузьмин В.С., Розенштраух Л.В. Влияние Антиаритмического Препарата III Класа Ниферидила (РГ-2) на биоэлектрическую активность миокарда легочных вен // Кардиология. - 2012. - № 2. - С. 47–51.
3. Елисеев В. Роль Аденозина в Регуляции Сердечно-Сосудистой Системы // Хим.-Фарм Журнал. – 1987. - № 8. - С. 910–19.
4. Каримова 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.
5. Пустовит К.Б., Кузьмин В.С., Сухова Г.С.. Влияние внеклеточного никотинамидадениндинуклеотида (NAD⁺) на биоэлектрическую активность пейсмекера и проводящей системы сердца// БЭБиМ. – 2015. - Т. 159. - № 2. - С. 144–47.
6. Пустовит К.Б., Иванова А.Д., Кузьмин В.С. Внеклеточный НАД⁺ подавляет адренергические эффекты в предсердном миокарде крыс на раннем этапе постнатального онтогенеза // БЭБиМ. - 2018. - Т. 165. - № 1. - С. 4–8.
7. Филатов А., Тарашвили Э. Эпидемиология и социальная значимость фибрилляции предсердий// Анналы Аритмологии. - 2012. - Т. 2. - С. 5–13.
8. Abbracchio MP., Burnstock G., Boeynaems J., Barnard E., Boyer J., Kennedy C., Knight G., Fumagalli M., Gachet C., Jacobson K.. International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy // Pharmacol. Rev. - 2006. - V. 58. - № 3. - P. 281–341.
9. Ahles A., Engelhardt S. Polymorphic variants of adrenoceptors: pharmacology, physiology, and role in disease // Pharmacol. Rev. - 2014.- V. 66. - № 3. - P. 598–637.
10. Allesie M., Rensma P., Brugada J. Pathophysiology of Atrial Fibrillation. Cardiac Electrophysiology: from Cell to Bedside // 7th Edition. - Philadelphia WB Saunders. - 1990. - P. 548–49.
11. Anumonwo J.M., Lopatin A.N. Cardiac strong inward rectifier potassium channels // J. Mol. Cell. Cardiol. - 2010.- V. 48. - № 1. - P. 45–54.

12. Arentz T., Haegeli L., Sanders P., Weber R., Neumann F.J., Kalusche D., Haïssaguerre M. 2007. High-density mapping of spontaneous pulmonary vein activity initiating atrial fibrillation in humans // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* - V.18. - № 1. - P.31–38.
13. Arora R., Verheule S., Scott L., Navarrete A., Katari V., Wilson E., Vaz D., Olgin J. Arrhythmogenic substrate of the pulmonary veins assessed by high-resolution optical mapping // *Circulation.* - 2003. - V. 107. - № 13. - P.1816–21.
14. Axelsson S., Björklund A., Lindvall O. Fluorescence histochemistry of biogenic monoamines. a study of the capacity of various carbonyl compounds to form fluorophores with biogenic monoamines in gas phase reactions // *J. Histochem. Cytochem.* - 1972. - V. 20. - № 6. - P. 435–44.
15. Badino P., Odore R., Re G. Are so many adrenergic receptor subtypes really present in domestic animal tissues? A pharmacological perspective // *Vet. J.* - 2005. - V. 170. - № 2. - P. 163–74.
16. Balboa M.A., Insel P.A. Stimulation of Phospholipase D via A1-Adrenergic Receptors in Madin- Darby Canine Kidney Cells Is Independent of PKC(α) and - ϵ Activation // *Mol. Pharmacol.* - 1998.- V. 53. - № 2. - P. 221–27.
17. Bareis D.L., Morgan R.E, Lau C., Slotkin T. Maturation of sympathetic neurotransmission in the rat heart. IV. Effects of guanethidine-induced sympathectomy on neonatal development of synaptic vesicles, synaptic terminal function and heart growth // *Dev. Neurosci.* - 1981. - V. 4. - № 1. - P. 15–24.
18. Bareis D.L., Slotkin T.A. Responses of heart ornithine decarboxylase and adrenal catecholamines to methadone and sympathetic stimulants in developing and adults rats // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 1978.- V. 205. - № 1. - P. 164–74.
19. Bareis D.L., Slotkin T.A. Maturation of Sympathetic Neurotransmission in the Rat Heart. I. Ontogeny of the synaptic vesicle uptake mechanism and correlation with development of synaptic function. Effects of neonatal methadone administration on development of synaptic vesicles // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 1980.- V. 212. - № 1. - P. 120–25.
20. Barnard E.A., Burnstock G., Webb T. G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family // *Trends Pharmacol. Sci.* - 1994.- V. 15. - № 3. - P. 67–70.
21. Bartolome J., Mills E., Lau C., Slotkin T. Maturation of sympathetic neurotransmission in the rat heart. V. Development of baroreceptor control of sympathetic tone // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 1980.- V. 215. - № 3. - P. 596–600.
22. Batulevicius D., Pauziene N., Pauza D. Key anatomic data for the use of rat heart in

electrophysiological studies of the intracardiac nervous system// *Med.* - 2004.- V. 40. - № 3. - P. 253–259.

23. Batulevicius D., Pauziene N., Pauza D. Architecture and age-related analysis of the neuronal number of the guinea pig intrinsic cardiac nerve plexus // *Ann. Anat.* - 2005.- V. 187. - № 3. - P. 225–43.

24. Belhassen B., Pelleg A. Electrophysiologic effects of Adenosine Triphosphate and Adenosine on the mammalian heart: clinical and experimental aspects // *J. Am. Coll. Cardiol.* - 1984.- V. 4. - № 2. - P. 414–24.

25. Berkowitz D.E., Price D.T., Bello E.A., Page S.O., Schwinn D.A. Localization of messenger RNA for three distinct α_2 -adrenergic receptor subtypes in human tissues: evidence for species heterogeneity and implications for human pharmacology // *Anesthesiology.* - 1994.- V. 81. - № 5. - P. 1235–44.

26. Bildl W., Strassmaier T., Thurm H., Andersen J., Eble S., Oliver D., Knipper M., Mann M., Schulte U., Adelman J., Fakler B. Protein Kinase CK2 is coassembled with small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and regulates channel gating // *Neuron.* - 2004.- V. 43. - № 6. - P. 847–58.

27. Blaustein M.P., Lederer W.J. Sodium/Calcium Exchange: its physiological implications // *Physiol. Rev.* - 1999. - V. 79. - № 3. - P. 763–854.

28. Boarder M. R., Turner J.T., Erb L., Weisman G.A. Classification of P2 Purinoceptors. Not all G protein-coupled P2 Purinoceptors can be classed as P2Y // *Trends Pharmacol. Sci.* - 1994.- V. 15. - № 8. - P. 280–81.

29. Boehm S., Kubista H. Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors.// *Pharmacol. Rev.* - 2002.- V. 54. - № 1. - P. 43–99.

30. Bossuyt J., Despa S., Han F., Hou Z., Robia S., Lingrel J., Bers D. Isoform specificity of the Na/K-ATPase association and regulation by phospholemman // *J. Biol. Chem.* - 2009. - V. 284. - № 39. - P. 26749–57.

31. Boutilier J.K., Taylor R.L., Mann T., McNamara E., Hoffman G.J., Kenny J., Dilley R.J., Henry P., Morahan G., Laing N.G., Nowak K.J. Gene expression networks in the murine pulmonary myocardium provide insight into the pathobiology of atrial fibrillation // *G3 Genes, Genomes, Genet.* - 2017.- V. 7. - № 9. - P. 2999–3017.

32. Braun A.P., Fedida D., Giles W.R. Activation of A1-adrenoceptors modulates the inwardly rectifying potassium currents of mammalian atrial myocytes // *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* - 1992.- V. 421. - № 5. - P. 431–39.

33. Brette F., Blandin E., Simard C., Guinamard R., Salle L. Epac activator critically regulates action potential duration by decreasing potassium current in rat adult ventricle // *J. Mol. Cell. Cardiol.* - 2013. - V. 57. - № 1. - P. 96–105.
34. Briones Â., Huidobro-Toro J.P., Buvinic S. P2Y 1 and P2Y 2 Receptors are coupled to the NO / CGMP pathway to vasodilate the rat arterial mesenteric bed // *Br J Pharmacol.* - 2002. - V.136. - № 6. - P. 847–56.
35. Brodde O.E., Michel M.C. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart // *Pharmacol. Rev.* - 1999.- V. 51. - № 4. - P. 651–90.
36. Burnstock G. Overview. Purinergic mechanisms // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 1990.- V. 603. -P.1–17; discussion 18.
37. Burnstock G. Purinergic signalling--an overview// *Novartis Found. Symp.* - 2006. - V. 276. - P. 26–48.
38. Burnstock G., Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoreceptor? // *Gen. Pharmacol.* - 1985.- V. 16. - № 5. - P. 433–40.
39. Burnstock G., King B. Numbering of cloned P2 purine receptors // *Drug Rev. Res.* - 1996.- V. 38. -P. 67–71.
40. Burnstock G., Street G. Noradrenaline and ATP as cotransmitters in sympathetic nerves // *Neurochem Int.* - 1990.- V. 17. - № 2. - P. 357-368.
41. Burnstock G. Do Some nerve cells release more than one transmitter? // *Neuroscience.* - 1976.- V. 1. - № 1968. - P. 239–48.
42. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission // *Physiol. Rev.* - 2007.- V.87. - № 2. - P.659–797.
43. Burnstock G. Purinergic signaling in the cardiovascular system // *Circ. Res.* - 2017.- V. 120. - № 1. - P. 207–28.
44. Burnstock G., Ralevic V. Purinergic signaling and blood vessels in health and disease // *Pharmacol. Rev.* - 2014. - V.66. - № 1. - P.102–92.
45. Bylund D.B., Eikenberg D.C., Hieble J.P., Langer S.Z., Lefkowitz R.J., Minneman K.P., Molinoff P.B., Ruffolo R., Trendelenburg U. International union of pharmacology of adrenoceptors // *Pharmacol. Rev.* - 1994- V. 46. - № 2. - P. 121–36.
46. Calvo C. J., Makarand Deo M., Berenfeld O. A spatial gradient in IK1 density across the pulmonary vein-left atrial junction attracts atrial fibrillation (AF) Drivers to the pulmonary veins // *Hear. Rhythm.* - 2010.- V. 7. - № 11. - P. 1716–17.

47. Chalothorn D., McCune D., Edelmann S., Tobita K., Keller B., Lasley R., Perez D., Tanoue A., Tsujimoto G., Post G., Piascik M. Differential cardiovascular regulatory activities of the A1B- and A1D-frenoceptor subtypes // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 2003.- V. 305. - № 3. - P. 1045–53.
48. Chard M., Tabrizchi R. The Role of pulmonary veins in atrial fibrillation: a complex yet simple story // *Pharmacol. Ther.* 2009.- V. 124. - № 2. - P. 207–18.
49. Charpentier F. Understanding the cardiac role of K2P channels: a new TASK for electrophysiologists // *Cardiovasc. Res.* - 2007.- V. 75. - № 1. - P. 5–6.
50. Chen P.S., Chen L.S., Fishbein M.C., Lin S.F., Nattel S. Role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation: pathophysiology and therapy // *Circ. Res.* - 2014.- V. 114. - № 9. - P. 1500–1515.
51. Chen Y., Chen S. Electrophysiology of Pulmonary Veins // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* - 2006.- V. 17. - № 2. - P. 220–24.
52. Chen Y., Chen S., Chang M., Lin C. Arrhythmogenic Activity of Cardiac Muscle in Pulmonary Veins of the Dog: Implication for the Genesis of Atrial Fibrillation// *Cardiovasc. Res.* - 2000.- V. 48. - № 2. - P. 265–73.
53. Chen Y.J., Chen S.A., Chen Y.C., Yeh H.I., Chang M.S., Lin C. Electrophysiology of single cardiomyocytes isolated from rabbit pulmonary veins: implication in initiation of focal atrial fibrillation // *Basic Res. Cardiol.* - 2002.- V. 97. - № 1. - P. 26–34.
54. Chen Y.J., Chen S.A. Thoracic vein arrhythmias // *Circ. J.* - 2007. - V. 71. SUPPL. A.: A20-25.
55. Cherry E.M. , Elizabeth M., Ehrlich J.R., Nattel S., Fenton F. Pulmonary vein reentry-properties and size matter: insights from a computational analysis // *Hear. Rhythm.* - 2007. - V. 4. - № 12. - P. 1553–62.
56. Clair J.R., Liao Z., Larson E.D., Proenza C. PKA-independent activation of If by CAMP in mouse sinoatrial myocytes // *Channels.* - 2013. - V. 7. - № 4. - P. 318–21.
57. Cohen I.S., Datyner N.B., Gintant G.A., Mulrine N.K., Pennefather P. Properties of an electrogenic sodium-potassium pump in isolated canine purkinje myocytes // *J. Physiol.* - 1987.- V.383. -P.251–67.
58. Cohen N.A., Noam A., Sha Q., Makhina E., Lopatin A.N., Linder M., Snyder S.H., Nichols C.G. Inhibition of an inward rectifier potassium channel (Kir2.3) by G- Protein By subunits // *J. Biol. Chem.* - 1996.- V. 271. - № 50. - P .32301–5.
59. Colucci W.S., Wright R.F., Braunwald E. New positive inotropic agents in the treatment

of congestive heart failure. mechanisms of action and recent clinical developments. 2 // N. Engl. J. Med. - 1986.- V. 314. - № 6. - P. 349–58.

60. Cui J., Melman Y., Palma E., Fishman G., McDonald T. Cyclic AMP Regulates the HERG K⁺ Channel by dual pathways // Curr. Biol. - 2000. - V. 10. - № 11. - P. 671–74.

61. Daaka Y., Luttrell L.M., Lefkowitz R.J. Switching of the coupling of the B₂-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A // Nature. - 1997.- V. 390. - № 6655. - P. 88–91.

62. Dahl E.F., Erika F., Wu S.C, Healy C.L., Harsch B.A., Shearer G.C., O'Connell T.D. Subcellular compartmentalization of proximal Gq-receptor signaling produces unique hypertrophic phenotypes in adult cardiac myocytes // J. Biol. Chem. - 2018. - V. 293. - № 23. - P. 8734–49.

63. Dalziel H.H., Westfall D.P. Receptors for Adenine Nucleotides and Nucleosides: Subclassification, Distribution, and Molecular Characterization // Pharmacol. Rev. - 1994.- V. 46. - № 4. - P. 449–66.

64. Deng X.F., Sculptoreanu A., Mulay S., Peri K., Li J.F., Zheng W.H., Chemtob S., Varma D.R. Crosstalk between Alpha-1A and Alpha-1B adrenoceptors in neonatal rat myocardium: implications in cardiac hypertrophy // J. Pharmacol. Exp. Ther. - 1998. - V. 286. - № 1. - P. 489–96.

65. DeRuiter M., Poelmann R., Mentink M., Vaniperen L., De Groot A.G. Early formation of the vascular system in quail embryos.// Anat. Rec. - 1993.- V. 235. - № 2. - P. 261–74.

66. Dhamoon A.S., Pandit S.V., Sarmast F., Parisian K.R., Guha P., Li Y., Bagwe S., Taffet S.M., Anumonwo J. Unique Kir2.x properties determine regional and species differences in the cardiac inward rectifier K⁺ current // Circ. Res. - 2004.- V. 94. - № 10. - P. 1332–39.

67. DiFrancesco D. The Role of the funny current in pacemaker activity // Circ. Res. - 2010.- V. 106. - № 3. - P. 434–46.

68. DiPolo R., Berberían G., Delgado D., Rojas H., Beaugé L. A Novel 13 KDa cytoplasmic soluble protein is required for the nucleotide (MgATP) Modulation of the Na/Ca exchange in squid nerve fibers // FEBS Lett. - 1997. - V. 401. - № 1. - P. 6–10.

69. Dixit S., Gerstenfeld E., Callans D., Marchlinski F. Mechanisms Underlying sustained firing from pulmonary veins: evidence from pacing maneuvers and pharmacological manipulation// PACE - Pacing Clin. Electrophysiol. - 2004.- V. 27. - № 8. - P. 1120–29.

70. Doisne N., Maupoil V., Cosnay P., and Findlay I. Catecholaminergic automatic activity in the rat pulmonary vein: electrophysiological differences between cardiac muscle in the left atrium and pulmonary vein // Am. J. Physiol. - 2009.- Hear. Circ. Physiol. - V. 297. - № 1. - P. H102-108.

71. Domeier T.L., Zima A.V., Maxwell J.T., Huke S., Mignery G., Blatter L. IP₃ receptor-

dependent Ca^{2+} release modulates excitation-contraction coupling in rabbit ventricular myocytes // *Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol.* - 2008.- - V. 294. - № 2. - P. H596-604.

72. Douglas Y., Jongbloed M., DeRuiter M.C., Gittenberger-De Groot A. Normal and abnormal development of pulmonary veins: state of the art and correlation with clinical entities // *Int. J. Cardiol.* - 2011.- V. 147. - № 1. - P. 13–24.

73. Douglas Y., Jongbloed M., Gittenberger-de Groot A., Evers D., Dion R., Voigt P., Bartelings M., Schalij M., Ebels T., DeRuiter M. Histology of Vascular Myocardial Wall of Left Atrial Body after Pulmonary Venous Incorporation // *Am. J. Cardiol.* - 2006.- V. 97. - № 5. - P. 662–70.

74. Douglas Y., Mahtab E., Jongbloed M., Uhrin P., Zaujec J., Binder B., Schalij M., Poelmann R., Deruiter M., Gittenberger-De Groot A. Pulmonary vein, dorsal atrial wall and atrial septum abnormalities in podoplanin knockout mice with disturbed posterior heart field contribution // *Pediatr. Res.* - 2009.- V. 65. - № 1. - P. 27–32.

75. Dupré D.J., Robitaille M., Victor Rebois R., Hébert T.E., The Role of $\text{G}\beta\gamma$ Subunits in the Organization, Assembly, and Function of GPCR Signaling Complexes // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 2009. - V. 49. - № 1. - P. 31–56.

76. Ebert S.N., Taylor D.G., Catecholamines and Development of Cardiac Pacemaking: An Intrinsically Intimate Relationship // *Cardiovasc. Res.* - 2006. - V. 72. - № 3. - P. 364–74.

77. Egorov Y.V., Kuz'min V.S., Glukhov A.V., Rosenshtraukh L.V., Electrophysiological Characteristics, Rhythm, Disturbances and Conduction Discontinuities Under Autonomic Stimulation in the Rat Pulmonary Vein Myocardium // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* - 2015. - V. 26. - № 10. - P. 1130–39.

78. Ehrlich, J., Cha T., Zhang L., Chartier D., Melnyk P., Hohnloser S., Nattel S., Cellular Electrophysiology of Canine Pulmonary Vein Cardiomyocytes: Action Potential and Ionic Current Properties // *J. Physiol.* - 2003. - V. 551. - № 3. - P. 801–13.

79. Favaro G.F., Il Miocardio Polmonare. Contributi All'istologia Umana e Comparata Dei Vasi Polmonari // *Internat. Monatsch. Anat. Physiol.* - 1910. - V. 27. -P. 376–401.

80. Fischmeister R., V Castro L.R., Abi-Gerges A., Rochais F., Jurevicius J., Leroy J., Vandecasteele G., Compartmentation of Cyclic Nucleotide Signaling in the Heart: The Role of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases // *Circ. Res.* - 2006. - V. 99. - № 8. - P. 816–28.

81. Flores N.A., Stavrou B.M., Sheridan D.J., The Effects of Diadenosine Polyphosphates on the Cardiovascular System // *Cardiovasc. Res.* - 1999. - V. 42. - № 1. - P. 15–26.

82. Fredholm B.B., Hedqvist P., Lindström K., Wennmalm M., Release of Nucleosides and

Nucleotides from the Rabbit Heart by Sympathetic Nerve Stimulation. // *Acta Physiol. Scand.* - 1982. - V. 116. - № 3. - P. 285–95.

83. Fronek K., Trophic Effect of the Sympathetic Nervous System on Vascular Smooth Muscle // *Ann. Biomed. Eng.* - 1983. - V. 11. - № 6. - P. 607–15.

84. Fuller W., Tulloch L.B., Shattock M.J., Calaghan S.C., Howie J., Wypijewski K.J., Regulation of the Cardiac Sodium Pump // *Cell. Mol. Life Sci.* - 2013. - V. 70. - № 8. - P. 1357–80.

85. Burnstock G., Purines and Purinoceptors: Molecular Biology Overview // *Encycl. Neurosci.* - 2009. - V.7. -P.1253–62.

86. Gao J., Cohen I.S., Mathias R.T., Baldo G.J., The Inhibitory Effect of β -Stimulation on the Na/K Pump Current in Guinea Pig Ventricular Myocytes Is Mediated by a CAMP-Dependent PKA Pathway // *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* - 1998. - V. 435. - № 4. - P. 479–84.

87. Gaughan J.P., Electrophysiological Properties of Neonatal Rat Ventricular Myocytes with A1-Adrenergic-Induced Hypertrophy // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* - 1998. - V. 275. - № 2 44-2. - .

88. Gerth A., Nieber K., Oppenheimer N.J., Hauschildt S., Extracellular NAD⁺ Regulates Intracellular Free Calcium Concentration in Human Monocytes // *Biochem. J.* - 2004. - V. 382. - № Pt 3. - P. 849–56.

89. Goldstein S.A.N., Bockenhauer D., O’Kelly I., Zilberberg N., Potassium Leak Channels and the KCNK Family of Two-p-Domain Subunits // *Nat. Rev. Neurosci.* - 2001. - V. 2. - № 3. - P. 175–84.

90. Gootman N., Gootman P.M., Crane L.A., Buckley B.J., Integrated Cardiovascular Responses to Combined Somatic and Visceral Afferent Stimulation in Newborn Piglets1 // *Neonatology.* - 1979. - V. 36. - № 1–2. - P. 70–77.

91. Gould D.J., Hill C.E., Alpha-Adrenoceptor Activation of a Chloride Conductance in Rat Iris Arterioles // *Am. J. Physiol.* - 1996. - V. 271. - № 6 Pt 2. - P. H2469-76.

92. Grandy S.A., Trépanier-Boulay V., Fiset C., Postnatal Development Has a Marked Effect on Ventricular Repolarization in Mice // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* - 2007. - V. 293. - № 4. - .

93. Grozinger C.M., Schreiber S.L., Regulation of Histone Deacetylase 4 and 5 and Transcriptional Activity by 14-3-3-Dependent Cellular Localization // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2000. - V. 97. - № 14. - P. 7835–40.

94. Habecker B.A., Malec N.M., Landis S.C., Differential Regulation of Adrenergic

Receptor Development by Sympathetic Innervation // J. Neurosci. - 1996. - V. 16. - № 1. - P. 229–37.

95. Haïssaguerre M., Jaïs P., Shah D.C., Takahashi A., Hocini M., Quiniou G., Garrigue S., Le Mouroux A., Le Métayer P.P., Clémenty J., Spontaneous Initiation of Atrial Fibrillation by Ectopic Beats Originating in the Pulmonary Veins // N. Engl. J. Med. - 1998. - V. 339. - № 10. - P. 659–66.

96. Hamabe A., Okuyama Y., Miyauchi Y., Zhou S., Pak H.N., Karagueuzian H.S., Fishbein M.C., Chen P.S., Correlation between Anatomy and Electrical Activation in Canine Pulmonary Veins // Circulation. - 2003. - V. 107. - № 11. - P. 1550–55.

97. Hamm H.E., The Many Faces of G Protein Signaling // J. Biol. Chem. - 1998. - V. 273. - № 2. - P. 669–72.

98. Han F., Bossuyt J., Despa S., Tucker A.L., Bers D.M., Phospholemman Phosphorylation Mediates the Protein Kinase C-Dependent Effects on Na⁺/K⁺ Pump Function in Cardiac Myocytes // Circ. Res. - 2006. - V. 99. - № 12. - P. 1376–83.

99. Hansen M., Bennett M., Barden J.A., Distribution of Purinergic P2X Receptors in the Rat Heart // J. Auton. Nerv. Syst. - 1999. - V. 78. - P. 1–9.

100. Hashizume H., Tango M., Ushiki T., Three-Dimensional Cytoarchitecture of Rat Pulmonary Venous Walls: A Light and Scanning Electron Microscopic Study // Anat. Embryol. (Berl). - 1998. - V. 198. - № 6. - P. 473–80.

101. Heijman J., Voigt N., Nattel S., Dobrev D., Cellular and Molecular Electrophysiology of Atrial Fibrillation Initiation, Maintenance, and Progression // Circ. Res. - 2014. - V. 114. - № 9. - P. 1483–99.

102. Hensley C.B., Azuma K.K., Tang M.J., McDonough A. A., Thyroid Hormone Induction of Rat Myocardial Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase: Alpha 1-, Alpha 2-, and Beta 1-MRNA and -Protein Levels at Steady State // Am. J. Physiol. Physiol. - 1992. - V. 262. - № 2. - P. C484–92.

103. Hildreth V., Anderson R., Henderson D., Autonomic Innervation of the Developing Heart: Origins and Function // Clin. Anat. - 2009. - V. 22. - № 1. - P. 36–46.

104. Hiraoka M., Kawano S., Hirano Y., Furukawa T., Role of Cardiac Chloride Currents in Changes in Action Potential Characteristics and Arrhythmias // Cardiovasc. Res. - 1998. - V. 40. - № 1. - P. 23–33.

105. Ho S.Y., Architecture of the Pulmonary Veins: Relevance to Radiofrequency Ablation // Heart. - 2001. - V. 86. - № 3. - P. 265–70.

106. Holmes A.P., Yu T.Y., Tull S., Syeda F., Kuhlmann S.M., O'Brien S.M., Patel P., Brain K.L., Pavlovic D., Brown N.A., Fabritz L., Kirchhof P., A Regional Reduction in Ito and IK_{ACh} in the

Murine Posterior Left Atrial Myocardium Is Associated with Action Potential Prolongation and Increased Ectopic Activity // PLoS One. - 2016. - V. 11. - № 5. - P. e0154077.

107. Hoshino S., Omatsu-Kanbe M., Nakagawa M., Matsuura H., Postnatal Developmental Decline in IK1 in Mouse Ventricular Myocytes Isolated by the Langendorff Perfusion Method: Comparison with the Chunk Method // Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. - 2012. - V. 463. - № 5. - P. 649–68.

108. Hosoyamada Y., Ichimura K., Koizumi K., Sakai T. Structural Organization of Pulmonary Veins in the Rat Lung, with Special Emphasis on the Musculature Consisting of Cardiac and Smooth Muscles // Anat. Sci. Int. / Japanese Assoc. Anat. - 2010. - V. 85. - № 3. - P. 152–59.

109. Huang M.H., Friend D.S., Sunday M.E., Singh K., Haley K., Austen K.F., Kelly R.A., Smith T.W. An Intrinsic Adrenergic System in Mammalian Heart // J. Clin. Invest. - 1996. - V. 98. - № 6. - P. 1298–1303.

110. Huang Z.M., Duan D.D. The Functional Role of Chloride Channels in Cardiac Pacemaker Activity. Modern Pacemakers - Present and Future // Edited by Prof. Mithilesh R Das. - InTech. - 2011. - P. 573-594.

111. Huynh T.V., Chen F., Wetzel G.T., Friedman W.F., Klitzner T.S., Developmental Changes in Membrane Ca²⁺ and K⁺ Currents in Fetal, Neonatal, and Adult Rabbit Ventricular Myocytes // Circ. Res. - 1992. - V. 70. - № 3. - P. 508–15.

112. Irie M., Tsuneoka Y., Shimobayashi M., Hasegawa N., Tanaka Y., Mochizuki S., Ichige S., Hamaguchi S., Namekata I., Tanaka H., Involvement of Alpha- and Beta-Adrenoceptors in the Automaticity of the Isolated Guinea Pig Pulmonary Vein Myocardium // J. Pharmacol. Sci. - 2017. - V. 133. - № 4. - P. 247–53.

113. Ishizuka N., Berlin J.R., Beta-Adrenergic Stimulation Does Not Regulate Na Pump Function in Voltage-Clamped Ventricular Myocytes of the Rat Heart // Pflugers Arch. - 1993. - V. 424. - № 3–4. - P. 361–63.

114. Iwamoto T., Shigekawa M., Differential Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Isoforms by Divalent Cations and Isothiourea Derivative // Am. J. Physiol. - 1998. - V. 275. - № 2. - P. C423-30.

115. Iwasaki Y., Nishida K., Kato T., Nattel S. Atrial Fibrillation Pathophysiology: Implications for Management // Circulation. - 2011. - V. 124. - № 20. - P. 2264–74.

116. Jones S.A., Yamamoto M., Tellez J.O., Billeter R., Boyett M.R., Honjo H., Lancaster M.K., Distinguishing Properties of Cells from the Myocardial Sleeves of the Pulmonary Veins: A Comparison of Normal and Abnormal Pacemakers // Circ. Arrhythm. Electrophysiol. - 2008. - V. 1. -

№ 1. - P. 39–48.

117. Kapoor N., Tran A., Kang J., Zhang R., Philipson K.D., Goldhaber J.I., Regulation of Calcium Clock-Mediated Pacemaking by Inositol-1,4,5-Trisphosphate Receptors in Mouse Sinoatrial Nodal Cells // J. Physiol. - 2015. - V. 593. - № 12. - P. 2649–63.

118. Kassiri Z., Hajjar R., Backx P.H., Molecular Components of Transient Outward Potassium Current in Cultured Neonatal Rat Ventricular Myocytes // J. Mol. Med. - 2002. - V. 80. - № 6. - P. 351–58.

119. Kassiri Z., Zobel C., Nguyen T., Molkentin J.D., Backx P.H. Reduction of I(to) Causes Hypertrophy in Neonatal Rat Ventricular Myocytes // Circ. Res. - 2002. - V. 90. - № 5. - P. 578–85.

120. Kawasaki H., Springett G.M., Mochizuki N., Toki S., Nakaya M., Matsuda M., Housman D.E., Graybiel A.M., A Family of CAMP-Binding Proteins That Directly Activate Rap1 // Science. - 1998. - V. 282. - № 5397. - P. 2275–79.

121. Khakh B.S., Burnstock G., Kennedy C., King B.F., North R.A., Seguela P., International Union of Pharmacology: XXIV. Current Status of the Nomenclature and Properties of P2X Receptors and Their Subunits // Pharmacol Rev. - 2001. - V. 53. - P. 107–18.

122. King J., Huang C., Fraser J., Determinants of Myocardial Conduction Velocity: Implications for Arrhythmogenesis // Front Physiol. - 2013. - V. 4. - P. 1–14.

123. Kneller J., Zou R., Vigmond E., Wang Z., Leon L., Nattel S., UltraRapid Communication Cholinergic Atrial Fibrillation in a Computer Model of a Realistic Ionic Properties // Circulation № 90. - 2002. - P. 73–87.

124. Kong H., Jones P.P., Koop A., Zhang L., Duff H.J., Chen S.R.W. Caffeine Induces Ca²⁺ Release by Reducing the Threshold for Luminal Ca²⁺ Activation of the Ryanodine Receptor // Biochem. J. - 2008. - V. 414. - № 3. - P. 441–52.

125. Koumi S., Backer C.L., Arentzen C.E., Sato R., Beta-Adrenergic Modulation of the Inwardly Rectifying Potassium Channel in Isolated Human Ventricular Myocytes // J Clin Invest. - 1995. - V. 96. - № 6. - P. 2870–81.

126. Von Kügelgen I., Hoffmann K. Pharmacology and Structure of P2Y Receptors// Neuropharmacology. - 2015. - V.104. -P.50–61.

127. Kumagai K., Ogawa M., Noguchi H., Yasuda T., Nakashima H., Saku K., Electrophysiologic Properties of Pulmonary Veins Assessed Using a Multielectrode Basket Catheter // J. Am. Coll. Cardiol. - 2004. - V. 43. - № 12. - P. 2281–89.

128. Kuznetsov V., Pak E., Robinson R.B., Steinberg S.F., B2-Adrenergic Receptor Actions

in Neonatal and Adult Rat Ventricular Myocytes // *Circ. Res.* - 1995. - V. 76. - № 1. - P. 40–52.

129. De la Torre J.C., An Improved Approach to Histofluorescence Using the SPG Method for Tissue Monoamines // *J. Neurosci. Methods.* - 1980. - V. 3. - № 1. - P. 1–5.

130. Lai Y.J., Eagle Yi Kung Huang, Yeh H.I., Chen Y.L., Jim Jung Ching Lin, Lin C.I. On the Mechanisms of Arrhythmias in the Myocardium of $MX1\alpha$ -Deficient Murine Left Atrial-Pulmonary Veins // *Life Sci.* - 2008. - V. 83. - № 7–8. - P. 272–83.

131. Lamb F.S., Kooy N.W., Lewis S.J. Role of $Cl(-)$ Channels in Alpha-Adrenoceptor - Mediated Vasoconstriction in the Anesthetized Rat // *Eur J Pharmacol.* - 2000. - V. 403. - № 3. - P. 403–12.

132. Latek D., Modzelewska A., Trzaskowski B., Palczewski K., Filipek S. G Protein-Coupled Receptors--Recent Advances // *Acta Biochim. Pol.* - 2012. - V. 59. - № 4. - P. 515–29.

133. Lau C., Burke S., Slotkin T. Maturation of Sympathetic Neurotransmission in the Rat Heart. IX. Development of Transsynaptic Regulation of Cardiac Adrenergic Sensitivity // *J Pharmacol Exp Ther.* - 1982. - V. 223. - № 3. - P. 675–80.

134. Lau C., Slotkin T.A. Accelerated Development of Rat Sympathetic Neurotransmission Caused by Neonatal Triiodothyronine Administration // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 1979. - V. 208. - № 3. - P. 485–90.

135. Levi A.J. The Electrogenic Sodium/Potassium Pump and Passive Sodium Influx of Isolated Guinea Pig Ventricular Myocytes // *J Cardiovasc Electrophysiol.* - 1992. - V. 3. - P. 225–238.

136. Levick J. Sympathetic Vasoconstrictor Nerves. An Introduction to Cardiovascular Physiology // Arnold Publishers., 2000.

137. Li N., Timofeyev V., Tuteja D., Xu D., Lu L., Zhang Q., Zhang Z., Singapuri A., Albert T.R., Rajagopal A.V., Bond C.T., Periasamy M., Adelman J. Chiamvimonvat N., Ablation of a Ca^{2+} -Activated K^{+} Channel (SK2 Channel) Results in Action Potential Prolongation in Atrial Myocytes and Atrial Fibrillation // *J. Physiol.* - 2009. - V. 587. - № 5. - P. 1087–1100.

138. Likungu J., Molderings GJ., Göthert M. Presynaptic Imidazoline Receptors and Alpha 2-Adrenoceptors in the Human Heart: Discrimination by Clonidine and Moxonidine // *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* - 1996. - V. 354. - № 5.

139. Lin X., Jo H., Sakakibara Y., Tambara K., Kim B., Komeda M., Matsuoka S. Beta-Adrenergic Stimulation Does Not Activate Na^{+}/Ca^{2+} Exchange Current in Guinea Pig, Mouse, and Rat Ventricular Myocytes // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* - 2006. - V. 290. - № 2. - P. C601-8.

140. Linz D., Elliott A.D., Hohl M., Malik V., Schotten U., Dobrev D., Nattel S., Böhm M.,

Floras J., Lau D.H., Sanders P., Role of Autonomic Nervous System in Atrial Fibrillation // *Int. J. Cardiol.* - 2019. - V. 287. -P. 181–88.

141. Lipp P., Laine M., Tovey S.C., Burrell K.M., Berridge M.J., Li W., Bootman M.D., Functional InsP3 Receptors That May Modulate Excitation-Contraction Coupling in the Heart // *Curr. Biol.* - 2000. - V. 10. - № 15. - P. 939–42.

142. Liu P., Guo J.H., Zhang H.C., Wang M.X., Li X.B., Zhang P., Yi Z., Sun J.L. Vagal Effects on the Occurrence of Focal Atrial Fibrillation Originating from the Pulmonary Veins// *Circ. J.* - 2009.- V.73. - № 1. - P.48–54.

143. Lopez I., Mak E.C., Ding J., Hamm H.E., Lomasney J.W. A Novel Bifunctional Phospholipase c That Is Regulated by Galpha 12 and Stimulates the Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway.// *J. Biol. Chem.* - 2001.- V. 276. - № 4. - P. 2758–65.

144. Lu Z., Scherlag B.J., Lin J., Yu L., Ji Hong Guo, Niu G., Jackman W.M., Lazzara R., Jiang H., Po S.S. Autonomic Mechanism for Initiation of Rapid Firing from Atria and Pulmonary Veins: Evidence by Ablation of Ganglionated Plexi // *Cardiovasc. Res.* - 2009. - V. 84. - № 2. - P. 245–52.

145. Ludatscher R.M. Fine Structure of the Muscular Wall of Rat Pulmonary Veins // *J. Anat.* - 1968. - V. 103. - № Pt 2. - P. 345–57.

146. Lundmark J.L., Ramasamy R., Vulliet P.R., Schaefer S. Chelerythrine Increases Na-K-ATPase Activity and Limits Ischemic Injury in Isolated Rat Hearts // *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* - 1999. - V. 277. - № 3. - P. H999–1006.

147. Lymperopoulos A. Physiology and Pharmacology of the Cardiovascular Adrenergic System // *Front. Physiol.* - 2013. - V. 4. -P. 240.

148. Mahida S., Transcription Factors and Atrial Fibrillation // *Cardiovasc. Res.* - 2014. - V. 101. - № 2. - P. 194–202.

149. Malécot C.O., Bredeloux P., Findlay I., Maupoil V., A TTX-Sensitive Resting Na⁺ Permeability Contributes to the Catecholaminergic Automatic Activity in Rat Pulmonary Vein // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* - 2015. - V. 26. - № 3. - P. 311–19.

150. Marshall J., VI. On the Development of the Great Anterior Veins in Man and Mammalia; Including an Account of Certain Remnants of Fætal Structure Found in the Adult, a Comparative View of These Great Veins the Different Mammalia, and an Analysis of Their Occasional Peculiarities in the Human Subject // *Philos. Trans. R. Soc. London* - 1850. - V. 140. -P. 133–70.

151. Masani F., Node-like Cells in the Myocardial Layer of the Pulmonary Vein of Rats: An Ultrastructural Study // *J. Anat.* - 1986. - V. 145. -P. 133–42.
152. Masuda H., Sperelakis N., Inwardly Rectifying Potassium Current in Rat Fetal and Neonatal Ventricular Cardiomyocytes // *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* - 1993. - V. 265. - № 4. - P. H1107–11.
153. Maupoil V., Bronquard C., Freslon J.L., Cosnay P., Findlay I., Ectopic Activity in the Rat Pulmonary Vein Can Arise from Simultaneous Activation of α 1- and β 1-Adrenoceptors// *Br. J. Pharmacol.* - 2007. - V. 150. - № 7. - P. 899–905.
154. Melnyk P., Ehrlich J.R., Pourrier M., Villeneuve L., Joon Cha T., Nattel S., Comparison of Ion Channel Distribution and Expression in Cardiomyocytes of Canine Pulmonary Veins versus Left Atrium// *Cardiovasc. Res.* - 2005. - V. 65. - № 1. - P. 104–16.
155. Mier K., Kemken D., Katus H.A., Richardt G., Kurz T., Adrenergic Activation of Cardiac Phospholipase D: Role of A1-Adrenoceptor Subtypes // *Cardiovasc. Res.* - 2002. - V. 54. - № 1. - P. 133–39.
156. Mihaylova-Todorova S., Todorov L.D., Westfall D.P., Correlation between the Release of the Sympathetic Neurotransmitter ATP and Soluble Nucleotidases from the Guinea Pig Vas Deferens // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 2001. - V. 296. - № 1. - P. 64–70.
157. Millino C., Sarinella F., Tiveron C., Villa A., Sartore S., Ausoni S., Cardiac and Smooth Muscle Cell Contribution to the Formation of the Murine Pulmonary Veins // *Dev. Dyn.* - 2000. - V. 218. - № 3. - P. 414–25.
158. Miras-Portugal M.T., Gualix J., Pintor J., The Neurotransmitter Role of Diadenosine Polyphosphates // 1998. Pp. 78–82 in *FEBS Letters*. Vol. 430.
159. Miyauchi Y., Hayashi H., Miyauchi M., Okuyama Y., Mandel W.J., Chen P.S., Karagueuzian H.S., Heterogeneous Pulmonary Vein Myocardial Cell Repolarization Implications for Reentry and Triggered Activity // *Hear. Rhythm.* - 2005. - V. 2. - № 12. - P. 1339–45.
160. Mochly-Rosen D., Localization of Protein Kinases by Anchoring Proteins: A Theme in Signal Transduction // *Science* (80-.). - 1995. - V. 268. - № 5208. - P. 247–51.
161. Moe G., Rheinboldt W., Abildskov J., A Computer Model of Atrial Fibrillation// *Am. Heart J.* - 1964. - V. 67. - № 2. - P. 200–220.
162. Mommersteeg M.T., Brown N.A., Prall O.W.J., Corrie De Gier-De Vries, Richard P. Harvey, Antoon F. M. Moorman, and Vincent M. Christoffels., Pitx2c and Nkx2-5 Are Required for the Formation and Identity of the Pulmonary Myocardium // *Circ. Res.* - 2007. - V. 101. - № 9. - P.

902–9.

163. Mommersteeg M.T., Christoffels V.M., Anderson R.H., Moorman A.F., Atrial Fibrillation: A Developmental Point of View // *Hear. Rhythm.* - 2009. - V. 6. - № 12. - P. 1818–24.

164. Moorman A.F., Anderson R.H., Development of the Pulmonary Vein // *Int. J. Cardiol.* - 2011. - V. 147. - № 1. - P. 182.

165. Mutafova-Yambolieva V.N., Durnin L. The Purinergic Neurotransmitter Revisited: A Single Substance or Multiple Players // *Pharmacol. Ther.* - 2014. - V. 144. - № 2. - P. 162–191.

166. Mutafova-Yambolieva V.N., Hwang S.J., Hao X., Chen H., Zhu M.X., Wood J.D., Ward S.M., Sanders K.M. Beta -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Is an Inhibitory Neurotransmitter in Visceral Smooth Muscle // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - V. 104. - № 41. - P.16359–64.

167. Namekata I., Tsuneoka Y., Akiba A., Nakamura H., Shimada H., Takahara A., Tanaka H. Intracellular Calcium and Membrane Potential Oscillations in the Guinea Pig and Rat Pulmonary Vein Myocardium // *Bioimages.* -2010. -Vol. 18. - P. 11-22.

168. Natarajan A.R., Rong Q., Katchman A.N., Eber S.N. Intrinsic Cardiac Catecholamines Help Maintain Beating Activity in Neonatal Rat Cardiomyocyte Cultures // *Pediatr. Res.* - 2004. - V. 56. - № 3. - P. 411–17.

169. Nelson M.T., Quayle J.M. Physiological Roles and Properties of Potassium Channels in Arterial Smooth Muscle // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* - 1995. - V. 268. - № 4 37-4.

170. Nerbonne J.M., Regulation of Voltage-Gated K⁺ Channel Expression in the Developing Mammalian Myocardium // *J. Neurobiol.* - 1998. - V. 37. - № 1. - P. 37–59.

171. Nerbonne J.M., Kass R.S., Molecular Physiology of Cardiac Repolarization // *Physiol. Rev.* - 2005. - V. 85. - № 4. - P. 1205–53.

172. Neumann J., Meissner A., Bokník P., Gombosová I., Knapp J., Lüss H., Müller F. U., Schlüter H., Zidek W., Rolf N., Van Aken H., Vahlensieck U., Schmitz W., Inotropic Effects of Diadenosine Tetraphosphate in Isolated Canine Cardiac Preparations // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* - 1999. - V. 33. - № 1. - P. 151–56.

173. Nicoll D., Ottolia M., Lu L., Lu Y., Philipson K., A New Topological Model of the Cardiac Sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ Exchanger// *J. Biol. Chem.* - 1999. - V. 274. - № 2. - P. 910–17.

174. Nilius B., *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology.* 162. Springer. - 2012.

175. Nishimaru K., Kobayashi M., Matsuda T., Tanaka Y., Tanaka H., Shigenobu K., α -Adrenoceptor Stimulation-Mediated Negative Inotropism and Enhanced Na⁺/Ca²⁺ Exchange in

Mouse Ventricle // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* - 2001. - V. 280. - № 1 49-1. - P. H132–41.

176. Niwa N., Nerbonne J.M., Molecular Determinants of Cardiac Transient Outward Potassium Current (I_{to}) Expression and Regulation // *J. Mol. Cell. Cardiol.* - 2010. - V. 48. - № 1. - P. 12–25.

177. North R., Molecular Physiology of P2X Receptors // *Physiol. Rev.* - 2002. - V. 82. - № 4. - P. 1013–67.

178. Nozdrachev A.D., Masliukov P. M., Neuropeptide Y and Autonomic Nervous System // *J. Evol. Biochem. Physiol.* - 2011. - V. 47. - № 2. - P. 121–30.

179. O'Connell T.D., Jensen B.C., Baker A.J., Simpson P.C., Cardiac Alpha 1 -Adrenergic Receptors: Novel Aspects of Expression, Signaling Mechanisms, Physiologic Function, and Clinical Importance // *Pharmacol. Rev.* - 2014. - V. 66. - № 1. - P. 308–33.

180. Physiologic Function, and Clinical Importance// *Pharmacol. Rev.* - V.66. - № 1. - P.308–33.

181. Okamoto Y., Kawamura K., Nakamura Y., Ono K., Pathological Impact of Hyperpolarization-Activated Chloride Current Peculiar to Rat Pulmonary Vein Cardiomyocytes // *J. Mol. Cell. Cardiol.* - 2014. - V. 66. -P. 53–62.

182. Okamoto Y., Takano M., Ohba T., Ono K., Arrhythmogenic Coupling between the Na^+ - Ca^{2+} Exchanger and Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor in Rat Pulmonary Vein Cardiomyocytes // *J. Mol. Cell. Cardiol.* - 2012. - V. 52. - № 5. - P. 988–97.

183. Özgen N., Dun W., Sosunov E.A., Anyukhovskiy E.P., Hirose M., Duffy H.S., Boyden P.A., Rosen M.R., Early Electrical Remodeling in Rabbit Pulmonary Vein Results from Trafficking of Intracellular SK2 Channels to Membrane Sites // *Cardiovasc. Res.* - 2007. - V. 75. - № 4. - P. 758–69.

184. Pappano A. J., Ontogenetic Development of Autonomic Neuroeffector Transmission and Transmitter Reactivity in Embryonic and Fetal Hearts // *Pharmacol. Rev.* - 1977. - V. 29. - № 1. - P. 3–33.

185. Patterson E., Po S.S., Scherlag B.J., Lazzara R., Triggered Firing in Pulmonary Veins Initiated by in Vitro Autonomic Nerve Stimulation // *Hear. Rhythm* - 2005. - V. 2. - № 6. - P. 624–31.

186. Pavlovic D., Fuller W., Shattock M.J., Novel Regulation of Cardiac Na Pump via Phospholemman // *J. Mol. Cell. Cardiol.* - 2013. - V. 61. -P. 83–93.

187. Pelleg A., Katchanov G., Xu J., Autonomic Neural Control of Cardiac Function: Modulation by Adenosine and Adenosine 5'-Triphosphate // *Am. J. Cardiol.* - 1997. - V. 79. - № 12A. - P. 11–14.

188. Perchenet L., Hinde A.K., Patel K.C., Hancox J.C., Levi A.J., Stimulation of Na/Ca Exchange by the β -Adrenergic/Protein Kinase A Pathway in Guinea-Pig Ventricular Myocytes at 37°C // *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* - 2000. - V. 439. - № 6. - P. 822–28.
189. Pereira L., Rehmann H., Hung Lao D., Erickson J.R., Bossuyt J., Chen J., Bers D.M., Novel Epac Fluorescent Ligand Reveals Distinct Epac1 vs. Epac2 Distribution and Function in Cardiomyocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2015. - V. 112. - № 13. - P. 3991–96.
190. Pereira M.F., Hernandez M.D., Pintor J., Miras-Portugal M.T., Cunha R.A., Ribeiro J.A., Diadenosine Polyphosphates Facilitate the Evoked Release of Acetylcholine from Rat Hippocampal Nerve Terminals // *Brain Res.* - 2000. - V. 879. - № 1–2. - P. 50–54.
191. Perez-Lugones A., McMahon J.T., Ratliff N.B., Saliba W.I., Schweikert R.A., Marrouche N.F., Saad E.B., Navia J.L., McCarthy P.M., Tchou P., Gillinov M.A., Natale A., Evidence of Specialized Conduction Cells in Human Pulmonary Veins of Patients with Atrial Fibrillation // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* - 2003. - V. 14. - № 8. - P. 803–9.
192. Piascik M.T., Perez D.M., Alpha1-Adrenergic Receptors: New Insights and Directions // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 2001. - V. 298. - № 2. - P. 403–10.
193. Pierpont G.L., DeMaster E.G., Reynolds S., Pederson J., Cohn J.N., Ventricular Myocardial Catecholamines in Primates // *J. Lab.Clin.Med.* - 1985. V. 106. -P. 205–10.
194. Pignier C., Levan-Petit I., Ancey C., Potreau D., Alpha-Adrenoceptor Stimulation Induces Hypertrophy and Increases L-Type Calcium Current Density in Neonatal Rat Ventricular Cardiomyocytes in Culture // *Receptors Channels.* - 2000. - V. 7. - № 3. - P. 173–87.
195. Pintor J., Miras-Portugal M.T., P2 Purinergic Receptors for Diadenosine Polyphosphates in the Nervous System // *Gen. Pharmacol.* - 1995. V. 26. - № 2. - P. 229–35.
196. Pintor J., Rotllán P., Torres M., Miras-Portugal M.T., Characterization and Quantification of Diadenosine Hexaphosphate in Chromaffin Cells: Granular Storage and Secretagogue-Induced Release // *Anal. Biochem.* - 1992. - V. 200. - № 2. - P. 296–300.
197. Postma A., Dekker L., Soufan A., Moorman A., Developmental and Genetic Aspects of Atrial Fibrillation // *Trends Cardiovasc. Med.* - 2009. - V. 19. - № 4. - P. 123–30.
198. 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 // *J. Physiol. Sci.* - 2019. - V. 69. - № 6. - P. 1041–55.
199. Pucéat M., Vassort G., Signalling by Protein Kinase C Isoforms in the Heart // *Mol.*

Cell. Biochem. - 1996. - V. 157. - № 1–2. - P. 65–72.

200. Pucelík P., Barták F., Ontogenetic and Comparative Aspects of the Role of Calcium Currents in the Duration of Action Potentials in the Functioning Myocardium of the Heart Ventricle // Ceskoslov. Fysiol. - 1982. - V. 31. - № 6. - P. 501–4.

201. Pustovit K.B., Kuzmin V.S., Abramochkin D.V., Diadenosine Tetra- and Pentaphosphates Affect Contractility and Bioelectrical Activity in the Rat Heart via P2 Purinergic Receptors // 2015.

202. 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 Signal. - 2019.

203. Puzdrova V. A., Kudryashova T.V., Gaynullina D.K., Mochalov S.V., Aalkjaer C., Nilsson H., Vorotnikov A.V., Schubert R., Tarasova O.S., Trophic Action of Sympathetic Nerves Reduces Arterial Smooth Muscle Ca^{2+} Sensitivity during Early Post-Natal Development in Rats // Acta Physiol. (Oxf). - 2014. - V. 212. - № 2. - P. 128–41.

204. Qi X.Y., Diness J.G., Brundel B.M., Zhou X.B., Naud P., Tung Wu C., Huang H., Harada M., Aflaki M., Dobrev D., Grunnet M., Nattel S., Role of Small-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels in Atrial Electrophysiology and Fibrillation in the Dog // Circulation - 2014. - V. 129. - № 4. - P. 430–40.

205. Ralevic V., Modulation by Nicotinamide Adenine Dinucleotide of Sympathetic and Sensory-motor Neurotransmission via P1-purinoceptors in the Rat Mesenteric Arterial Bed // Br. J. Pharmacol. - 2014. - V. 114. - № 8. - P. 1541–48.

206. Ralevic V., V Hoyle C.H., Burnstock G., Pivotal Role of Phosphate Chain Length in Vasoconstrictor versus Vasodilator Actions of Adenine Dinucleotides in Rat Mesenteric Arteries // 1995. - P. 703–13.

207. Reimann F., Ashcroft F.M., Inwardly Rectifying Potassium Channels // Curr. Opin. Cell Biol. - 1999. - V. 11. - № 4. - P. 503–8.

208. Robinson R.B., Autonomic Receptor--Effector Coupling during Post-Natal Development // Cardiovasc. Res. - 1996. - V. 31 Spec No. - P. E68-76.

209. Robinson RB., Liu QY., Rosen MR., Ionic Basis for Action Potential Prolongation by Phenylephrine in Canine Epicardial Myocytes // J Cardiovasc Electrophysiol. - 2000. - V. 11. - № 1. - P. 70–76.

210. Robkin M.A., Shepard T.H., Dyer D.C., Autonomic Receptors of the Early Rat Embryo

Heart: Growth and Development // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 1976. - V. 151. - № 4. - P. 799–803.

211. Rodriguez del Castillo A., Torres M., Delicado E.G., Miras-Portugal M.T., Subcellular Distribution Studies of Diadenosine Polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in Bovine Adrenal Medulla: Presence in Chromaffin Granules // J. Neurochem. - 1988. - V. 51. - № 6. - P. 1696–1703.

212. Ronca A.E., Abel R.A., Ronan P.J., Renner K.J., Alberts J.R., Effects of Labor Contractions on Catecholamine Release and Breathing Frequency in Newborn Rats // Behav. Neurosci. - 2006. - V. 120. - № 6. - P. 1308–14.

213. de Rooij J., Zwartkruis F.J., Verheijen M.H., Cool R.H., Nijman S.M., Wittinghofer A., Bos J.L., Epac Is a Rap1 Guanine-Nucleotide-Exchange Factor Directly Activated by Cyclic AMP // Nature. - 1998. - V. 396. - № 6710. - P. 474–77.

214. Rudy Y., Molecular Basis of Cardiac Action Potential Repolarization // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 2008. - V. 1123. -P. 113–18.

215. Ruknudin A., He S., Lederer W.J., Schulze D.H., Functional Differences between Cardiac and Renal Isoforms of the Rat Na⁺-Ca²⁺ Exchanger NCX1 Expressed in Xenopus Oocytes // J. Physiol. - 2000. - V. 529. - № 3. - P. 599–610.

216. Rysevaite K., Saburkina I., Pauziene N., Noujaim S.F., Jalife J., Pauza D.H., Morphologic Pattern of the Intrinsic Ganglionated Nerve Plexus in Mouse Heart // Hear. Rhythm. - 2011. - V. 8. - № 3. - P. 448–54.

217. Rysevaite K., Saburkina I., Pauziene N., Vaitkevicius R., Noujaim S.F., Jalife J., Pauza D.H., Immunohistochemical Characterization of the Intrinsic Cardiac Neural Plexus in Whole-Mount Mouse Heart Preparations // Hear. Rhythm. - 2011. - V. 8. - № 5. - P. 731–38.

218. Saito T., Waki K., Becker A.E., Left Atrial Myocardial Extension onto Pulmonary Veins in Humans: Anatomic Observations Relevant for Atrial Arrhythmias // J. Cardiovasc. Electrophysiol. - 2000. - V. 11. - № 8. - P. 888–94.

219. Saucerman J.J., McCulloch A.D., Cardiac Beta-Adrenergic Signaling: From Subcellular Microdomains to Heart Failure // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 2006. - V. 1080. -P. 348–61.

220. Schaffer W., Williams R.S., Age-Dependent Changes in Expression of Alpha1-Adrenergic Receptors in Rat Myocardium // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1986. - V. 138. - № 1. - P. 387–91.

221. Schauerte P., Scherlag B.J., Patterson E., Scherlag M.A., Matsudaria K., Nakagawa H., Lazzara R., Jackman W.M., Focal Atrial Fibrillation: Experimental Evidence for a Pathophysiologic Role of the Autonomic Nervous System // J. Cardiovasc. Electrophysiol. - 2001. - V. 12. - № 5. - P.

592–99.

222. Schmidt C., Wiedmann F., Schweizer P.A., Katus H.A., Thomas D., Inhibition of Cardiac Two-Pore-Domain K⁺ (K2P) Channels - An Emerging Antiarrhythmic Concept // *Eur. J. Pharmacol.* - 2014. - V. 738. -P. 250–55.

223. Schneider M.A., Nature of Rapid Pulmonary Vein Tachycardias: Reentry or Not Reentry // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* - 2003. - V. 14. - № 9. - P. 933–34.

224. Schömig, E., Lazar A., Gründemann D., Extraneuronal Monoamine Transporter and Organic Cation Transporters 1 and 2: A Review of Transport Efficiency // *Handb. Exp. Pharmacol.* № 175. - 2006. - P. 151–80.

225. Schotten U., Verheule S., Kirchhof P., Goette A., Pathophysiological Mechanisms of Atrial Fibrillation: A Translational Appraisal // *Physiol. Rev.* - 2011. - V. 91. - № 1. - P. 265–325.

226. Schubert R., Nelson M.T., Protein Kinases: Tuners of the BKCa Channel in Smooth Muscle // *Trends Pharmacol. Sci.* - 2001. - V. 22. - № 10. - P. 505–12.

227. Seino S., Shibasaki T., PKA-Dependent and PKA-Independent Pathways for CAMP-Regulated Exocytosis // *Physiol. Rev.* - 2005. - V. 85. - № 4. - P. 1303–42.

228. Sharifov O.F., Fedorov V.V., Beloshapko G.G., Glukhov A.V., Yushmanova A.V., Rosenshtraukh L.V., Roles of Adrenergic and Cholinergic Stimulation in Spontaneous Atrial Fibrillation in Dogs // *J. Am. Coll. Cardiol.* - 2004. - V. 43. - № 3. - P. 483–90.

229. Shattock M.J., Ottolia M., Bers D.M., Blaustein M.P., Boguslavskyi A., Bossuyt J., Bridge J.H., Chen-Izu Y., Clancy C.E., Edwards A., Goldhaber J., Kaplan J., Lingrel J.B., Pavlovic D., Philipson K., Sipido K.R., Xie Z.J., Na⁺/Ca²⁺ Exchange and Na⁺/K⁺-ATPase in the Heart // *J. Physiol.* - 2015. - V. 593. - № 6. - P. 1361–82.

230. Shigekawa M.T.I., Cardiac Na⁺ + -Ca²⁺ Exchange Molecular and Pharmacological Aspects // *Circ. Res.* - 2001. - V. 88. - № 9. - P. 864–76.

231. Shinagawa Y., Satoh H., Noma A., The Sustained Inward Current and Inward Rectifier K⁺ Current in Pacemaker Cells Dissociated from Rat Sinoatrial Node // *J. Physiol.* - 2000. - V. 523 Pt 3. -P. 593–605.

232. Sizarov A., Anderson R.H., Christoffels V.M., Moorman A.F., Three-Dimensional and Molecular Analysis of the Venous Pole of the Developing Human Heart // *Circulation.* - 2010. - V. 122. - № 8. - P. 798–807.

233. Smotherman W.P., Robinson S.R., Ronca A.E., Alberts J.R., Hepper P.G., Heart Rate Response of the Rat Fetus and Neonate to a Chemosensory Stimulus // *Physiol. Behav.* - 1991. - V. 50.

- № 1. - P. 47–52.

234. Smyth L.M., Bobalova J., Mendoza M.G., Lew C., Mutafova-Yambolieva V.N., Release of Beta-Nicotinamide Adenine Dinucleotide upon Stimulation of Postganglionic Nerve Terminals in Blood Vessels and Urinary Bladder // *J. Biol. Chem.* - 2004. - V. 279. - № 47. - P. 48893–903.

235. Smyth L.M., Breen L.T., Mutafova-Yambolieva V.N., Nicotinamide Adenine Dinucleotide Is Released from Sympathetic Nerve Terminals via a Botulinum Neurotoxin A-Mediated Mechanism in Canine Mesenteric Artery // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* - 2006. - V. 290. - № 5. - .

236. Snabaitis A.K., Muntendorf A., Wieland T., Avkiran M., Regulation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway in Adult Myocardium: Differential Roles of Gq/11, Gi and G 12/13 Proteins in Signalling by A1-Adrenergic, Endothelin-1 and Thrombin-Sensitive Protease-Activated Receptors // *Cell. Signal.* - 2005. - V. 17. - № 5. - P. 655–64.

237. Snarr B.S., O'Neal J.L., Chintalapudi M.R., Wirrig E.E., Phelps A.L., Kubalak S.W., Wessels A., Isl1 Expression at the Venous Pole Identifies a Novel Role for the Second Heart Field in Cardiac Development // *Circ. Res.* - 2007. - V. 101. - № 10. - P. 971–74.

238. Sorota S., Rybina I., Yamamoto A., Yi Du X., Isoprenaline Can Activate the Acetylcholine-Induced K⁺ Current in Canine Atrial Myocytes via G(s)-Derived B γ Subunits // *J. Physiol.* - 1999. - V. 514. - № 2. - P. 413–23.

239. Sperla Â., Erde F., Szabo Â., Vizi E., Local Regulation of [3H]-Noradrenaline Release from the Isolated Guinea-Pig Right Atrium by P2X -Receptors Located on Axon Terminals // 2000. - P. 1775–1783.

240. Stadel J., Lefkowitz R.J., Beta-Adrenergic Receptors // *Recept.* - 1991. - P. 1–40.

241. Stavrakis S., Nakagawa H., Po S.S., Scherlag B.J., Lazzara R., Jackman W.M., The Role of the Autonomic Ganglia in Atrial Fibrillation // *JACC. Clin. Electrophysiol.* - 2015. - V. 1. - № 1–2. - P. 1–13.

242. Stavrou B.M., Sheridan D.J., Flores N.A., Contribution of Nitric Oxide and Prostanoids to the Cardiac Electrophysiological and Coronary Vasomotor Effects of Diadenosine Polyphosphates // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 2001. - V. 298. - № 2. - P. 531–38.

243. Steinberg S.F., Cardiac Actions of Protein Kinase C Isoforms // *Physiology (Bethesda).* - 2012. - V. 27. - № 3. - P. 130–39.

244. Stengl M., Ramakers C., Donker D.W., Nabar A., Rybin A.V., Spätjens R.L., van der

Nagel T., Wodzig W.K., Sipido K.R., Antoons G., Moorman A.F.M., Vos M.A., Volders P.G.A., Temporal Patterns of Electrical Remodeling in Canine Ventricular Hypertrophy: Focus on IKs Downregulation and Blunted β -Adrenergic Activation // *Cardiovasc. Res.* - 2006. - V. 72. - № 1. - P. 90–100.

245. Stieda L., Ueber Quergestreifte Muskelfasern in Der Wand Der Lungenvenen // *Arch Für Mikroskopische Anat.* - 1877. - V. 14. - P. 243–248.

246. Stimers J.R., Shigeto N., Lieberman M., Na/K Pump Current in Aggregates of Cultured Chick Cardiac Myocytes // *J. Gen. Physiol.* - 1990. - V. 95. - № 1. - P. 61–76.

247. Sumiyoshi R., Nishimura J., Kawasaki J., Kobayashi S., Takahashi S., Kanaide H., Diadenosine Polyphosphates Directly Relax Porcine Coronary Arterial Smooth Muscle // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 1997. - V. 283. - № 2. - P. 548–56.

248. Sun J., Scherlag B.J., Po S.S., Role of the Autonomic Nervous System in Atrial Fibrillation // in *Cardiac electrophysiology: from cell to bedside*. Amsterdam: Elsevier. - 2014.

249. Sun W.T., Hou H.T., Chen H.X., Xue H.M., Wang J., He G., Qin Yang Q. Calcium-Activated Potassium Channel Family in Coronary Artery Bypass Grafts // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* - 2020.

250. Sweadner K. J., Rael E. The FXYD Gene Family of Small Ion Transport Regulators or Channels: CDNA Sequence, Protein Signature Sequence, and Expression // *Genomics.* - 2000. - V. 68. - № 1. - P. 41–56.

251. Sylva M., van den Hoff M., Moorman A. Development of the Human Heart // *Am. J. Med. Genet. Part A.* - 2014. - V. 164. - № 6. - P. 1347–71.

252. Szentmoklosi A.J., Nemeth M., Papp J.Gy., Szekeres L. Effect of Adenosine on Sinoatrial and Ventricular Automaticity of the Guinea Pig // 1980. - V. 149. - P. 147–49.

253. Szûts V., Ötvös F., Dézsi L., Vágvölgyi C., Szalontai B., Dobrzynski H., Boyett M., Zhang H., Papp JG, Varró A., Benyhe S., Erdélyi L. What Have We Learned from Two-Pore Potassium Channels Their Molecular Configuration and Function in the Human Heart // *Acta Biol. Szeged.* - 2012. - V. 56. - № 2. - P. 93–107.

254. Takeo T., Katsuragi T., Sato C., Furukawa T. ATP Release Evoked by Isoprenaline from Adrenergic Nerves of Guinea Pig Atrium // 1995. - V. 186. - P. 95–98.

255. Tamargo J., Pharmacology of Cardiac Potassium Channels // *Cardiovasc. Res.* - 2004. - V. 62. - № 1. - P. 9–33.

256. Tan A.Y., Li H., Wachsmann-Hogiu S., Chen L.S., Chen P.S., Fishbein M.C.

Autonomic Innervation and Segmental Muscular Disconnections at the Human Pulmonary Vein-Atrial Junction. Implications for Catheter Ablation of Atrial-Pulmonary Vein Junction // *J. Am. Coll. Cardiol.* - 2006. - V. 48. - № 1. - P. 132–43.

257. Tang X., Downes C.P., Purification and Characterization of Gbetagamma-Responsive Phosphoinositide 3-Kinases from Pig Platelet Cytosol // *J. Biol. Chem.* - 1997. - V. 272. - № 22. - P. 14193–99.

258. Taussig R., Tang W.J., Hepler J.R., Gilman A.G., Distinct Patterns of Bidirectional Regulation of Mammalian Adenylyl Cyclases // *J. Biol. Chem.* - 1994. - V. 269. - № 8. - P. 6093–6100.

259. Thomas N.L., Williams A.J., Pharmacology of Ryanodine Receptors and Ca²⁺-Induced Ca²⁺ Release // *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* - 2012. - V. 1. - № 4. - P. 383–97.

260. Todorov L.D., Mihaylova-Todorova S., Craviso G.L., Bjur R.A., Westfall D.P., Evidence for the Differential Release of the Cotransmitters ATP and Noradrenaline from Sympathetic Nerves of the Guinea-Pig Vas Deferens // *J. Physiol.* - 1996. - V. 496 (Pt 3). -P. 731–48.

261. Trépanier-Boulay V., Lupien M.A., St-Michel C., Fiset C., Postnatal Development of Atrial Repolarization in the Mouse // *Cardiovasc. Res.* - 2004. - V. 64. - № 1. - P. 84–93.

262. Tsuneoka Y., Irie M., Tanaka Y., Sugimoto T., Kobayashi Y., Kusakabe T., Kato K., Hamaguchi S., Namekata I., Tanaka H., Permissive Role of Reduced Inwardly-Rectifying Potassium Current Density in the Automaticity of the Guinea Pig Pulmonary Vein Myocardium // *J. Pharmacol. Sci.* - 2017. - V. 133. - № 4. - P.195–202.

263. Tsuneoka Y., Kobayashi Y., Honda Y., Namekata I., Tanaka H., Electrical Activity of the Mouse Pulmonary Vein Myocardium // *J. Pharmacol. Sci.* - 2012. - V. 119. - № 3. - P. 287–92.

264. Vahlensiek U., Bonki'K P., GombosovaA' I., Huke S, Knapp J., Linck B., Lu H., Mu F.U., Deng, M.C. Scheld H.H., Jankowski H., Schlu H., Inotropic Effects of Diadenosine Tetraphosphate (AP 4 A) in Human and Animal Cardiac Preparations //1999. - V. 288. - № 2. - P. 805–13.

265. Vaitkevicius R., Saburkina I., Rysevaite K., Vaitkeviciene I., Pauziene N., Zaliunas R., Schauerte P., Jalife J., Pauza D.H., Nerve Supply of the Human Pulmonary Veins: An Anatomical Study // *Hear. Rhythm.* - 2009. - V. 6. - № 2. - P. 221–28.

266. Vaitkevicius R., Saburkina I., Zaliunas R., Pauziene N., Vaitkeviciene I., Schauerte P., Pauza D.H., Innervation of Pulmonary Veins: Morphologic Pattern and Pathways of Nerves in the Human Fetus // *Ann. Anat.* - 2008. - V. 190. - № 2. - P. 158–66.

267. Vassort G. Adenosine 5'-Triphosphate: A P2-Purinergetic Agonist in the Myocardium.// *Physiol. Rev.* - 2001.- V.81. - № 2. - P.767–806.
268. Vega R.B., Harrison B.C., Meadows E., Roberts C.R., Papst P.J., Olson E.N., McKinsey T.A. Protein Kinases C and D Mediate Agonist-Dependent Cardiac Hypertrophy through Nuclear Export of Histone Deacetylase 5 // *Mol. Cell. Biol.* - 2004. - V. 24. - № 19. - P. 8374–85.
269. Verheule S., Wilson E.E., Arora R., Engle S.K., Scott L.R., Olgin J.E., Tissue Structure and Connexin Expression of Canine Pulmonary Veins // *Cardiovasc. Res.* - 2002. - V. 55. -P. 727–38.
270. Vogel S. M., Terzic A., Alpha-Adrenergic Regulation of Action Potentials in Isolated Rat Cardiomyocytes // *Eur. J. Pharmacol.* - 1989. - V. 164. - № 2. - P. 231–39.
271. Wahler G.M., Developmental Increases in the Inwardly Rectifying Potassium Current of Rat Ventricular Myocytes // *Am. J. Physiol.* - 1992. - V. 262. - № 5 Pt 1. - P. C1266-72.
272. Wang H., Yang B., Zhang Y., Han H., Wang J., Shi H., Wang Z., Different Subtypes of A1-Adrenoceptor Modulate Different K⁺ Currents via Different Signaling Pathways in Canine Ventricular Myocytes // *J. Biol. Chem.* - 2001. - V. 276. - № 44. - P. 40811–16.
273. Wettschureck N., Offermanns S., Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions // *Physiol. Rev.* - 2005. - V. 85. - № 4. - P. 1159–1204.
274. White C.N., Figtree G.A., Liu C.C., Garcia A., Hamilton E.J., Chia K.K.M., Rasmussen H.H., Angiotensin II Inhibits the Na⁺-K⁺ Pump via PKC-Dependent Activation of NADPH Oxidase // *Am. J. Physiol.* - 2009. - *Cell Physiol.* - V. 296. - № 4.
275. Wiener N., Rosenblueth A., The Mathematical Formulation of the Problem of Conduction of Impulses in a Network of Connected Excitable Elements, Specifically in Cardiac Muscle // *Arch. Inst. Cardiol. Mex.* - 1946. - V. 16. - № 3. - P. 205–65.
276. Wilke B.U., Lindner M., Greifenberg L., Albus A., Kronimus Y., Bünemann M., Leitner M.G., Oliver D., Diacylglycerol Mediates Regulation of TASK Potassium Channels by Gq-Coupled Receptors // *Nat. Commun.* - 2014. - V. 5.
277. Winterberg H., Ueber Herzflimmern Und Seine Beeinflussung durch Kampher // *Zetischrift Fur Exp. Pathol. Und Ther.* - 1906. - V. 3. - P. 182–208.
278. Workman A.J., Cardiac Adrenergic Control and Atrial Fibrillation // *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* - 2010. - V. 381. - № 3. - P. 235–49.
279. Wright C.D., Chen Q., Baye N.L., Huang Y., Healy C.L., Kasinathan S., O'Connell T.D., Nuclear A1-Adrenergic Receptors Signal Activated ERK Localization to Caveolae in Adult Cardiac Myocytes // *Circ. Res.* - 2008. - V. 103. - № 9. - P. 992–1000.

280. Wu S.C., Dahl E.F., Wright C.D., Cypher A.L., Healy C.L., O'Connell T.D., Nuclear Localization of A1A-Adrenergic Receptors Is Required for Signaling in Cardiac Myocytes: An "inside-out" A1-AR Signaling Pathway // *J. Am. Heart Assoc.* - 2014. - V. 3. - № 2. - P. e000145.
281. Wu S.C., O'Connell T.D., Nuclear Compartmentalization of A1-Adrenergic Receptor Signaling in Adult Cardiac Myocytes // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* P.1. - 2014.
282. Xiao R.P., Zhu W., Zheng M., Cao C., Zhang Y., Lakatta E.G., Han Q., Subtype-Specific $\alpha 1$ - and β -Adrenoceptor Signaling in the Heart // *Trends Pharmacol. Sci.* - 2006. - V. 27. - № 6. - P. 330–37.
283. Yamamoto M., Dobrzynski H., Tellez J., Niwa R., Billeter R., Honjo H., Kodama I., Boyett M.R., Extended Atrial Conduction System Characterised by the Expression of the HCN4 Channel and Connexin45 // *Cardiovasc. Res.* - 2006. - V. 72. - № 2. - P. 271–81.
284. Yamada J., Ohkusa T., Nao T., Ueyama T., Yano M., Kobayashi S., Hamano K., Esato K., Matsuzaki M. Up-Regulation of Inositol 1,4,5 Trisphosphate Receptor Expression in Atrial Tissue in Patients with Chronic Atrial Fibrillation // *J. Am. Coll. Cardiol.* - 2001. - V. 37. - № 4. - P. 1111–19.
285. Ye W. Wang J., Song Y., Yu D., Sun C., Liu C., Chen F., Zhang Y., Wang F., Harvey R.P., Schrader L., Martin J.F., Ping Chen Y. A Common Shox2–Nkx2-5 Antagonistic Mechanism Primes the Pacemaker Cell Fate in the Pulmonary Vein Myocardium and Sinoatrial Node // *Dev.* - 2015. - V. 142. - № 14. - P. 2521–32.
286. Zaglia T., Milan G., Franzoso M., Bertaggia E., Pianca N., Piasentini E., Voltarelli V.A., Chiavegato D., Brum P.C., Glass D.J., Schiaffino S., Sandri M., Mongillo M. Cardiac Sympathetic Neurons Provide Trophic Signal to the Heart via B2-Adrenoceptor-Dependent Regulation of Proteolysis // *Cardiovasc. Res.* - 2013. - V. 97. - № 2. - P. 240–50.
287. Zaglia T., Mongillo M. Cardiac Sympathetic Innervation, from a Different Point of (Re)View // *J. Physiol.* - 2017. - V. 595. - № 12. - P. 3919–30.
288. Zarzoso M., Rysevaite K., Milstein M.L., Calvo C.J., Kean A.C., Atienza F., Pauza D.H., Jalife J., Noujaim S.F. Nerves Projecting from the Intrinsic Cardiac Ganglia of the Pulmonary Veins Modulate Sinoatrial Node Pacemaker Function // *Cardiovasc. Res.* - 2013. - V. 99. - № 3. - P. 566–75.
289. Zehendner C.M., Luhmann H.J., Yang J.W. A Simple and Novel Method to Monitor Breathing and Heart Rate in Awake and Urethane-Anesthetized Newborn Rodents // edited by V. Lionetti *PLoS One* - 2013. - V.8. - № 5. - P. e62628.
290. Zhang S., Coso O.A., Collins R., Silvio Gutkind J., Simonds W.F. A C-Terminal

Mutant of the G Protein β Subunit Deficient in the Activation of Phospholipase C- β // J. Biol. Chem. - 1996. - V. 271. - № 33. - P. 20208–12.

291. Zhao J., Kharche S., Hansen B., Csepe T.A., Wang Y., Stiles M.K., Fedorov V.V. Optimization of Catheter Ablation of Atrial Fibrillation: Insights Gained from Clinically-Derived Computer Models // Int. J. Mol. Sci. - 2015. - V. 16. - № 5. - P. 10834–54.

292. Zitron E., Günth M., Scherer D., Kiesecker C., Kulzer M., Bloehs R., Scholz E.P., Thomas D., Weidenhammer C., Kathöfer S., Bauer A., Katus H.A., Karle C.A. Kir2.x Inward Rectifier Potassium Channels Are Differentially Regulated by Adrenergic Alpha1A Receptors // J. Mol. Cell. Cardiol. - 2008. - V. 44. - № 1. - P. 84–94.

293. Zwart R., Verhaagh S., Buitelaar M., Popp-Snijders C., Barlow D.P. Impaired Activity of the Extraneuronal Monoamine Transporter System Known as Uptake-2 in Orct3/Slc22a3-Deficient Mice // Mol. Cell. Biol. - 2001. - V. 21. - № 13. - P. 4188–96.