

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Иванова Александра Дмитриевна

**МЕХАНИЗМЫ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ПЕЙСМЕКЕРНЫХ СВОЙСТВ МИОКАРДА
ПОЛЫХ ВЕН В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

Специальность – 1.5.5 – физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2022

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

Научный руководитель *Кузьмин Владислав Стефанович – кандидат биологических наук*

Официальные оппоненты *Артеева Наталия Викторовна – доктор биологических наук, Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук», лаборатория физиологии сердца, ведущий научный сотрудник*

Давыдова Мария Павловна – кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», факультет фундаментальной медицины, кафедра физиологии и общей патологии, старший преподаватель

Мелькумянц Артур Маркович – доктор биологических наук, профессор, Институт экспериментальной кардиологии имени академика В.Н.Смирнова Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И.Чазова» Минздрава России, лаборатория экспериментальной патологии сердца, ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится «14» ноября 2022 г. в 15:30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.7 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, аудитория 389.

E-mail: bellaum@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский проспект д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА» <https://istina.msu.ru/dissertations/495821595/>

Автореферат разослан «12» октября 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета МГУ.015.7 (МГУ.03.06), доктор биологических наук

Б.А.Умарова

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы и степень ее разработанности. Известно, что кардиомиоциты у большинства млекопитающих формируют не только миокардиальную ткань предсердий и желудочков, но и распространяются за пределы сердца, формируя «экстракардиальный миокард» [Hashizume et al., 1995; Nathan, Gloobe, 1970]. Кардиомиоциты торакальных (полых и легочных) вен образуют функциональную ткань – так называемые «миокардиальные рукава», которые могут простираются от устьев до дистальных участков вен. В постнатальном онтогенезе миокардиальная ткань полых и легочных вен развивается параллельно с кардиомиоцитами синоатриального узла (САУ), рабочим миокардом предсердий и желудочков. Однако электрофизиологические свойства кардиомиоцитов торакальных вен отличаются от таковых в рабочем и пейсмекерном миокарде и, вероятно, преобразуются в течение постнатального развития, как и свойства кардиомиоцитов формирующихся камер сердца.

В целом ряде исследований показано, что миокардиальные рукава полых и легочных вен биоэлектрически активны, способны проводить возбуждение и генерировать потенциалы действия (ПД). Ранее показано, что миокард торакальных вен обладает проаритмическими свойствами, и в последние два десятилетия его рассматривают в качестве основного источника биоэлектрической активности, инициирующей предсердные аритмии [Haissaguerre et al., 1998]. Аритмогенные свойства миокардиальных рукавов торакальных вен связывают со способностью этой ткани к генерации эктопической или, иначе, спонтанной активности, которая может быть усилена дисбалансом автономной нервной регуляции, действием системных факторов [Iwasaki et al., 2011].

Известно, что в 70-80% клинических случаев источником активности, служащей триггером фибрилляции предсердий у пациентов являются миокардиальные рукава легочных вен (ЛВ), в связи с чем их свойства хорошо изучены и широко описаны в клинических и фундаментальных работах [Chen et al., 1999; Haissaguerre et al., 1998]. В 20-30% случаев очаг активности, приводящий к аритмии, располагается не в миокарде ЛВ, а в других областях суправентрикулярного миокарда, в том числе и в миокардиальных рукавах полых вен (ПВ), однако их характеристики и электрофизиологические свойства практически не изучены [Enriquez et al., 2017; Lin et al., 2003; Mansour et al., 2002].

Проаритмические свойства миокардиальной ткани как легочных, так и полых вен могут быть связаны с нарушениями развития этой ткани в период формирования суправентрикулярной области сердца и обособления его основного пейсмекера – САУ. Известно, что клетки, составляющие миокардиальную ткань ПВ, кардиомиоциты САУ и правого предсердия, имеют общее происхождение и являются производными эмбриональной структуры – венозного синуса, миокард которого обладает пейсмекерными свойствами [Wessels, Sedmera, 2004]. В ходе эмбрионального и раннего постнатального развития «наследники» венозного синуса – кардиомиоциты САУ – в полной мере сохраняют способность спонтанно, ритмически генерировать потенциалы действия – т.е. сохраняют способность к автоматии. В то же время кардиомиоциты правого предсердия, происходящие из венозного синуса, теряют эту способность в ходе так называемого процесса «атриализации» [Sun et al., 2015], приобретая свойства типичного рабочего миокарда. Основываясь на данных современной эмбриологической физиологии, можно предположить, что миокардиальная ткань ПВ в ходе эмбрионального и постнатального онтогенеза так же претерпевает атриализацию. Однако, аритмогенность этой ткани указывает на то, что в полых венах этот

процесс не проходит таким образом, как в формирующемся рабочем миокарде правого предсердия.

Считается, что существенный вклад в возникновение и поддержание предсердных аритмий, связанную с эктопией в торакальных венах, вносит активность вегетативной нервной системы. Известно, что у человека особенно богато развита симпатическая иннервация миокардиальных рукавов торакальных вен. Показано, что кардиомиоциты торакальных вен экспрессируют α - и β -адренорецепторы [Lin et al., 2019; Patterson et al., 2005]. Тем не менее, неизвестно какой вклад в онтогенетическое преобразование биоэлектрических характеристик ПВ (т.е. в «атриализацию») вносит симпатическая иннервация.

Таким образом, на данный момент имеется крайне мало информации о свойствах и электрофизиологических характеристиках миокардиальной ткани именно полых вен, в том числе и на ранних этапах постнатального онтогенеза. Остаются не известными периоды онтогенеза, включающие моменты ремоделирования кардиомиоцитов полых вен. Так же не установлены факторы, управляющие и служащие триггерами потенциального преобразования свойств миокарда полых вен.

Первые упоминания о наличии кардиомиоцитов в стенке торакальных вен, а также гистологические исследования миокардиальных рукавов лёгочных и полых вен были проведены более столетия назад [Brunton, Fayrer, 1876; Stieda, 1877]. Еще в 1876 году Brunton и Fayrer продемонстрировали, что передняя и задняя полые вены кролика способны сокращаться самостоятельно в отсутствие сопряжения с предсердиями и желудочками [Brunton, Fayrer, 1876]. Тогда было предположено, что способность полых вен к сокращению несет определенную гемодинамическую функцию и, вероятно, предотвращает ретроградный ток крови во время систолы предсердий.

Механизмы сократимости и «автономной» активности полых вен оставались неизвестными вплоть до 1960-х годов, когда Arita et al. и Ito et al. впервые провели исследование электрофизиологических свойств ПВ млекопитающих [Arita et al., 1967; Ito et al., 1964]. В 1960-х годах было проведено не только феноменологическое описание свойств миокардиальной ткани стенки полых вен, но впервые продемонстрировано, что их активность может носить характер, свойственный патологическим состояниям, например – аритмиям. В 1967 Ito et al. показали, что в вено-синусовом соединении кролика возможны задержки и блоки проведения возбуждения в полый вене [Ito et al., 1967]. Это наблюдение согласуется с современными представлениями о природе предсердных аритмий, возникающих вследствие эктопической активности в торакальных венах.

Однако, интерес к изучению особенностей биоэлектрической активности торакальных вен значительно возрос только в конце 1990-х годов, в ходе первых хирургических процедур эндоскопического эндокардиального удаления аритмогенных участков миокарда – катетерной абляции. У пациентов, страдающих фибрилляцией предсердий (ФП), было обнаружено, что по мере приближения зоны абляции к устью легочной вены, частота фибриллярных разрядов, регистрируемых в предсердии, становились ниже, а при абляции миокардиальных рукавов вен фибрилляция прекращалась. В 1998 году в клиническом исследовании, проведенном доктором Haïssaguerre и коллегами, было показано, что очаги эктопического возбуждения, инициирующие некоторые типы ФП, преимущественно находятся в области миокардиальных рукавов ЛВ. В связи с вышесказанным, последние два десятилетия повышенное внимание исследователей уделено строению и функционированию миокардиальных рукавов ЛВ как источников предсердных аритмий. В настоящее время принято считать, что ФП и другие предсердные тахиаритмии могут быть инициированы

триггерными очагами возбуждения именно в миокарде различных торакальных вен [Haissaguerre et al., 1998].

В 1994 году Haïssaguerre et al. был описан клинический случай, в котором очаг, служащий источником пароксизмальной ФП, обнаруживался в месте соединения верхней полой вены и правого предсердия [Haissaguerre et al., 1994]. Позже был выявлен еще один случай фокальной ФП, при хирургическом лечении которой, разрушение электрической связи между миокардом полой вены и правым предсердием успешно устранило нарушения ритма [Ino et al., 2000]. В 2002 году было продемонстрировано, что при инвазивной терапии ФП абляция миокарда верхней полой вены приводит к реверсии синусового ритма, прекращению циркуляции фибрилляторных волн в правом предсердии, однако в самом изолированном миокарде полой вены эктопическая активность сохраняется [Ooie et al., 2002]. Таким образом, с начала 2000-х годов был опубликован ряд работ, подтверждающих, что источником инициации ФП может являться миокард полых вен. Результаты клинических работ последних десятилетий позволяют предположить, что эктопическая активность в миокардиальных рукавах полых вен может быть не только инициатором ФП, но и может служить фактором, ее поддерживающим.

При метаанализе данных, полученных в период с 2014 по 2019 года, установлено, что в 5-15% случаев не легочные, а полые вены являются источником эктопической активности, иницирующей ФП [Miyazaki et al., 2014; Philpott, 2019; Sharma et al., 2017]. Следует указать, что фундаментальных исследований, касающихся изучения электрофизиологии миокарда ПВ было проведено крайне мало. Кроме серии ранних феноменологических исследований 1960-х годов [Arita et al., 1967; Ito et al., 1967, 1964], в которых были зарегистрированы спонтанные ПД и эктопическая активность в полых венах кроликов и собак, в 2000-х годах было опубликовано лишь несколько работ, описывающих некоторые характеристики зрелых изолированных кардиомиоцитов ПВ собак. Так, в изолированных кардиомиоцитах ПВ собак были описаны пейсмекерные свойства [Chen et al., 2002], экспрессия белков щелевых контактов [Yeh et al., 2003], в тканевых препаратах были зарегистрированы потенциалы действия при холинергическом и адренергическом влиянии [Sicouri et al., 2012]. Помимо миокарда полых вен, проведено одно исследование электрофизиологических свойств миокардиальной ткани непарной вены, относящейся к системе полых вен [Ivanova, Kuzmin, 2017].

Таким образом, на настоящий момент имеются лишь некоторые представления о миокарде торакальных вен. Однако, в литературе отсутствует системная детальная информация об электрофизиологических свойствах миокардиальной ткани полых вен, преобразования этих свойств в ходе онтогенеза. Также, нет работ, направленных на исследование причин и механизмов аритмогенности полых вен – т.е. причин спонтанной активности, эктопии, а также причин становления аритмогенного фенотипа в постнатальной жизни.

В связи с вышесказанным, *цель данной работы* – изучить электрофизиологические особенности, а также выяснить возможные механизмы преобразования электрофизиологического фенотипа миокардиальной ткани полых вен в ходе постнатального онтогенеза.

В соответствии с целью в работе были поставлены следующие задачи:

1. Охарактеризовать изменения электрофизиологических свойств миокарда полых вен крысы в ходе постнатального онтогенеза;
2. Выявить эффекты адренергической стимуляции в миокардиальной ткани полых вен на разных стадиях постнатального онтогенеза;

3. Выявить особенности формирования симпатической иннервации в полых вен в ходе постнатального онтогенеза;
4. Определить роль симпатической иннервации, как фактора, влияющего на электрофизиологические свойства и автоматию полых вен в ходе постнатального онтогенеза;
5. Установить особенности экспрессии и распределения адренорецепторов α_{1A} -типа в кардиомиоцитах полых вен у контрольных и симпатэктомированных животных на разных стадиях постнатального онтогенеза;
6. Выяснить особенности распределения и роль ионных каналов HCN4 и Kir2.2, транскрипционного регулятора Nkx2-5 в контроле предрасположенности полых вен к автоматии в ходе постнатального онтогенеза, используя метод химической симпатэктомии.

Научная новизна исследования.

1. В данной работе впервые охарактеризованы электрофизиологические свойства миокарда ПВ, такие как ПД, мембранный потенциал покоя, скорость нарастания переднего фронта ПД, скорость распространения волны возбуждения последовательно на разных этапах постнатального онтогенеза;
2. Впервые в работе продемонстрировано ослабление предрасположенности к автоматии миокарда ПВ в ходе онтогенеза;
3. Впервые в работе продемонстрирована способность миокарда ПВ к генерации спонтанной активности при избирательной активации адренергических рецепторов α - и β -типа, а также впервые выявлены изменения адренергических ответов в онтогенезе;
4. Впервые исследовано формирование симпатической иннервации ПВ в постнатальном онтогенезе;
5. Впервые выявлены особенности электрических контактов между кардиомиоцитами неонатального и зрелого миокарда ПВ;
6. В данной работе впервые изучен паттерн экспрессии и клеточной локализации α_{1A} -адренорецепторов (α_{1A} -АР) в миокарде ПВ на разных этапах онтогенеза, изучена связь клеточной локализации α_{1A} -АР с развитием симпатических нервных волокон в стенке ПВ;
7. Впервые исследована связь постнатально формирующейся симпатической иннервации с изменением электрофизиологического фенотипа миокардиальной ткани ПВ. Установлено, что развитие симпатической иннервации подавляет «пейсмекерные» свойства в миокарде ПВ;
8. В работе впервые охарактеризована экспрессия ионных каналов HCN4 пейсмекерного тока I_f , колокализация белков каналов HCN4 и маркера зрелых рабочих кардиомиоцитов – кавеолина 3 у неонатальных и взрослых животных;
9. Впервые проведена оценка экспрессии каналов реполяризирующего тока аномального выпрямления Kir2.2, а также транскрипционного фактора Nkx2-5 в неонатальном и зрелом миокарде ПВ;
10. В работе впервые изучена роль симпатической иннервации, как фактора онтогенетического контроля экспрессии HCN4, Kir2.2, Nkx2-5 в миокарде ПВ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Данная работа обладает как научной, так и практической значимостью. Работа имеет отношение к такой фундаментальной проблеме, как формирование основного ритмоводителя сердца у млекопитающих. Подробное изучение преобразования биоэлектрических свойств миокарда ПВ в онтогенезе вносит вклад в формирование представления о функциональном созревании и локализации пейсмекерной области сердца. Работа расширяет представление о возможных путях и

механизмах трансформации структур, обладающих общим эмбриональным происхождением и свойствами: миокардиальной ткани ПВ, синоатриального узла (ритмоводителя сердца) и рабочего миокарда правого предсердия. Также, в работе освещены аспекты, касающиеся роли системных факторов, таких как симпатическая иннервация, в локальном функциональном профилировании участков миокардиальной ткани, в частности миокарда полых вен.

С практической точки зрения, работа расширяет имеющиеся знания о механизмах формирования эктопической фокальной активности в полых венах. В работе рассмотрена одна из возможных причин проаритмических явлений в полых венах – неполная атриализация миокарда, которая приводит к манифестации фетального фенотипа в онтогенезе. Результаты данной работы способствуют поиску ключевых молекулярных мишеней, определяющих эктопическую активность в ПВ, а также способов неинвазивной терапии предсердных аритмий.

Методология и методы исследования. В данной работе были использованы как классические электрофизиологические подходы, так и набор современных молекулярно-биологических и иммуногистохимических методов. А именно, характеристики миокарда полых вен изучали на выделенных изолированных многоклеточных препаратах правой поллой вены крысы с использованием стандартной микроэлектродной техники, метода оптического картирования, методов иммуногистохимического и гистохимического окрашивания, методов флуоресцентной и конфокальной микроскопии, а также метода ПЦР в реальном времени. Кроме того, в работе были проведены как острые эксперименты, так и хроническая серия экспериментов по химической неонатальной симпатэктомии.

Объект и предмет исследования. Объект исследования – самцы крыс стока Wistar на разных стадиях постнатального онтогенеза. Предмет исследования – миокардиальная ткань передней правой поллой вены. При работе с животными были соблюдены требования, сформулированные в Директиве Совета Европейского сообщества 2010/63/EU.

Положения, выносимые на защиту:

1. В ходе постнатального онтогенеза миокард полых вен теряет пейсмекерные свойства и ко зрелому возрасту частично приобретает характеристики рабочего миокарда предсердий.
2. Атриализация в миокарде полых вен происходит не полностью: зрелый миокард полых вен способен генерировать спонтанную биоэлектрическую активность при адренергической стимуляции.
3. В ходе постнатального онтогенеза в миокарде полых вен происходит перераспределение локализации α_{1A} -адренорецепторов (α_{1A} -АР): у неонатальных животных α_{1A} -АР располагаются во внешней мембране кардиомиоцитов, тогда как у взрослых животных – преимущественно на ядерной мембране.
4. В зрелом миокарде полых вен как в проксимальных так и в дистальных участках обнаруживаются каналы HCN4 пейсмекерного тока I_f в виде изолированных кластеров, образуя мозаичную структуру миокарда. В зрелом возрасте HCN4 колокализуются со структурным белком кавеол.
5. Формирование симпатической иннервации влияет на процесс преобразования электрофизиологических свойств миокарда полых вен. В отсутствие формирования симпатической иннервации миокард полых вен сохраняет способность к генерации спонтанной активности в зрелом состоянии.

6. Влияние развития симпатической иннервации на способность миокарда полых вен к автоматии осуществляется путем подавления экспрессии каналов HCN4.

Публикации. По результатам работы опубликовано 23 печатные работы: 11 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science или Scopus, и 12 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Апробация материалов диссертации. Результаты данной диссертационной работы были представлены на Scandinavian Physiological Society Annual Meeting (Рейкьявик, Исландия, 9-11 августа 2019), 41nd, 42nd, 43rd European Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology Meeting (Лиссабон, Португалия, 17-19 марта 2019, Эссен, Германия, 15-17 июня 2018, Вена, Австрия, 17-19 июня 2017), 38th World Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS) (Рио-де-Жанейро, Бразилия, 1-5 августа 2017), на Второй и Третьей молодежной школе-конференции "Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций" (Сентябрь 2017, Сентябрь 2019), на конференции «Актуальные исследования висцеральных систем в биологии и медицине» (Астрахань, Россия, 11-12 декабря 2018), на XXIII съезде Физиологического общества им. И. П. Павлова (Воронеж, Россия, 18-23 сентября 2017), на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016» (Москва, Россия, 11-15 апреля 2016), на VI Всероссийской с международным участием школе-конференции по физиологии кровообращения (Москва, Россия, 2-5 февраля 2016).

Диссертационная работа апробирована на заседании кафедры человека и животных Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова 19 сентября 2022 года.

Личный вклад автора. Автор работы, Иванова А.Д., лично принимала участие в каждом эксперименте, на стадии планирования и постановки эксперимента, анализа полученных результатов. Ивановой А.Д. был проведен самостоятельный анализ, обобщение и интерпретация результатов экспериментов, подготовка текста статей, тезисов и данной работы, а также представление результатов работы на международных и всероссийских конференциях. Вклад автора в (в долях) в научных трудах составляет: в работе «Attenuation of inward rectifier potassium current contributes to the α 1-adrenergic receptor-induced proarrhythmicity in the caval vein myocardium» – 0.7, в работе «Electrophysiological characteristics of the rat azygos vein under electrical pacing and adrenergic stimulation» – 0.7, в работе «The susceptibility of the rat pulmonary and caval vein myocardium to the catecholamine-induced ectopy changes oppositely in postnatal development» – 0.4, в работе «Rat caval vein myocardium undergoes changes in conduction characteristics during postnatal ontogenesis» – 0.6.

Степень достоверности результатов исследований. Все представленные в работе результаты выполнены с использованием широко известных общепринятых методик и являются воспроизводимыми. Результаты работы являются статистически достоверными. Разделы работы «Обзор литературы» и «Обсуждение» подготовлены с использованием актуальных современных и доступных источников.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, изложение результатов работы и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 163 страницах, содержит 50 рисунков и 15 таблиц. Список литературы включает 304 источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. В работе использовали самцов крыс стока Wistar, полученных из питомника ФГБУ «НЦ Биомедицинских технологий» ФМБА. Животных

содержали в помещении для содержания лабораторных животных, в режиме двенадцатичасового светового дня, с доступом к корму и воде *ad libitum*. В экспериментах использовали крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза: неонатальные – 5-7 дней (P7); ювенильные – 14 дней (P14) и 21 день (P21); и взрослые – 56-60 дней (P60). Нулевым днем постнатального развития (P0) считали день родов.

Химическая симпатэктомия. Хроническую неонатальную химическую симпатэктомию проводили при помощи гуанетидина сульфата (MedChemExpress, США). Гуанетидин растворяли в 0.9% физиологическом растворе и вводили подкожно в межлопаточную область 6 раз в неделю в дозе 25 мг/кг с 1 по 14 дни жизни и в дозе 50 мг/кг с 15 по 56 дни. Контрольной группе животных вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме.

Выделение препаратов передней правой полой вены и левого предсердия. Эксперименты выполнены с использованием многоклеточных препаратов передней правой полой вены (ППВ) и левого предсердия (ЛП). Перед проведением хирургических процедур животным проводили анестезию изофлураном (2-3%), декапитировали. Вскрывали грудную клетку, делали надрез в области границы между правым желудочком и правым предсердием (ПП), отсекая ПП и ППВ от сердца. Далее делали разрез на дистальном участке вены, извлекали препарат ПП-ППВ и помещали его в камеру с постоянной перфузией физиологическим раствором Тироде стандартного состава при 37°C. Далее, делали продольный разрез вдоль ППВ, раскрывали препарат и фиксировали при помощи тонких игл миокардиальной стороной вверх. В электрофизиологических экспериментах после записи контрольных характеристик делали разрез дистальнее области синоатриального узла (САУ) – над артерией САУ, изолируя таким образом миокард ППВ от пейсмекера и предсердного миокарда.

Регистрация потенциалов действия и потенциала покоя. Биоэлектрическую активность в изолированных миокардиальных препаратах регистрировали при помощи стандартной микроэлектродной техники. Отведение потенциалов действия (ПД) осуществляли при помощи стеклянных микроэлектродов (сопротивление 10-30 МОм, изготавливали при помощи пуллера Sutter Instrument, США). Сигнал от микроэлектрода поступал на усилитель (А-М system 1600, США), далее, через аналогово-цифровой преобразователь (АЦП E-154, L-card, Россия), сигнал поступал на компьютер, где был записан при помощи программы «Power Graph 3.3.8» («ДИСофт», Россия). Анализ таких параметров как уровень мембранного потенциала покоя (МПП), частота следования спонтанных потенциалов действия (ПД), максимальная скорость нарастания переднего фронта ПД (dv/dt_{max}) проводили в программе «Power Graph 3.3.8». Для анализа ПД использовали программу MiniAnalysis (Synaptosoft, США), с помощью которой измеряли длительность ПД на уровне 50% и 90% реполяризации (ДПД₅₀, ДПД₉₀).

Оптическое картирование. При помощи метода оптического картирования в миокардиальной ткани ППВ визуализировали последовательное распространение деполяризации с использованием потенциалчувствительного красителя di-4-ANEPSPS. Ткань ППВ насыщали в течение 30 мин перфузией раствора Тироде, содержащим 5 μ M di-4-ANNEPS («Sigma-Aldrich», США), для подавления механической активности использовали разбавитель электромеханического сопряжения BDM (2,3-butanedion monoxime, «Sigma-Aldrich», США, 1 г/л). Флюоресценцию di-4-ANEPSPS возбуждали светодиодами 520 нм, а регистрировали с помощью высокочувствительной фотодиодной (PDA) матрицы H469V-012 (WuTech H-469V, Gaithersburg, MD, USA), включенной в состав оптико-электронной установки. Для разделения возбуждающего света и эмиссии использовали красный фильтр

(пропускание > 610 нм), помещенный на входе фотодиодной матрицы. Флуоресценцию препаратов регистрировали с интервалами 0.61 мс в течение 1000 мс, таким образом получали записи, включающие не менее трех циклов возбуждения препарата. Сигналы от фотодиодов матрицы поступали на АЦП, регистрацию и обработку сигнала осуществляли при помощи программы Cadrioplex (RedShirtImaging, США). В результате прослеживания изменения уровня флуоресценции во времени по каждому фотодиоду матрицы получали оптические сигналы, соответствующие ПД. На основе оптических сигналов строили изохронные карты, отражающие моменты одновременной активации картируемой области.

Визуализация симпатических волокон в препаратах. Для определения степени развития симпатической иннервации в стенке ППВ контрольных животных разных возрастов, а также для определения эффективности химической симпатэктомии, проводили гистохимическое окрашивание препаратов при помощи глиоксильной кислоты. При окрашивании многоклеточных препаратов, флуоресценция комплексов глиоксильной кислоты с катехоламинами отображает расположение и распределение функционально активных симпатических волокон в ткани [Lindvall, Björklund, 1974]. Препараты ППВ (контрольные животные) и ЛП (симпатэктомированные животные) инкубировали в растворе 2% глиоксильной кислоты в фосфатно-солевом буфере с добавлением сахарозы (10%), рН 7.4. Далее, удаляли раствор с поверхности препаратов; препараты расправляли на предметном стекле эндокардиальной стороной вверх таким образом, чтобы участки миокардиальной ткани на стекле имели минимальную толщину. Расправленные препараты сушили в течение 30 минут под струей теплого воздуха, после, выдерживали препараты в течение 5 минут в сушильном шкафу при температуре 100°C. Высушенный препарат немедленно покрывали вазелиновым маслом и фиксировали под покровным стеклом.

Иммуногистохимическое окрашивание препаратов ППВ. Иммуногистохимическое окрашивание проводили на поперечных и сагиттальных криосрезях выделенных препаратов, включающих участок ППВ (5-8 мм от устья правого предсердия), область САУ, а также апикальную область ушка правого предсердия. Использовали первичные моно- и поликлональные антитела к каналам пейсмекерного тока HCN4, белку кавеол Caveolin 3 (Cav3), α_{1A} -адренорецепторам (α_{1A} -AR), коннексинам 43 (Cx43), а также к дистрофину (Dystrophin). Использовали вторичные антитела с конъюгатами Alexa488 и Alexa568 (Thermo Fisher Scientific). Криосрезы фиксировали в 4% параформальдегиде (Sigma Aldrich, США) в фосфатно-солевом буфере в течение 30 минут, после чего трижды промывали по 10 минут фосфатно-солевым буфером. Для пермебиализации срезы инкубировали в 0.1% Triton-x100 (Sigma Aldrich, США) в течение 30 минут, после чего трижды промывали по 10 минут фосфатно-солевым буфером. Далее, для блокировки неспецифических сайтов связывания срезы инкубировали в 5% козьей сыворотке (Sigma-Aldrich, #G9023) в фосфатно-солевом буфере в течение 60 минут. После этого срезы инкубировали с первичными антителами к целевым белкам в соответствующих разведениях в течение ночи при 4°C. На следующее утро срезы трижды промывали по 10 минут фосфатно-солевым буфером и инкубировали с соответствующими вторичными антителами и ядерным красителем DAPI (1:2000, Sigma-Aldrich, #D9542) в течение 120 минут, после чего трижды промывали по 10 минут фосфатно-солевым буфером. Подготовленные срезы покрывали средой Vectashield Antifade Mounting Medium H-1000-10 (Vector Laboratories, США) и фиксировали под покровным стеклом.

Гистохимическое окрашивание по Массону (трихром Массона) миокардиальной ткани ППВ контрольных зрелого возраста. Для гистохимического окрашивания по

Массону использовали криосрезы, полученные по методике, описанной в пункте III.5.1. Криосрезы фиксировали в растворе Боуина в течение ночи, после промывали трижды по 10 минут 70% этанолом. Далее инкубировали в течение 10 минут в целестиновом синем, после чего промывали дистиллированной водой в течение 15 минут. Далее инкубировали в гематоксилине в течение 5 минут, после чего промывали дистиллированной водой в течение 15 минут. Далее инкубировали в кислом фуксине в течение пяти минут, после чего промывали дистиллированной водой в течение 30 минут. Далее, инкубировали в фосфомолибденовой кислоте в течение пяти минут, после чего препараты просушивали. Далее, инкубировали в метиленовом зеленом в течение 1 минуты, после чего промывали дистиллированной водой в течение 20 минут. Далее препараты дегидратировали, проводили через серию спиртов: 70% этанол в течение 1 минуты, 90% этанол в течение одной минуты, 100% этанол в течение двух минут дважды. Гистологические срезы визуализировали с помощью светового микроскопа (Zeiss LSM5) и камеры AxioCam (Zeiss), обрабатывали с помощью программного обеспечения Axiovision (Zeiss).

Получение, обработка и анализ изображений. Для получения изображений флуоресцирующих комплексов катехоламинов, отображающих симпатические нервные окончания в ткани ППВ или ЛП, а также флуоресценции иммуногистохимически окрашенных срезов ППВ, использовали конфокальный микроскоп AxioObserver LSM 700, оборудованный цифровой камерой Plan-Apochromat (разрешение 2048×2048 пикселей, 8 бит/пиксель) (Zeiss, Германия) с объективом х20. Флуоресценцию комплексов катехоламинов с глиоксиловой кислотой регистрировали в диапазоне 405-480 нм длины волны, флуоресценцию возбуждали диодным лазером длиной волны 405 нм. Конфокальные изображения получали в стэковом режиме – 25 стеков толщиной 1 мкм. Полученные изображения обрабатывали в программе ImageJ 1.53q, [Schindelin et al., 2012; Schneider et al., 2012]. Для подготовки изображения к анализу использовали плагины Bio-Formats [Linkert et al., 2010], Diffraction PSF 3D и Iterative Deconvolve 3D [Dougherty, 2005]. При помощи плагина Skeletonize3D (<https://imagej.net/plugins/skeletonize3d>) проводили анализ флуоресцентных волокон. На изображениях определяли площадь и длину волокон, пропорциональную плотности симпатической иннервации [Sathyanesan et al., 2012]. Всего в расчетах использовали n изображений, полученных от 3х животных в каждой группе.

Для получения изображений иммуногистохимически окрашенных срезов ППВ флуоресценцию Alexa 488 и Alexa 568 возбуждали диодным лазером длиной волны 488 и 561 нм, соответственно, регистрировали флуоресценцию в диапазоне 510-574 нм и 574-613 нм, соответственно; флуоресценцию ядерного красителя DAPI возбуждали длиной волны 405 нм, регистрировали флуоресценцию в диапазоне 430-506 нм. Конфокальные изображения получали в стэковом режиме – 18-20 стеков толщиной 0.8 мкм. Полученные изображения обрабатывали в программе ImageJ 1.53q. Для подготовки изображения к анализу использовали плагины Bio-Formats [Linkert et al., 2010]. Для подсчета площади флуоресценции использовали инструменты программы ImageJ 1.53q (Analyze Particles) – рассчитывали отношение флуоресцентных частиц к площади стенки ППВ на изображении. Для каждого анализируемого белка в расчетах использовали n изображений, полученных от 3х животных в каждой группе.

Оценка уровня целевых мРНК в миокарде ППВ методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Тотальную РНК выделяли из препаратов ППВ и ЛП, образцы помещали в реагент ExtractRNA (500 мкл, Евроген, Россия), гомогенизировали с использованием стерильных пестиков Axugen Scientific, Inc, США). Далее, тотальную

РНК очищали при помощи хлороформа (200 мкл, центрифугирование 2 мин. при RT, 12000 g), отбирали супернатант. Тотальную РНК осаждали изопропанолом (3/4 от объема супернатанта, центрифугирование 30 мин. при 4°C, 20000 g). Осажденную РНК растворяли в 20 мкл деионизированной воды, свободной от нуклеаз (Евроген, Россия). Концентрацию и качество РНК определяли при помощи NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США): измеряли поглощение при 260 нм, а также измеряли соотношение 260/230 и 260/280 нм. Далее, 400 нг РНК обрабатывали ДНКазой RNase-free DNase I kit (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя, после чего 200 нг РНК использовали в реакции обратной транскрипции с использованием ревертазы MMLV (MMLV RT kit, Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией производителя, суммарный объем реакции – 20 мкл. Полученную кДНК разбавляли до 40 мкл. Реакцию ПЦР в реальном времени осуществляли с использованием qPCRmix-HS SYBR kit (Евроген, Россия) на амплификаторе CFX-96 real-time PCR detection system (Bio-Rad, США). Для каждой реакции с SYBR Green производили анализ кривых плавления, пороговые числа циклов ПЦР были определены при помощи программы LinRegPCR version 2020.2. Все образцы анализировали в двух повторностях, для расчетов использовали среднее пороговое число циклов.

В качестве гена «домашнего хозяйства» использовали Rplp0 (ribosomal protein lateral stalk subunit P0). Экспрессия rplp0 была стабильна и не отличалась среди образцов. В работе определяли относительный уровень мРНК следующих генов: Hcn4 (hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 4), кодирующий канал HCN4 пейсмейкерного тока I_f ; Adrala (adrenoceptor alpha 1A), кодирующий адренорецептор α_{1A} ; Kcnj12 (potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12), кодирующие каналы тока аномального выпрямления I_{K1} – Kir2.2; Nkx2-5 (NK2 homeobox 5) – «камерообразующий» транскрипционный фактор. Для определения относительного уровня мРНК использовали $\Delta\Delta C_t$ метод с учетом эффективности праймеров. Эффективность праймеров была определена с использованием программы LinRegPCR version 2020.2, которая позволяет учитывать эффективность каждой отдельной реакции в ходе постановки ПЦР в реальном времени.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных осуществляли при помощи программы GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Данные в работе представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Количество отдельных измерений (n) указаны в рисунках под графиками, либо отображены отдельными точками на графиках. Все значения в выборках проверяли на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. Сравнение параметров между различными группами осуществляли с использованием непарного t-теста, однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (с апостериорным тестом на множественные сравнения Даннета или Тьюки), либо двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA (с апостериорным тестом на множественные сравнения Шидака). Р-уровни значимости указаны на графиках.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Электрофизиологические характеристики миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза

В базальных условиях электрически вызванные ПД в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс обладали характеристиками ПД рабочего миокарда предсердий: имели высокую скорость нарастания переднего фронта ПД и стабильный уровень максимальной диастолической реполяризации (Рис. 1А). Длительность ПД на уровне 50% реполяризации (ДПД₅₀) в группе Р60 была значительно меньше по сравнению с группой Р7 ($p=0.0059$),

однако, на уровне 90% реполяризации (ДПД₉₀) длительность ПД не отличалась среди разных возрастных групп (Рис. 1Б).

Мембранный потенциал покоя в миокардиальной ткани ППВ не отличался среди разных возрастов при электрической стимуляции препаратов (Рис. 2А). Прекращение электрической стимуляции препаратов приводило к значительной деполяризации МПП во всех возрастных группах. Степень спонтанной деполяризации не различалась среди разных возрастных групп. Максимальная скорость нарастания переднего фронта ПД (dv/dt_{max}) различалась в препаратах ППВ крыс разных возрастов. dv/dt_{max} увеличивалась с возрастом животных, наибольшее значение dv/dt_{max} мы наблюдали в препаратах ППВ взрослых крыс. dv/dt_{max} составляла 127.2 ± 29.4 (n=9), 158.7 ± 64.3 (n=12), 183.5 ± 57.3 (n=9) и 193.6 ± 45.2 (n=18) В/с в группах P7, P14, P21 и P60, соответственно (Рис. 2Б).

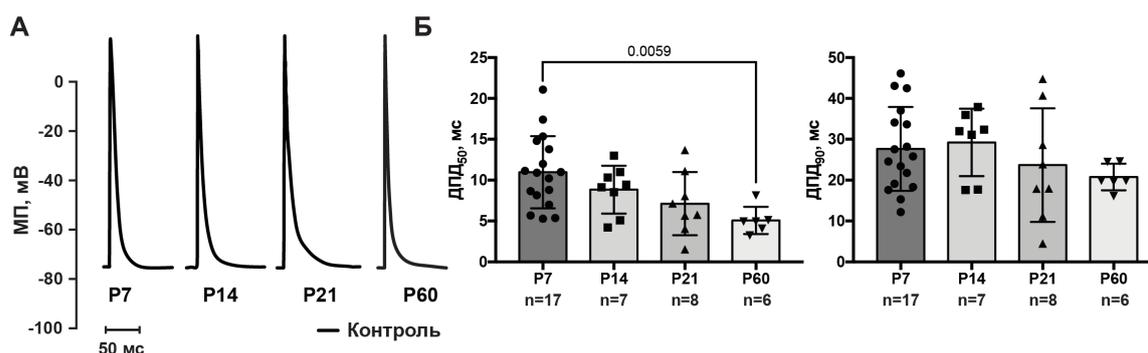


Рисунок 1. Электрически вызванные ПД в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс (P7-P60). А – репрезентативные примеры электрически вызванных ПД. МП – мембранный потенциал. Б – длительность ПД на уровне 50% и 90% реполяризации (ДПД₅₀ и ДПД₉₀). (Однофакторный ANOVA, поправка Даннета)

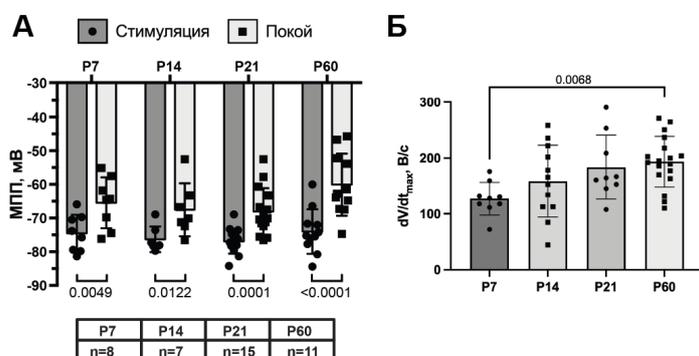


Рисунок 2. А – мембранный потенциал покоя (МПП) в миокарде ППВ контрольных крыс (P7-P60) при электрической стимуляции и в состоянии покоя. (Двухфакторный ANOVA, поправка Шидака) .Б – dv/dt_{max} в миокарде ППВ контрольных крыс (P7-P60) при электрической стимуляции. (Однофакторный ANOVA, поправка Даннета)

Спонтанная активность в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза

В части экспериментов в изолированных препаратах ППВ контрольных крыс в отсутствие электрической стимуляции была зарегистрирована эктопическая спонтанная биоэлектрическая активность. Наибольшее количество случаев возникновения спонтанной автоматии наблюдали в группе неонатальных крыс, способность к проявлению спонтанной биоэлектрической активности снижалась по мере увеличения возраста (Рис. 3). Спонтанные потенциалы действия (СПД) наблюдали в 35% (9 из 25) препаратов в группе P7; в 18% (2 из 11) в P14 и в 25% (2 из 8) в P21. В группе взрослых животных P60 не наблюдали СПД (0 из 11) (Рис. 5А). Спонтанные ПД в группе P7 имели форму пейсмекер-подобных ПД: обладали медленным фронтом нарастания и фазой медленной диастолической деполяризации (МДД). Частота возникновения СПД в базальных условиях в отсутствие электрической

стимуляции препаратов ППВ была ниже по сравнению с частотой возникновения ПД, зарегистрированных до изоляции препарата ППВ от САУ (частота САУ) (Рис.3Г).

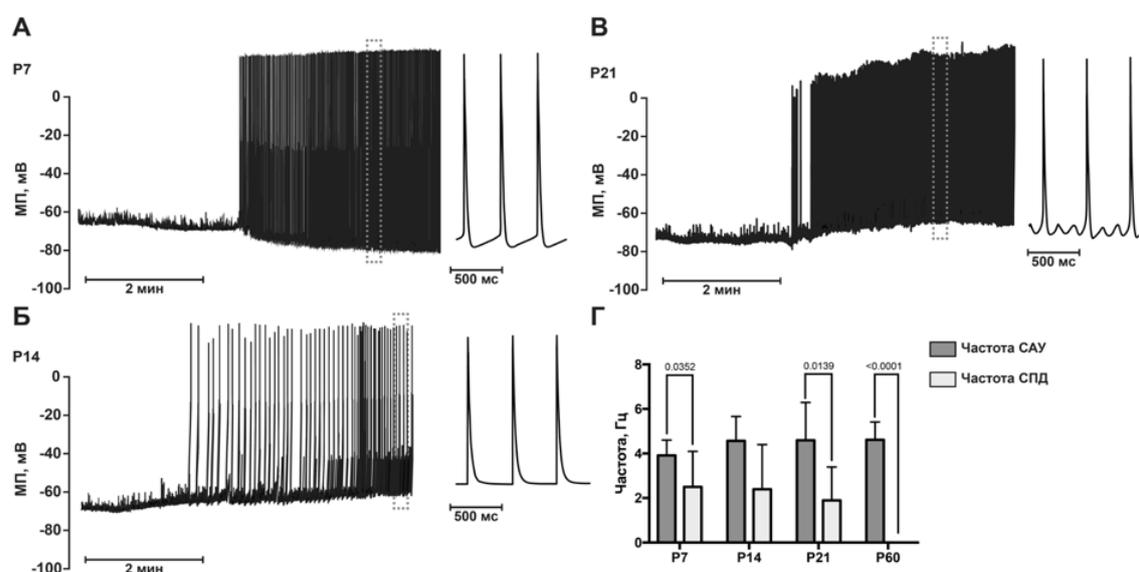


Рисунок 3. Спонтанная эктопическая активность в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза в базальных условиях. А-В – репрезентативные примеры спонтанной активности и отдельных СПД в базальных условиях и в отсутствие электрической стимуляции в препаратах ППВ контрольных крыс возраста 7, 14 и 21 дней (P7, P14 и P21). Примеры СПД справа были зарегистрированы в области записи, обозначенной пунктирными прямоугольниками. Г – частота возникновения ПД, зарегистрированных до изоляции препарата ППВ от САУ (частота САУ) и частота возникновения СПД в миокарде ППВ контрольных крыс в базальных условиях в отсутствие электрической стимуляции препаратов. (Двухфакторный ANOVA, поправка Шидека.)

Спонтанная активность в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза при адренергической стимуляции

Норадреналин (НА, 10 мкМ), агонист α - и β -адренорецепторов (α - и β -АР), индуцировал возникновение СПД в препаратах ППВ контрольных животных всех возрастов (P7-P60, Рис.4). Способность НА индуцировать ПД в миокарде ППВ значительно снижалась по мере увеличения возраста животного: НА-индуцированные СПД были зарегистрированы в 100% случаев в группе P7 (11 из 11), в 78% в группе P14 (7 из 9), в 50% в группе P21 (3 из 6) и в 27% случаев в группе P60 (3 из 11) (Рис.5Б). При действии НА в препаратах ППВ наблюдали СПД различного характера: пейсмекер-подобные с фазой МДД, и ПД, не обладающие фазой МДД (Рис.4).

Изопротеренол (ИЗО, 10 мкМ), агонист β -АР, индуцировал возникновение СПД в препаратах ППВ контрольных животных в виде перманентно следующих или «залпов» СПД в 43% (3 из 7), 17% (1 из 6), 33% (2 из 6) и 45% (5 из 11) в группах P7, P14, P21 и P60, соответственно. Способность ИЗО индуцировать спонтанную активность в миокарде ППВ контрольных животных в группе взрослых животных (P60) была на уровне таковой у неонатальных животных (Рис.5В). Индуцированные изопротеренолом СПД преимущественно не обладали фазой МДД.

Фенилэфрин (ФЭ, 10 мкМ), агонист α 1-АР, индуцировал возникновение СПД в 100% (8 из 8), 67% (4 из 6), 33% (2 из 6) и в 13% (1 из 8) случаев в группах P7, P14, P21 и

P60, соответственно (Рис. 5Г). При действии ФЭ регистрировали пейсмеркер-подобные СПД, обладающие фазой, так и СПД без фазы спонтанной деполяризации.

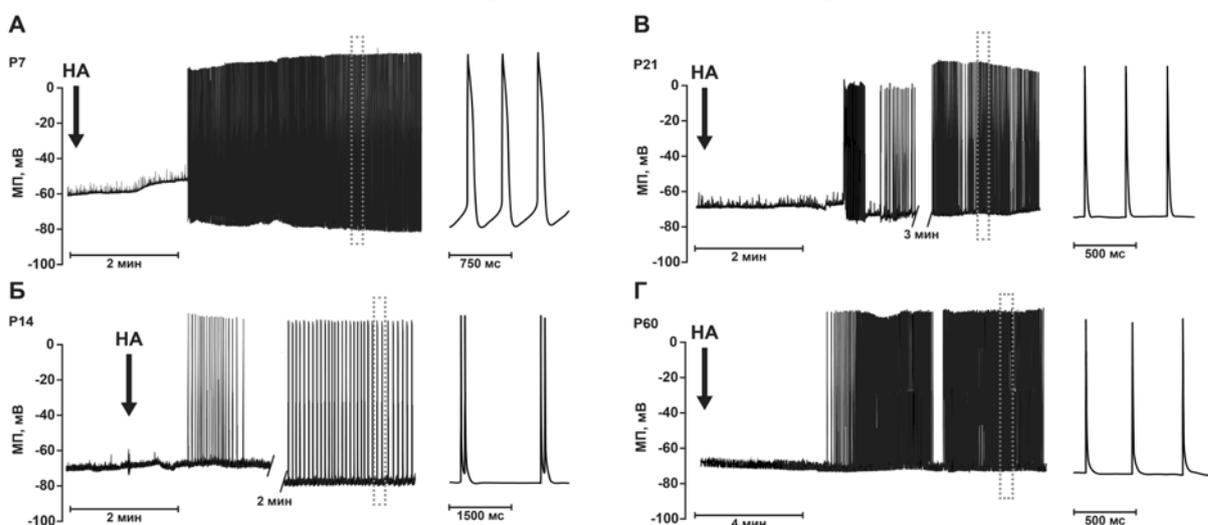


Рисунок 4. Спонтанная эктопическая активность в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс при действии норадреналина (НА, 10 мкМ) в отсутствие электрической стимуляции (P7–P60). Примеры СПД справа были зарегистрированы в области записи, обозначенной пунктирными прямоугольниками.

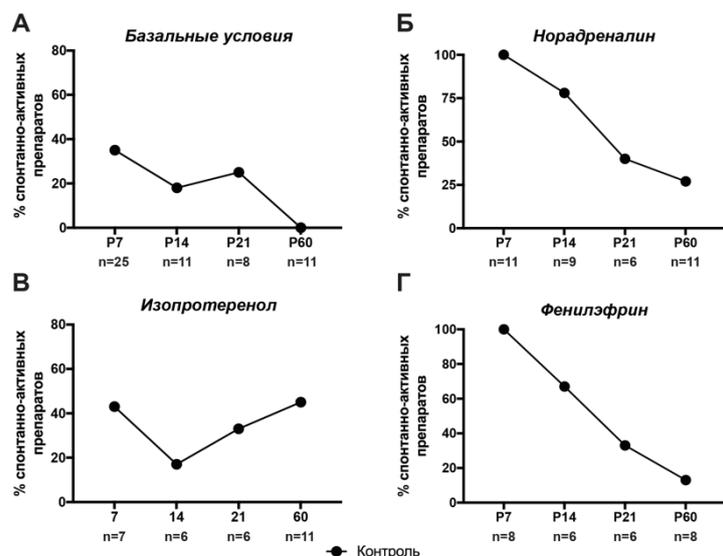


Рисунок 5. Процентное соотношение количества спонтанно активных препаратов ППВ контрольных крыс в различных условиях на разных стадиях постнатального онтогенеза (группы P7–P60). Суммарное количество препаратов в каждой группе указано на графике.

Электрофизиологические характеристики миокардиальной ткани ППВ симпатэктомированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза

Как и в группе контрольных животных, в базальных условиях электрически вызванные ПД в миокарде ППВ симпатэктомированных крыс обладали характеристиками ПД рабочего миокарда предсердий: имели высокую скорость нарастания переднего фронта ПД и стабильный уровень максимальной диастолической реполяризации (Рис. 6А). Также, как и в группе контрольных животных, длительность электрически вызванных ПД в миокарде ППВ симпатэктомированных крыс снижалась на уровне реполяризации 50% по мере увеличения возраста животных. Однако, снижение ДПД₅₀ в группе симпатэктомированных животных происходило медленнее во времени, и в отличие от контрольной группы животных, и к 14 дню жизни сохранялась на исходном уровне (P14: 8.84 ± 2.93 (n=8, контроль) против 15.04 ± 8.94 (n=8, симпатэктомия), $p=0.0247$, Рис. 6Б). Также, ДПД₉₀ в группе

симпатэктомированных животных значительно различалось между крысами возраста 7 и 60 дней: 33.9 ± 4.8 мс ($n=9$) против 17.8 ± 6.5 ($n=6$), $p=0.0165$, соответственно (Рис. 6Б).

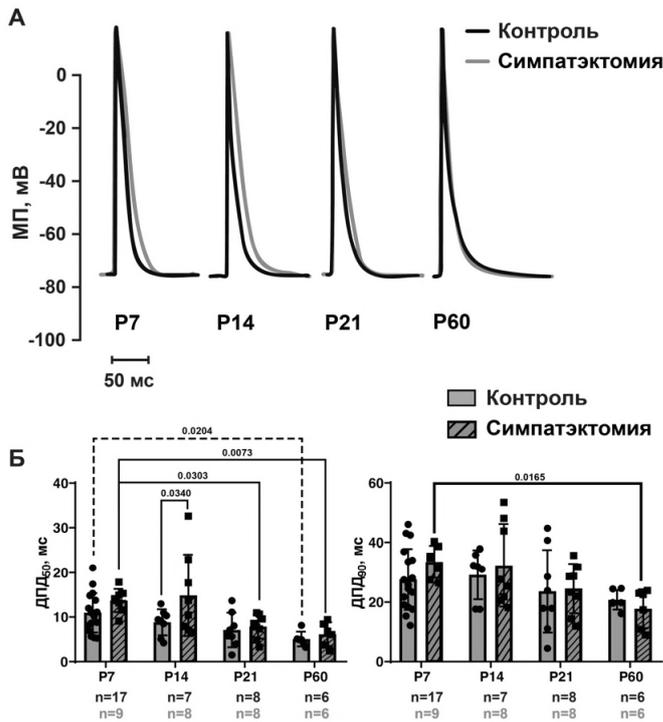
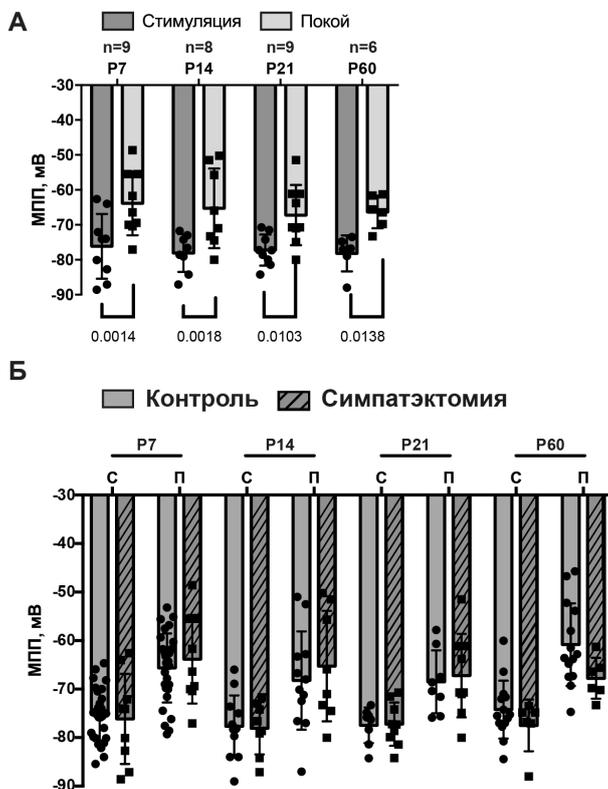


Рисунок 6. Электрически вызванные ПД в миокарде ППВ контрольных и симпатэктомированных крыс (P7-P60). А – репрезентативные примеры электрически вызванных ПД. МП – мембранный потенциал. Б – длительность ПД на уровне 50% и 90% реполяризации (ДПД₅₀ и ДПД₉₀). (Двухфакторный ANOVA, поправка Шидака.)

Аналогично контрольной группе, МПП в миокардиальной ткани ППВ симпатэктомированных крыс не различался среди разных возрастов при электрической стимуляции препаратов. Также, как и в контрольной группе, прекращение электрической стимуляции препаратов приводило к значительной деполяризации МПП во всех возрастных группах (Рис. 7А). Степень спонтанной деполяризации не различалась среди разных возрастных групп и была сходной с таковой в контрольной группе (Рис. 7Б).

Максимальная скорость нарастания переднего фронта ПД (dv/dt_{max}) была сходной в препаратах ППВ симпатэктомированных крыс разных возрастов (P7-P60) и значимо не различалась по сравнению со значениями



в препаратах ППВ контрольной группы ($p>0.05$). В отличие от контрольной группы животных, значимого различия в dv/dt_{max} между разными возрастными группами у симпатэктомированных крыс обнаружено не было.

Рисунок 7. Мембранный потенциал покоя (МПП) в миокардиальной ткани ППВ контрольных и симпатэктомированных крыс (P7-P60) при электрической стимуляции и в состоянии покоя. А – МПП в миокарде ППВ симпатэктомированных крыс. (Двухфакторный ANOVA, поправка Шидака. Б – МПП контрольных и симпатэктомированных крыс. С – стимуляция, П – покой.

Спонтанная активность в миокардиальной ткани ППВ симпатэктомированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза

Симпатическая денервация оказала влияние на способность миокардиальной ткани ППВ крыс к генерации спонтанной активности: в то время как у контрольных животных способность миокарда ППВ генерировать СПД снижалась в ходе постнатального развития, у симпатэктомированных животных количество случаев возникновения спонтанной активности оставалось на высоком уровне в группе взрослых животных (Рис.8). У симпатэктомированных крыс СПД наблюдали в 75% (6 из 8) препаратов в группе P7; в 50% (4 из 8) в P14, в 25% (2 из 8) в P21 и в 67% (4 из 6) в P60 (Рис.9А).

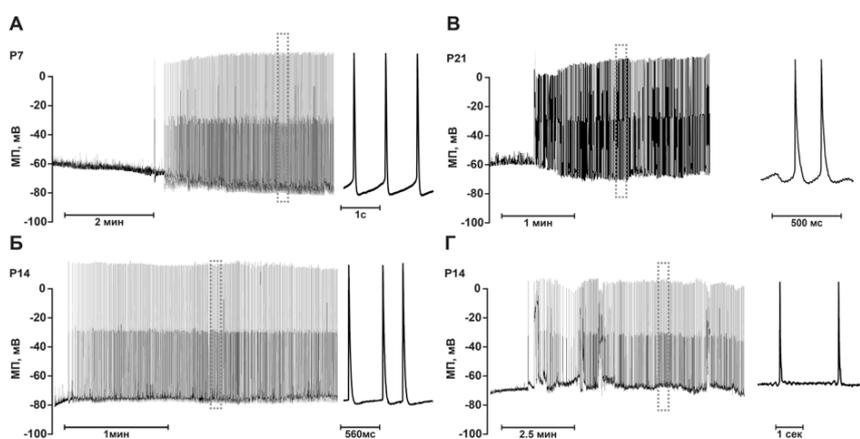


Рисунок 8. Спонтанная активность в миокарде ППВ симпатэктомированных крыс в базальных условиях (P7- P60). Примеры СПД справа были зарегистрированы в области записи, обозначенной пунктирными прямоугольниками.

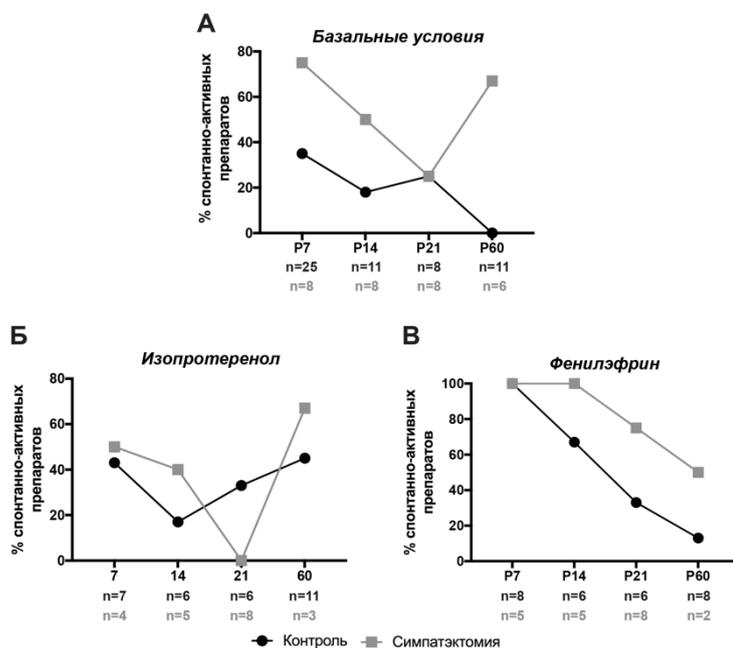
В базальных условиях в ППВ симпатэктомированных крыс преимущественно возникали СПД, обладающие фазой МДД. Фазой МДД обладали 5 из 6 спонтанно-активных препаратов ППВ в группе P7, 3 из 4 препаратов ППВ в группе P14, 1 из 2 препаратов ППВ в группе P21, 2 из 4 препаратов ППВ в группе P60. Характер спонтанной активности в миокарде ППВ симпатэктомированных крыс был преимущественно перманентный, залповую спонтанную активность наблюдали лишь в одном случае (в группе P21). Частота возникновения СПД в базальных условиях в отсутствие электрической стимуляции препаратов ППВ симпатэктомированных крыс была значительно ниже по сравнению с частотой САУ, за исключением группы P14.

Спонтанная активность в миокардиальной ткани ППВ симпатэктомированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза при адренергической стимуляции

Влияние адренергической стимуляции на способность генерировать СПД было возможно оценить в тех препаратах ППВ симпатэктомированных крыс, в которых в базальных условиях не наблюдали перманентную спонтанную активность. В связи с ограниченным количеством экспериментальных животных в данной серии экспериментов исследовали влияние только селективных агонистов β -АР и α 1А-АР – ИЗО и ФЭ.

При действии ИЗО (10 мкМ) спонтанная активность в миокарде ППВ симпатэктомированных крыс возникала в группах P7, P14, P60, но не в группе P21. СПД наблюдали в 50% (2 из 4), 40% (2 из 5), и 67% (2 из 3) в группах P7, P14 и P60, соответственно (Рис.9Б). Фазой МДД обладали индуцированные изопротеренолом СПД в группах P7 и P14, но не в P60. За исключением одного случая (в группе P60) характер спонтанной активности в препаратах ППВ симпатэктомированных крыс при действии ИЗО был перманентный.

При действии ФЭ (10 мкМ) спонтанная активность в миокарде ППВ симпатэктомированных крыс возникала во всех возрастных группах (P7-P60) группах. СПД наблюдали в 100% (5 из 5), 100% (5 из 5), 75% (6 из 8), и 50% (1 из 2) в группах P7, P14, P21 и P60, соответственно (Рис.9В). Фазой МДД обладали все индуцированные фенилэфрином СПД, за исключением группы P60. Спонтанная активность в ППВ симпатэктомированных крыс



при действии ФЭ преимущественно имела перманентный характер, однако наблюдали и залпы СПД в двух случаях (в группах P14 и P21).

Рисунок 9. Процентное соотношение количества спонтанно активных препаратов ППВ симпатэктомированных и контрольных крыс в различных условиях на разных стадиях постнатального онтогенеза (группы P7-P60). Суммарное количество препаратов в каждой группе указано на графике.

Распространение волн возбуждения в миокардиальной ткани ППВ контрольных и симпатэктомированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза

Особенности распространения волн возбуждения в миокардиальной ткани ППВ исследовали на многоклеточных препаратах, содержащих участок ППВ (6-8 мм от устья вены) и правого предсердия (ПП). В базальных условиях в большинстве препаратов нами было зарегистрировано антероградное распространения волн возбуждения – от ПП к дистальным участкам ППВ, что указывает на инициацию возбуждения в этих препаратах в САУ. Однако, в группе семидневных контрольных крыс (P7) в одном случае нами было зарегистрировано ретроградное направление распространения волн возбуждения – от проксимального участка ППВ к предсердию. Таким образом, нами было выявлено, что инициация возбуждения возможна за пределами САУ – в миокардиальной ткани ППВ, по крайней мере, на самых ранних стадиях постнатального онтогенеза.

Как у контрольных, так и у симпатэктомированных животных в атриовенозном соединении ППВ и правого предсердия не наблюдали ни частичных, ни полных блоков проведения возбуждения. Изохронные линии на картах во всех группах были распределены равномерно и последовательно, что указывает на однородность проводящей ткани ППВ.

Скорость проведения возбуждения (СПВ) в миокардиальной ткани ППВ в контрольной группе животных возрастала по мере увеличения возраста. В контрольной группе СПВ была значительно ниже у P7 и P14 по сравнению со взрослыми животными P60 ($p=0.0065$ и $p=0.0034$, соответственно). Средняя СПВ контрольных крыс была 0.20 ± 0.11 ($n=6$), 0.15 ± 0.08 ($n=4$), и 0.31 ± 0.11 ($n=4$) м/с в группах P7, P14, и P21, соответственно, в то время как в группе P60 значение СПВ достигало 0.45 ± 0.06 ($n=4$) м/с. В группе P60 у симпатэктомированных животных СПВ составляла 0.43 ± 0.11 ($n=4$) м/с и не отличалась от таковой в контрольной группе взрослых животных.

Гистологические исследования миокардиальной ткани ППВ контрольных и симпатэктомизированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза

При помощи гистохимического окрашивания по методу трихрома Массона нами была визуализирована миокардиальная ткань в стенке передней правой полой вены крысы зрелого возраста (P60). Нами были обнаружены мышечные волокна, как в проксимальных, так и в дистальных участках вены (1-8 мм от устья вены). Мышечные волокна составляли часть толщины стенки ППВ в проксимальном и медиальном участках вены, а также тонкий слой в дистальном участке вены (Рис.10).

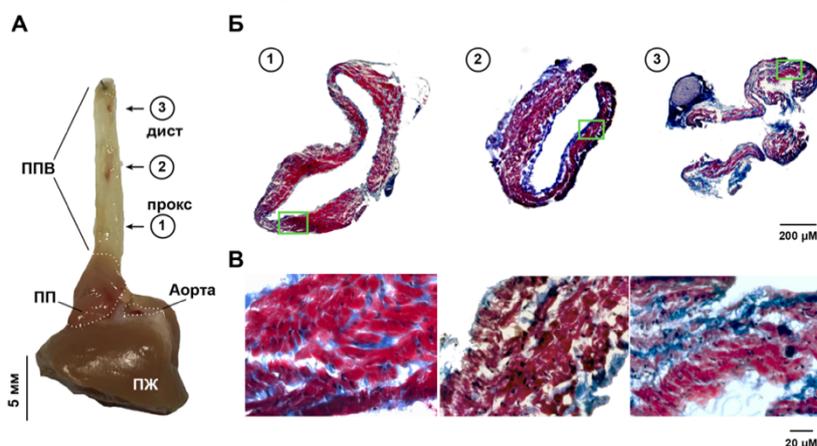


Рисунок 10. Общий вид и миокардиальная ткани правой полой вены (ППВ) крысы. А – изолированный препарат ППВ с прилегающими правым предсердием (ПП) и правым желудочком (ПЖ). Цифрами указаны участки ППВ, из которых были получены криосрезы, окрашенные трихромом Массона (Б-В). Б-В – окрашенные поперечные срезы, полученные из проксимального (1), медиального (2) и дистального (3) участков ППВ.

Ярко-красный цвет – мышечные волокна представляющие собой кардиомиоциты, образующие толстый слой в проксимальной и медиальной областях и тонкий слой в дистальной области ППВ. Зеленым прямоугольником отмечены области, показанные в более высоком разрешении на панели В – слой кардиомиоцитов в ППВ. Черный цвет отражает ядра кардиомиоцитов, синий цвет отражает соединительную ткань, которая более распространена в дистальной области ППВ.

Диаметр клеток в ППВ взрослых контрольных крыс был рассчитан в поперечных срезах, окрашенных антителами на дистрофин и составил 33.4 ± 5.4 мкм ($n=29$), что типично для кардиомиоцитов и аналогично ($p>0.1$) диаметру кардиомиоцитов ушка ПП (34.3 ± 5.5 мкм, $n=20$). Также, на периферии миокардиального слоя в ППВ были обнаружены кардиомиоциты меньшего диаметра (6.1 ± 1.6 мкм, $n=18$), сходные по форме с пейсмекерными кардиомиоцитами САУ (23.5 ± 6.1 мкм, $n=12$). Толщина миокардиального слоя в дистальном (60.6 ± 10 мкм, $n=9$) участке ППВ была меньше по сравнению с медиальным (110.2 ± 28.9 мкм, $n=10$) и проксимальным (123.3 ± 48.7 мкм, $n=12$) участками вены.

Таким образом, при помощи гистохимического и иммуногистохимического окрашивания препаратов ППВ нами было подтверждено, что миокардиальная ткань распространяется по всему участку изолированных препаратов ППВ, используемых в экспериментах. При этом, миокардиальная ткань составляет большую часть толщины стенки вены. Кроме того, нами было обнаружено, что большинство составляющих миокардиальный слой клеток имеют типичную форму рабочих кардиомиоцитов, однако на периферии миокардиального слоя присутствуют и единичные пейсмекер-подобные кардиомиоциты.

Визуализация нервных волокон в стенке ППВ

При помощи гистохимического окрашивания с использованием глиоксиловой кислоты в препаратах ПП-ППВ, полученных от контрольных животных возраста 14 и 60 дней (P14, P60), нами были визуализированы разветвленные сети катехоламин-содержащих волокон, соответствующие расположению функционально активных симпатических нервных волокон (Рис.11Б). Флуоресценцию наблюдали как в области ПП, так по всей площади полой вены. В препаратах ППВ семидневных животных (P7) флуоресценция была близка к фоновой, что указывает на отсутствие функционально-активных симпатических волокон (Рис.11А). Площадь катехоламин+ флуоресценции, длина волокон и их сложность

значительно увеличивались с возрастом, наиболее развитая сеть была обнаружена в препаратах ППВ взрослых животных (P60) (Рис.11Б,Г,Д). Таким образом, изменение катехоламин+ флуоресценции по мере увеличения возраста животных указывает на то, что в контрольной группе животных функционально-активные симпатические нервные волокна отсутствуют у неонатальных (P7) крыс, но начинают развиваться уже ко второй неделе постнатального развития (P14) и образуют густую разветвленную сеть по достижению зрелого возраста (P60).

Для верификации химической симпатэктомии при помощи хронического введения гуанетидина нами были окрашены препараты правого предсердия симпатэктомированных животных, поскольку препараты ППВ были задействованы в экспериментах. Ни в одном из препаратов ПП нами не была зарегистрирована специфическая флуоресценция, соответствующая комплексам глиоксиловой кислоты с катехоламинами (Рис.11В). Таким образом, отсутствие катехоламин+ флуоресценции в препаратах ПП подтверждает отсутствие функционально-активных симпатических нервных волокон у крыс, подвергнутых химической симпатэктомии.

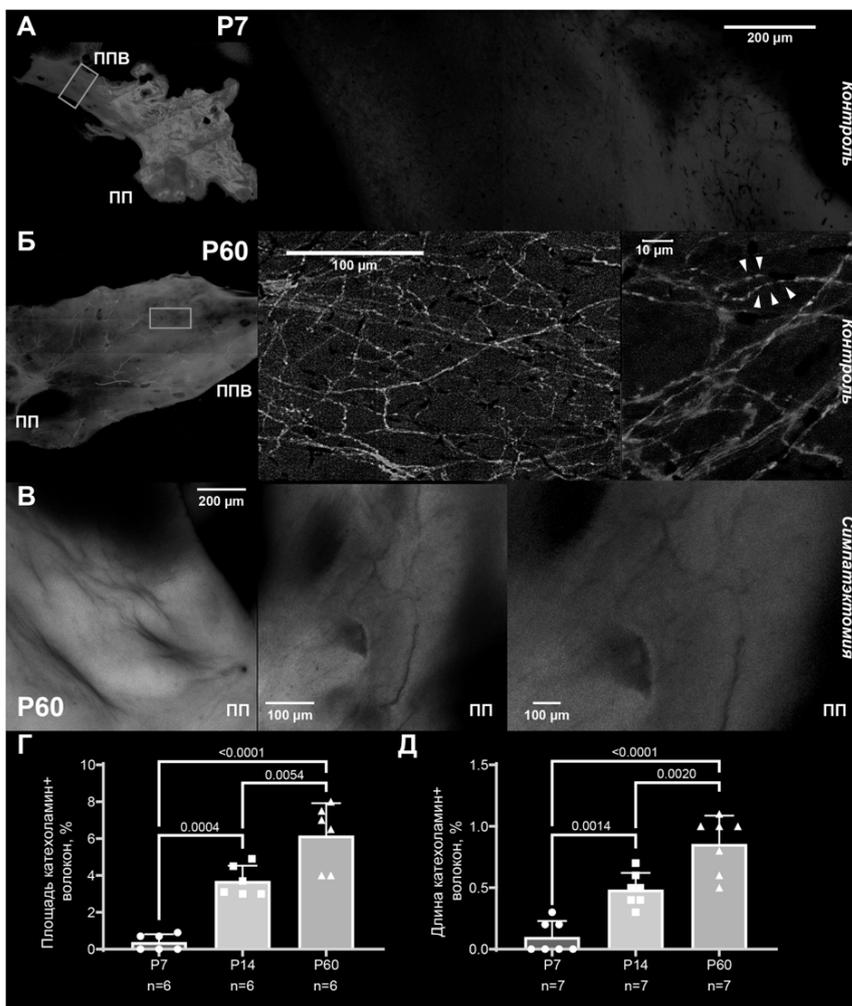


Рисунок 10. Развитие катехоламин-содержащих волокон в стенке ППВ крыс в ходе постнатального онтогенеза. А-Б – катехоламин-содержащие волокна в препаратах ППВ семидневных крыс (P7) и крыс зрелого возраста (P60). На панелях слева (А-Б) показаны изображения общего вида препаратов ПП-ППВ, на панелях справа (Б) показаны катехоламин-содержащие волокна при различном увеличении. Белые стрелки (Б, правая панель) указывают на пятна с высокой интенсивностью флуоресценции, соответствующие варикозам симпатических нервов. В – препараты правого предсердия (ПП) симпатэктомированных крыс зрелого возраста (P60) при различном увеличении. В препаратах отсутствует флуоресценция, соответствующая катехоламин-содержащим.

Г-Д – площадь катехоламин+ флуоресценции (Г) и длина катехоламин-содержащих волокон (Д) относительно общей площади участков препаратов ППВ, полученных от контрольных крыс возраста 7, 14 и 60 дней. (Однофакторный ANOVA, поправка Тьюки).

Высокопроводящие коннексыны Sx43 в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс

Специфическая Sx43-флуоресценция была определена в поперечных срезах, полученных из препаратов ППВ семидневных (P7) и взрослых (P60) крыс (Рис.12). На срезах

дистальной области ППВ уровень Сх43-флуоресценции был значительно выше в группе Р60 по сравнению с группой Р7: 0.011 ± 0.002 (n=5) против 0.023 ± 0.005 % (n=6) (площадь Сх43-флуоресцентных частиц/в группах Р7 и Р60, соответственно, $p = 0.0007$). И в группе Р7 и Р60 Сх43-специфичная флуоресценция была выявлена в областях интеркалирующих дисков в форме типичных полос между поперечными мембранами клеток. Также, в группе Р7 мы наблюдали Сх43-специфичную флуоресценцию в латеральных мембранах кардиомиоцитов, в то время как в группе взрослых животных (Р60) Сх43 преимущественно располагался в поперечных областях мембран.

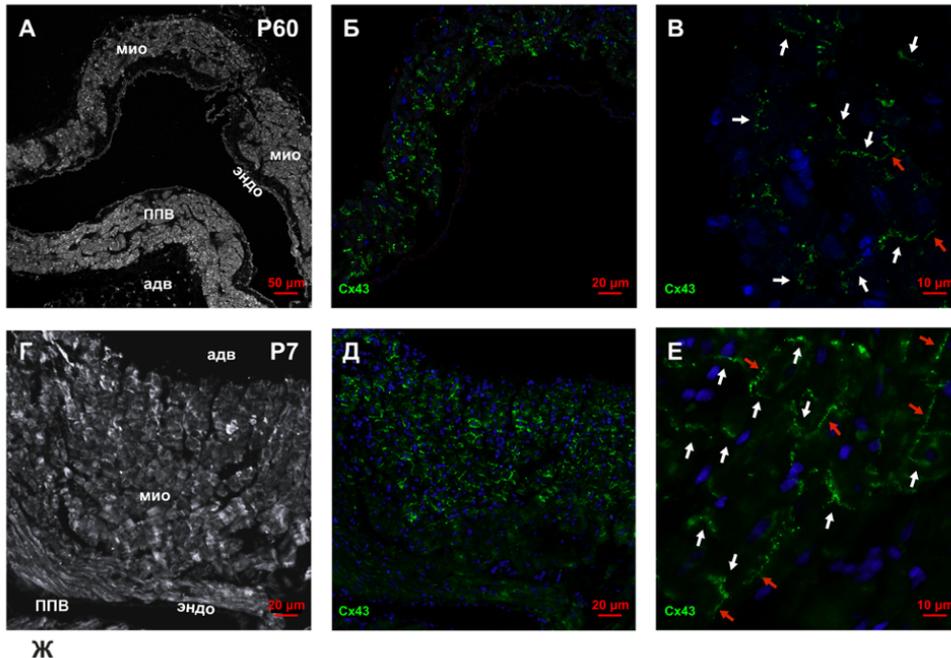
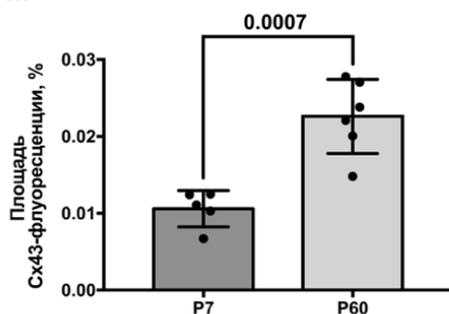


Рисунок 12. Сх43 в миокардиальной ткани ППВ взрослых (А-В) и семи-дневных (Г-Е) крыс. А, Г – общий вид поперечных срезов дистальной области ППВ. ППВ – передняя полая вена, мио – миокард, эндо – эндотелий, адв – адвентиция. Б, В, Д, Е – флуоресценция (синий – Hoechst



– ядра кардиомиоцитов, зеленый – Alexa 488 – Сх43) отображающая скопления Сх43 в типичные кластеры, располагающиеся в интеркалирующих дисках между клетками (белые стрелки), а также и на латеральной мембране клеток (красные стрелки). Ж – площадь специфичной Сх43-флуоресценции относительно общей площади миокардиального слоя ППВ в группах Р7 и Р60 (непарный t-тест).

Адренергические рецепторы α_{1A} в миокардиальной ткани ППВ контрольных и симпатэктомированных крыс

Иммуногистохимическое окрашивание показало, что α_{1A} -адренорецепторы (α_{1A} -АР) присутствуют в миокардиальной ткани ППВ контрольных животных групп Р7, Р14 и Р60, а также и у взрослых симпатэктомированных крыс (Р60) (Рис. 13). Флуоресценцию α_{1A} -АР наблюдали в форме четко определяемых кластеров различного размера в миокардиальном слое стенки ППВ как в проксимальных участках, так и в дистальных. Специфичную α_{1A} -флуоресценцию наблюдали в виде пятен скоплений, предположительно указывающую на перинуклеарную локализацию α_{1A} -АР, преимущественно в препаратах полых вен взрослых животных, но также, в миокарде ППВ наблюдали и диффузно распределенные флуоресцентные частицы, предположительно указывающую на диффузную локализацию α_{1A} -АР в мембранах клеток (Рис. 13Б). Относительная площадь α_{1A} -АР-флуоресценции была значительно больше в группах Р7 и Р14 контрольных животных по сравнению со взрослыми Р60. Различий в уровне α_{1A} -АР-флуоресценции между контрольными и симпатэктомированными животными нами обнаружено не было (Рис. 13Г). Относительная площадь α_{1A} -АР-флуоресценции составила $6.549 \pm 2.448\%$, $7.042 \pm 2.094\%$, $4.012 \pm 0.7531\%$ у контрольных

животных групп P7, P14 и P60; и 2.395 ± 0.8880 у симпатэктомированных животных группы P60. В препаратах ППВ взрослых животных относительная площадь α_{1A} -АР-флуоресценции была сходной с таковой в миокарде правого ($4.9 \pm 0.3\%$) и левого ($5.03 \pm 1.3\%$) предсердий.

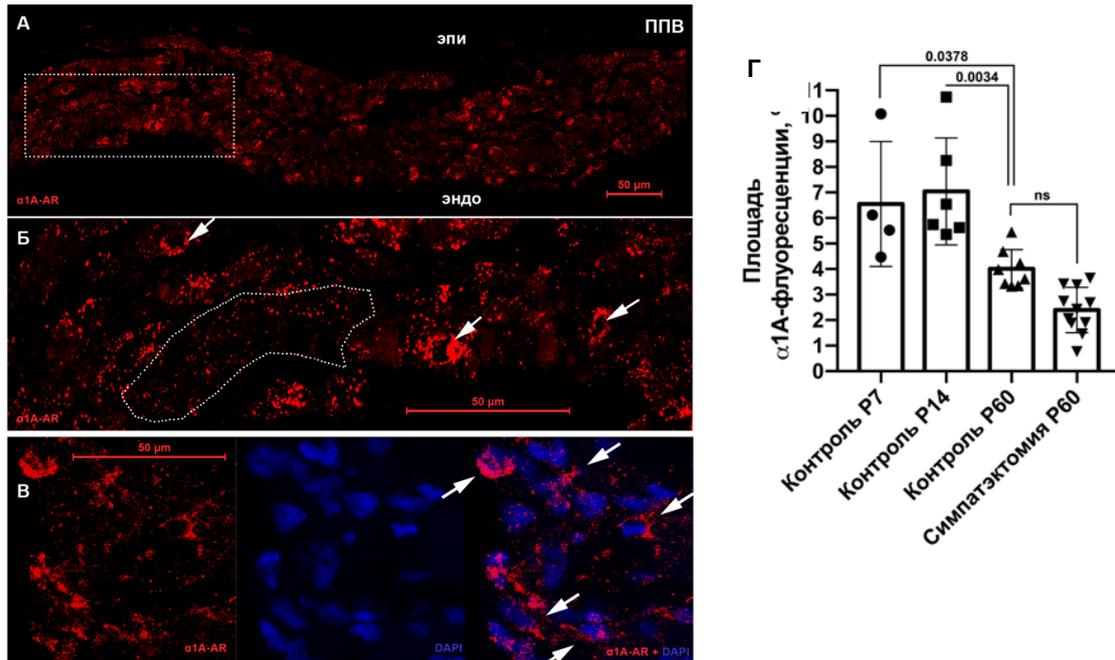


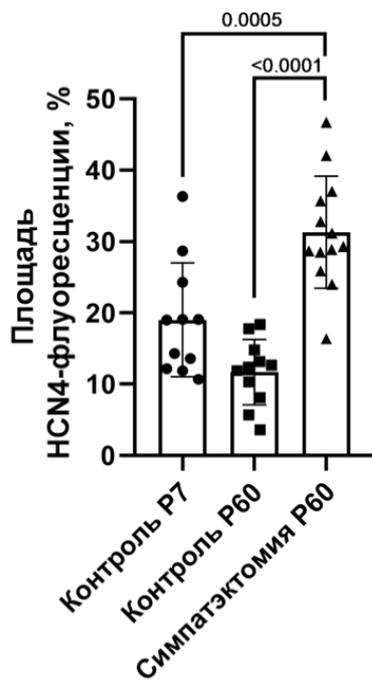
Рисунок 13. α_{1A} -адренорецепторы (α_{1A} -АР) в миокардиальной ткани ППВ взрослых крыс. эпи – эпиваскулярная сторона, эндо – эндovasкулярная сторона. Стрелками указаны участки с перинуклеарной локализацией скоплений α_{1A} -АР. Пунктирная область в секции Б рисунка указывает участок миокарда ППВ с преимущественной неперинуклеарной (диффузной) локализацией α_{1A} -А. В – участки с перинуклеарной локализацией скоплений α_{1A} -АР, синий псевдоцвет – ядра кардиомиоцитов (DAPI), красный псевдоцвет – α_{1A} -АР

Каналы HCN4 и Cav в миокардиальной ткани ППВ контрольных и симпатэктомированных крыс

Нами были подготовлены сагиттальные срезы препаратов ППВ-ПП, полученные от контрольных крыс возраста 7 и 60 дней, а также от симпатэктомированных взрослых крыс. Данные срезы были окрашены с использованием антител к кавеолину 3 (Cav3) и HCN4.

Cav3 – структурный белок мембран кавеол миоцитов, за счет чего на сагиттальных срезах можно визуализировать толщину и протяженность миокардиальной ткани ППВ. На сагиттальных срезах, полученных нами, Cav3-специфичную флуоресценцию наблюдали во всех препаратах как в области предсердного миокарда, так и на всем протяжении выделенного участка ППВ (5-8 мм). Cav3-специфичную флуоресценцию наблюдали по всей поверхности мембран кардиомиоцитов, что позволило визуализировать структуру миокардиальной ткани ППВ. Как в неонатальном, так и во зрелом миокарде ППВ Cav3-специфичная флуоресценция показала, что на сагиттальном срезе мембраны кардиомиоцитов располагаются и в продольном направлении, и в поперечном, что указывает на то, что тяжи миокардиальной ткани ППВ ориентированы в различных направлениях на всем протяжении миокардиального рукава.

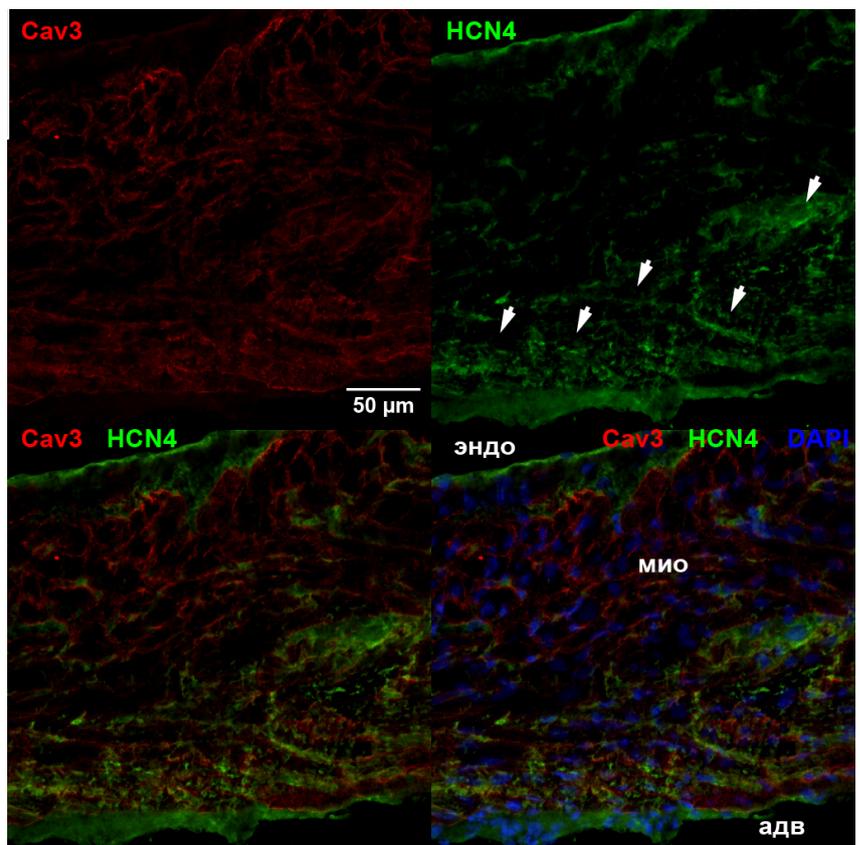
HCN4-флуоресценция была обнаружена во всех препаратах полых вен. HCN4-флуоресцирующие клетки были обнаружены как в проксимальном участке ППВ, так и в дистальном. При этом, HCN4-специфичные скопления в клетках располагались преимущественно на периферии ППВ, но также и в виде небольших островков скоплений в толще



миокардиальной ткани стенки ППВ. Относительная площадь HCN4-флуоресценции на срезах ППВ неонатальных крыс составила $21.05 \pm 10.37\%$, этот параметр незначительно снижался с возрастом – до $11.72 \pm 4.6\%$, у взрослых контрольных крыс. Однако в группе симпатэктомированных животных относительная площадь HCN4-флуоресценции была значительно больше по сравнению с контрольными – $31.31 \pm 7.84\%$ ($p=0.0005$ и $p<0.0001$ относительно контрольных P7 и P60) (Рис.14-15)

Рисунок 14. Относительная площадь HCN4-флуоресценции в ППВ контрольных и симпатэктомированных крыс. Значения p указаны на графике (однофакторная ANOVA, апостериорный тест Тьюки).

Рисунок 15. Увеличенный сегмент сагиттального среза препарата ППВ-ПП симпатэктомированной крысы (P60). Иммуногистохимическая окраска на Cav3 (красный псевдоцвет) и HCN4 (зеленый псевдоцвет). Синий псевдоцвет – DAPI – ядра клеток. Стрелками показаны скопления HCN4-специфичной флуоресценции.



Определение уровня мРНК ключевых белков, определяющих предрасположенность к автоматии в миокарде ППВ контрольных и симпатэктомированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза

На данном этапе работы определяли уровень мРНК различных мишеней в миокарде ППВ и в рабочем миокарде левого предсердия (ЛП). мРНК определяли в группах неонатальных контрольных (Контроль P7), контрольных взрослых (Контроль P60) и симпатэктомированных взрослых (Симпатэктомия P60) животных.

Относительный уровень мРНК канала HCN4, переносящего пейсмекерный ток I_f , у неонатальных животных находился на сходном уровне в препаратах ППВ и ЛП, хотя среднее значение было выше в миокарде ППВ. С увеличением возраста животных, и у контрольных, и у симпатэктомированных животных количество мРНК канала HCN4 в миокарде ППВ становилось значительно больше по сравнению с рабочим миокардом ЛП (Рис.16)

Разницы в уровне мРНК HCN4 между группами Контроль Р60 и Симпатэктомия Р60 не было обнаружено. Однако, в отличие от контрольных, у взрослых симпатэктомированных животных уровень мРНК HCN4 в ППВ была значительно выше по сравнению с неонатальными животными.

Относительный уровень мРНК канала Kir2.2 (*Kcnj12*), переносящего ток I_{K1} , значительно возрастал в рабочем миокарде предсердий как в контрольной группе, так и у симпатэктомированных животных (Рис.16). Наоборот, в миокарде ППВ уровень мРНК Kir2.2 оставался низким и был значительно меньше такового в предсердном миокарде.

Относительный уровень мРНК транскрипционного фактора Nkx2-5, индуцирующий транскрипцию генов рабочего фенотипа в кардиомиоцитах, значительно возрастал в препаратах ЛП (Контроль Р60, Симпатэктомия Р60) по сравнению с уровнем у неонатальных животных (Контроль Р7) (Рис.16). У взрослых животных уровень мРНК Nkx2-5 был выше в предсердном миокарде по сравнению с миокардом ППВ, однако значимое различие обнаружили только в группе взрослых симпатэктомированных животных (Симпатэктомия Р60).

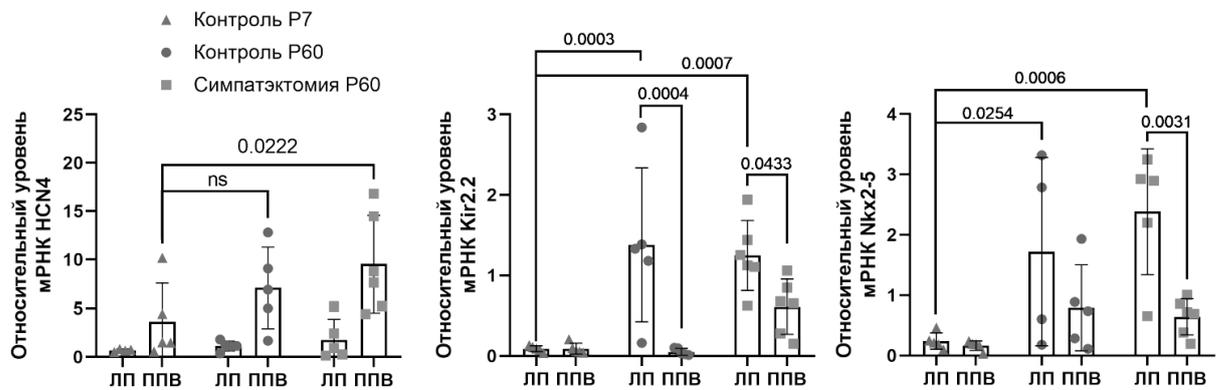


Рисунок 16. Относительный уровень мРНК канала HCN4 в миокардиальной ткани ППВ и ЛП контрольных неонатальных (Контроль Р7), контрольных взрослых (Контроль Р60) и симпатэктомированных взрослых (Симпатэктомия Р60) животных. Двухфакторная ANOVA, апостериорный тест Шидака.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе нами впервые показано, что в ходе постнатального онтогенеза миокардиальная ткань полых вен преобразуется сложным образом. В раннем постнатальном онтогенезе миокард полых вен демонстрирует некоторые пейсмекерные электрофизиологические характеристики, наследуемые от эмбрионального венозного синуса, который выполняет роль ритмоводителя сердца в поздний пренатальный период. В зрелом возрасте миокардиальная ткань полых вен утрачивает большинство признаков пейсмекерной активности, таких как генерация спонтанных потенциалов действия, однако при определенных условиях способна проявлять автоматическую активность, которая может являться проаритмической.

Мы показали, что у неонатальных и взрослых животных в миокарде полых вен различается экспрессия некоторых ключевых ионных каналов и рецепторов на уровне мРНК и белка. Мы установили, что в ходе постнатального развития у животных количество высокопроводящего коннексина Sx43 становится больше в миокарде полых вен, при этом локализация этих коннексинов в кардиомиоцитах меняется, обеспечивая высокую скорость проведения в ткани, подобно рабочему миокарду. Нами показано, что уровень экспрессии ионных каналов Kir2.2 реполяризирующего тока I_{K1} , который необходим для поддержания

стабильного потенциала покоя, в миокарде полых вен взрослых животных ниже, чем в рабочем миокарде предсердий. Однако, уровень экспрессии каналов HCN4 пейсмекерного деполяризирующего тока I_f выше в миокарде полых вен по сравнению с предсердным миокардом взрослых крыс. Нами установлено, что вопреки предположениям, уровень транскрипционного фактора Nkx2-5, который способствует экспрессии генов рабочего миокарда в полых венах не увеличивается в ходе развития, в отличие от миокарда предсердий. Также, мы показали, что в полых венах в онтогенезе меняется характер локализации $\alpha 1A$ -адренорецепторов, и у взрослых животных эти рецепторы располагаются в основном на ядерной мембране.

Полученные нами данные впервые подтверждают, что в миокарде полых вен взрослых животных одновременно обнаруживаются признаки как рабочего, так и пейсмекерного электрофизиологического фенотипа. Таким образом, трансформацию электрофизиологических свойств миокарда полых вен в ходе постнатального онтогенеза можно описать как процесс атриализации, характерный для части миокарда стенки правого предсердия, происходящего из венозного синуса, однако, реализуемый не в полной мере.

Нами предположено, что в механизмах преобразования электрофизиологического фенотипа миокардиальной ткани полых вен принимают участие факторы симпатической нервной системы. Действие таковых факторов становится возможным только с момента формирования симпатических нервных волокон в миокарде в постнатальном онтогенезе. Симпатическая иннервация полых вен действительно формируется постнатально. Для проверки этого предположения нами проведены эксперименты с использованием хронической симпатэктомии, в результате которой у животных развитие симпатической нервной системы было подавлено. В этих экспериментах нами обнаружено, что в отсутствие развития симпатических нервных окончаний пейсмекерные свойства миокарда полых вен усиливаются, а формирование свойств, характерных для рабочего миокарда – тормозится. В отличие от нормально развивающихся животных, у симпатэктомизированных крыс миокардиальная ткань полых вен сохраняет способность к базальной автоматической активности в зрелом состоянии. В работе впервые обнаружено, что в отсутствие развития симпатической иннервации в миокарде полых вен повышается экспрессия пейсмекерного ионного канала HCN4. Данные полученные в экспериментах с использованием животных, лишенных симпатической иннервации, подтверждают то, что формирование и развитие симпатического отдела нервной системы участвует в контроле преобразования, иными словами электрофизиологического ремоделирования миокардиальной ткани в ходе постнатального онтогенеза.

Механизмы, которые лежат в основе ремоделирующего влияния симпатической нервной системы остаются не полностью раскрыты. Тем не менее, нами сделано предположение, что мишенью симпатического влияния может быть комплекс транскрипционных факторов как GATA4/Nkx2-5/Tbx5. Внутриклеточные сигнальные каскады $\alpha 1A$ -адренорецепторов, локализованных на ядерной мембране кардиомиоцитов могут опосредовать симпатические сигналы в полых венах. Известно, что активность транскрипционных факторов этого комплекса определяет, в значительной степени, то каким будет электрофизиологический фенотип кардиомиоцитов того или иного участка сердца. Известно, что GATA4/Nkx2-5/Tbx5 регулируют экспрессию в кардиомиоцитах белков ионных каналов пейсмекерного тока HCN4. Нами впервые показано, что с большой вероятностью, ключевым белком в полых венах, уровень экспрессии которого, в конечном счете изменяется в онтогенезе полых вен в результате развития симпатической иннервации данной ткани, является HCN4.

Результаты данной работы вносят существенный вклад в понимание механизмов, регулирующих электрофизиологию миокарда полых вен и его атриализацию в ходе постнатального онтогенеза. В данной работе раскрыты новые механизмы лежащие в основе аритмогенной эктопической активности миокарда полых вен.

ВЫВОДЫ

1. В ходе постнатального онтогенеза происходит значительное изменение электрофизиологических свойств миокардиальной ткани полых вен: в постнатальной жизни миокард полых вен теряет способность к автоматии и частично приобретает свойства, характерные для рабочего миокарда предсердий.
2. Адренергическая стимуляция вызывает автоматическую активность в миокардиальной ткани ПВ в отличие от рабочего миокарда предсердий. Предрасположенность к автоматии, индуцированной активацией $\alpha 1$ -адренорецепторов, в ПВ уменьшается в ходе онтогенеза.
3. Симпатические нервные волокна отсутствуют в стенке ПВ у неонатальных крыс и впервые обнаруживаются начиная со второй недели постнатального развития, что совпадает с периодом формирования иннервации рабочего миокарда.
4. Развитие симпатической иннервации способствует подавлению базальной и адренергической автоматии в ПВ, а также усилению биоэлектрических свойств, характерных для рабочего миокарда предсердий.
5. Кардиомиоциты полых вен как здоровых, так и симпатэктомизированных животных экспрессируют $\alpha 1A$ -адренорецепторы ($\alpha 1A$ -АР) на всех этапах постнатальной жизни, однако, клеточная локализация $\alpha 1A$ -АР меняется, таким образом, что у взрослых животных большая часть рецепторов обнаруживается в перинуклеарной зоне кардиомиоцитов.
6. Для миокардиальной ткани ПВ крыс характерна повышенная, мозаичная экспрессия ионных каналов HCN4 пейсмекерного тока I_f ; сниженная экспрессия Ncx2-5, ионных каналов Kir2.2 калиевого тока аномального выпрямления (I_{K1}), типичная для кардиомиоцитов ритмоводителя сердца. Подавление формирования симпатической иннервации ПВ в онтогенезе приводит к увеличению экспрессии каналов HCN4 на уровне белка и мРНК, но не влияет на профиль экспрессии Kir2.2 и Ncx2-5. Феномен снижения способности ПВ к автоматии в ходе онтогенеза обусловлен подавлением экспрессии, тканевой изоляцией групп HCN4-позитивных кардиомиоцитов в результате постнатального формирования симпатической иннервации миокардиальной ткани полых вен.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, Web of Science (WoS), RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.015.7 по специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных:

1. **Ivanova A. D.**, Filatova T. S., Abramochkin D. V, Atkinson A., Dobrzynski H., Kokaeva Z. G., Merzlyak E. M., Pustovit K. B., Kuzmin V. S. Attenuation of inward rectifier potassium current contributes to the $\alpha 1$ -adrenergic receptor-induced proarrhythmicity in the caval vein myocardium // Acta Physiologica. – 2021. – V. 231. – № 4. – P. 1–17. (IF 7.523, WoS) (2.86/1.9)*
2. **Ivanova A. D.**, Kuzmin V. S. Electrophysiological characteristics of the rat azygos vein under electrical pacing and adrenergic stimulation // The Journal of Physiological Sciences. – 2017. (IF 2.257, WoS)(1.9/1.3)*

3. **Ivanova A. D.**, Kuzmin V. S. Inhibition of inward rectifier potassium currents by chloroquine causes significant electrophysiological changes in the rat thoracic veins myocardium // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. – 2018. – V. 160. – P. 1–11. (IF 0.901, RSCI)(0.36/0.18)*
4. **Ivanova A. D.**, Samoilova D. V., Razumov A. A., Kuzmin V. S. Rat caval vein myocardium undergoes changes in conduction characteristics during postnatal ontogenesis // Pflügers Archiv - European Journal of Physiology. – 2019. – V. 471. – № 11–12. – P. 1493–1503. (IF 4.458, WoS)(2.0/1.0)*
5. Kuzmin V. S., **Ivanova A. D.**, Potekhina V. M., Samoilova D. V., Ushenin K. S., Shvetsova A. A., Petrov A. M. The susceptibility of the rat pulmonary and caval vein myocardium to the catecholamine-induced ectopy changes oppositely in postnatal development // The Journal of Physiology. – 2021. – V. 599. – № 11. – P. 2803–2821. (IF 6.228, WoS)(3.1/1.2)*
6. Petkova M., Atkinson A. J., Yanni J., Stuart L., Aminu A. J., **Ivanova A. D.**, Pustovit K. B., Geraghty C., Feather A., Li N., Zhang Y., Oceandy D., Perde F., Molenaar P., D'Souza A., Fedorov V. V., Dobrzynski H. Identification of Key Small Non-Coding MicroRNAs Controlling Pacemaker Mechanisms in the Human Sinus Node // Journal of the American Heart Association. – 2020. – V. 9. – № 20. (IF 6.106, WoS)(2.3/0.3)*
7. Pustovit K. B., Potekhina V. M., **Ivanova A. D.**, Petrov A. M., Abramochkin D. V., Kuzmin V. S. Extracellular ATP and β -NAD alter electrical properties and cholinergic effects in the rat heart in age-specific manner // Purinergic Signalling. – 2019. – V. 15. – № 1. – P. 107–117. (IF 3.950, WoS)(2.18/0.36)*
8. **Иванова А.Д.**, Тапилина С.В., Кузьмин В. С. Изучение роли ацетилхолиновых рецепторов m1-, m2- и m3-типов в регуляции электрической активности миокардиальной ткани полых вен в раннем постнатальном онтогенезе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – V. 10. – № 166. – P. 404–409. (IF 0.693, RSCI)(0.74/0.)*
9. **Иванова А. Д.**, Кузьмин В. С., Розенштраух Л. В. β -адренергическая стимуляция вызывает проаритмическую активность в миокардиальной ткани полых вен // Доклады Академии Наук. – 2017. – V. 476. – № 2. – P. 237–241. (IF 1.103, RSCI)(0.72/0.33)*
10. Кузьмин В. С., Кобылина А. А., Пустовит К. Б., **Иванова А. Д.**, Абрамочкин Д. В. мик-роРНК miR-133a-3p усиливает адренергическую проаритмическую активность в миокарде лёгочных вен крыс, повышая внутриклеточную концентрацию цАМФ // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – V. 172. – № 12. – P. 664–668. (IF 0.693, RSCI)(0.66/0.13)*
11. Пустовит К. Б., **Иванова А. Д.**, Кузьмин В. С. Внеклеточный НАД⁺ подавляет адренергические эффекты в предсердном миокарде крыс на раннем этапе постнатального онтогенеза // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – V. 73. – № 1. – P. 52–59. (IF 0.693, RSCI)(0.58/0.19)*

Тезисы докладов всероссийских и международных конференций:

1. Ivanova A. D. Actions potentials, resting membrane potential instability and automaticity in the rat caval and azygos veins myocardium // EP Europace. – 2017. – V. 19. – № suppl_3. – P. iii114–iii114.
2. Ivanova A., Kuzmin V. Acetylcholine affects the electrical properties of neonatal caval vein myocardium via noncanonical mechanism // Acta Physiologica. Abstracts from The Annual Meeting of The Scandinavian Physiological Society. – 2019. – V. 227. – P. 41–41.
3. Ivanova A., Kuzmin V., Filatova T. Caval vein myocardium demonstrates automaticity and properties of a leading pacemaker // EP Europace. Issue Supplement_2, March 2019. – 2019. – V. 21. – P. ii750–ii750.
4. Иванова А. Д. Влияние блокаторов тока аномального выпрямления на биоэлектрическую активность миокардиальной ткани торакальных вен крысы // Материалы Международного

молодежного научного форума «Ломоносов-2016». Издательство «МАКС Пресс.» – 2016. – Р. 978–5.

5. Иванова А. Д. Исследование калиевых токов аномального выпрямления в миокардиальной ткани легочных и полых вен крысы // МАТЕРИАЛЫ XIV Всероссийской молодежной научной конференции (25-27 апреля 2016 г., г. Сыктывкар) «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике», сборник тезисов. – 2016. – Р. 33–35.

6. Иванова А. Д., Кузьмин В. С. Влияние соединений-ингибиторов токов аномального выпрямления на биоэлектрическую активность миокардиальной ткани полых вен крысы // Тезисы докладов VI Всероссийской с международным участием школы – конференции по физиологии кровообращения. Издательство «МАКС Пресс.» – 2016. – Р. 200–200.

7. Иванова А. Д., Кузьмин В. С. Автоматическая активность в миокарде полых вен крысы при холинергических и адренергических воздействиях на ранних этапах постнатального онтогенеза // Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. Издательство «ИСТОКИ». – 2017. – Р. 144–145.

8. Иванова А. Д., Кузьмин В. С. Автоматическая активность в миокарде полых вен крысы на ранних и поздних этапах постнатального онтогенеза // Вторая молодежная школа-конференция «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций»: сборник материалов. — Университетская книга Москва. – 2017. – Р. 11–12.

9. Иванова А. Д., Кузьмин В. С. Преобразование биоэлектрической активности миокардиальной ткани полых вен в ходе постнатального онтогенеза и некоторые механизмы её регуляции // Третья молодежная школа-конференция «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций»: сборник материалов. Издательство Наука (М.). – 2019. – Р. 14–15.

10. Филатова Т. С., Иванова А. Д. Проведение возбуждения в миокарде полых вен на ранних и поздних этапах постнатального онтогенеза // актуальные исследования висцеральных систем в биологии и медицине. Сборник материалов всероссийской научно-практической конференции. Издательский дом «Астраханский университет». – 2018. – Р. 82–83.

11. Филатова Т. С., Иванова А. Д., Кузьмин В. С. Экспрессия каналов HCN1/2/4 в миокардиальной ткани торакальных вен на разных этапах постнатального онтогенеза // Третья молодежная школа-конференция «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций»: сборник материалов. Издательство Наука (М.). – 2019. – Р. 18–19.

12. Швецова А. А., Иванова А. Д. Влияние симпатической иннервации на электрофизиологические свойства миокардиальной ткани полых вен в ходе постнатального онтогенеза // актуальные исследования висцеральных систем в биологии и медицине. Сборник материалов всероссийской научно-практической конференции. Издательский дом «Астраханский университет». – 2018. – Р. 85–86.

* - Объем в условных печатных листах/ вклад автора в условных печатных листах

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД – адреналин
 ВПВ – верхняя (правая) полая вена
 ВС – венозный синус
 ДПД_{30/50/90} – длительность ПД на уровне реполяризации 30%, 50% или 90%
 ЗПД – задержанные постдеполяризации
 ИЗО – изопротеренол
 КХК – ненейрональные катехоламинергические клетки
 ЛВ – легочные вены
 ЛП – левое предсердие
 ЛПВ – левая передняя полая вена
 МДД – медленная диастолическая деполяризация
 МП – мембранный потенциал
 МПП – мембранный потенциал покоя
 НА – норадреналин
 НВ – непарная вена
 НПВ – нижняя полая вена
 ПВ – полые вены
 ПД – потенциал действия
 ПП – правое предсердие
 ППВ – передняя (правая) полая вена
 РПД – ранние постдеполяризации
 САУ – синоатриальный узел
 СНС – симпатическая нервная система
 СПД – спонтанный потенциал действия
 СПР – саркоплазматический ретикулум
 ТФ – транскрипционный фактор
 УПП – ушко правого предсердия
 ФП – фибрилляция предсердий
 ФЭ – фенилэфрин
 АС – адентлатциклаза (adenylate cyclase)
 сАМФ/ цАМФ – циклический аденозинмонофосфат (cyclic adenosine monophosphate)
 Cav3 – кавеолин 3
 Cx40/43/45 – коннексины 40/43/45
 DAG – диацилглицерол
 ERK – extracellular signal-regulated kinase
 GPCRs – G-белок-связанные мембранные рецепторы (G-protein-coupled receptors)
 HCN4 – hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 4
 IP₃ – инозитолтрифосфат
 IP₃R – инозитольные рецепторы
 NCX – Na⁺/Ca²⁺ обменник
 PI4P – фосфатидилинозитол 4-фосфат
 PIP₂ – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат
 PKA – протеинкиназа (protein kinase A)
 PKC – протеинкиназа C (protein kinase C)
 PKD – протеинкиназа D (protein kinase D)
 PLA2 – фосфолипаза A2 (phospholipase A2)
 PLC-β – фосфолипаза-β (phospholipase-β)
 PLC-ε – фосфолипаза-ε (phospholipase-ε)
 RyR2 – рианодиновые рецепторы
 SERCA – сарко/эндоплазматическая Ca²⁺-АТФаза
 dv/dt_{max} – максимальная скорость нарастания переднего фронта ПД
 α-АР – α-адренорецепторы
 β-АР – β-адренорецепторы