

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Иванова Александра Дмитриевна

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

Специальность – 1.5.5 – физиология человека и животных

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Кузьмин Владислав Стефанович

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ:

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
I ВВЕДЕНИЕ	8
I.1 Актуальность темы исследования.....	8
I.2 Степень разработанности темы	9
I.3 Цели и задачи исследования	12
I.4 Научная новизна исследования	12
I.5 Научно-практическая значимость исследования	13
I.6 Методология.....	14
I.7 Степень достоверности данных	14
I.8 Публикации.....	14
I.9 Апробация результатов	14
I.10 Положения, выносимые на защиту	15
I.11 Личный вклад автора	16
II ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
II.1 Миокардиальная ткань полых вен.....	17
II.1.1 Полые вены – часть системы торакальных вен	17
II.1.2 Строение миокардиальных рукавов полых вен.....	19
II.1.3 Формирование миокардиальной ткани полых вен в ходе эмбриогенеза.....	21
II.1.4 Молекулярные механизмы контроля развития пейсмекерного и рабочего миокарда	24
II.2 Биоэлектрические свойства миокарда полых вен.....	26
II.2.1 Биоэлектрические свойства миокарда полых вен в базальных условиях.....	26
II.2.2 Эффекты активации адренергических рецепторов в миокарде полых вен	28
II.3 Симпатическая и адренергическая регуляция электрической активности сердца	29
II.3.1 Адренергические рецепторы - экспрессия и локализация в сердце.....	30
II.3.2 Экспрессия адренорецепторов у неонатальных и взрослых млекопитающих.....	31
II.3.3 Адренергические рецепторы и внутриклеточные сигнальные пути, сопряженные с активацией AP	32
II.3.4 Онтогенез симпатической иннервации миокарда	37
II.3.5 Экстра- и интракардиальные источники катехоламинов в сердце млекопитающих	38
II.3.6 Влияние активации α - и β - AP на электрофизиологические характеристики кардиомиоцитов у некоторых животных и человека.....	40
II.4 Автоматическая активность в сердце.....	42
II.4.1 Электрофизиологические механизмы автоматической активности пейсмекерных кардиомиоцитов	42

II.4.2 HCN каналы миокарда и их адренергическая регуляция	45
II.4.3 Структуры, демонстрирующие способность к автоматической активности и естественный ритмоводитель сердца	47
II.5 Роль миокардиальной ткани торакальных вен в формировании предсердных аритмий	47
II.5.1 Основные механизмы возникновения фибрилляций предсердий	47
II.5.2 Вклад адренергической стимуляции в формировании эктопической спонтанной активности	50
II.5.3 Миокардиальная ткань полых вен как источник эктопической активности.....	51
II.5.4 Молекулярный контроль экспрессии генов при ФП	53
II.6 Заключение к обзору литературы	53
III МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	55
III.1 Экспериментальные животные и препараты	55
III.1.1 Экспериментальные животные.....	55
III.1.2 Химическая симпатэктомия.....	55
III.1.3 Выделение препаратов передней правой полых вены (ППВ) и левого предсердия (ЛП).....	55
III.2 Регистрация потенциалов действия и потенциала покоя в различных препаратах	57
III.2.1 Перфузия изолированных препаратов	57
III.2.2 Экспериментальная установка, регистрация потенциалов действия.....	57
III.2.3 Анализ данных электрофизиологических экспериментов.....	58
III.2.4 Протокол электрофизиологических экспериментов.....	59
III.3 Оптическое картирование	59
III.4 Визуализация симпатических волокон в стенке ППВ и оценка эффективности симпатэктомии.....	62
III.5 Иммуногистохимическое окрашивание препаратов ППВ.....	63
III.5.1 Подготовка криосрезов.....	63
III.5.2 Иммуногистохимическое окрашивание.....	64
III.6 Гистохимическое окрашивание по Массону (трихром Массона) миокардиальной ткани ППВ контрольных зрелого возраста.....	65
III.7 Получение, обработка и анализ конфокальных изображений	66
III.7.1 Получение, обработка и анализ конфокальных изображений симпатических волокон в стенке ППВ и ЛП.....	66
III.7.2 Получение, обработка и анализ конфокальных изображений иммуногистохимически окрашенных срезов ППВ.....	67
III.8 Оценка уровня целевых мРНК в миокарде ППВ методом полимеразной цепной реакции в реальном времени	68
III.9 Статистическая обработка данных.....	70
III.10 Реактивы, используемые в работе.....	71

IV РЕЗУЛЬТАТЫ.....	73
IV.1 Электрофизиологические характеристики миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза	73
IV.1.1 Мембранный потенциал покоя (МПП) и потенциал действия (ПД) в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза	73
IV.1.2 Спонтанная активность в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза	76
IV.1.3 Спонтанная активность в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза при адренергической стимуляции.....	77
IV.2 Электрофизиологические характеристики миокардиальной ткани ППВ симпатэктомированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза	82
IV.2.1 Мембранный потенциал покоя (МПП) и потенциал действия (ПД) в миокардиальной ткани ППВ симпатэктомированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза.....	82
IV.2.2 Спонтанная активность в миокардиальной ткани ППВ симпатэктомированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза	85
IV.2.3 Спонтанная активность в миокардиальной ткани ППВ симпатэктомированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза при адренергической стимуляции	88
IV.3 Распространение волн возбуждения в миокардиальной ткани ППВ контрольных и симпатэктомированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза.....	92
IV.3 Гистологические исследования миокардиальной ткани ППВ контрольных и симпатэктомированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза	94
IV.3.1 Миокардиальная ткань в стенке правой передней полой вены крысы	94
IV.3.2 Визуализация нервных волокон в стенке ППВ.....	97
IV.3.3 Высокопроводящие коннексины Cx43 в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс.....	100
IV.3.4 Адренергические рецепторы α_{1A} в миокардиальной ткани ППВ контрольных и симпатэктомированных крыс	102
IV.3.5 Cav3 и каналы HCN4 в миокардиальной ткани ППВ контрольных и симпатэктомированных крыс	105
IV.4 Определение уровня мРНК ключевых белков, определяющих пропейсмерные свойства в миокарде ППВ контрольных и симпатэктомированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза	116
IV.4.1 мРНК канала HCN4	116
IV.4.2 мРНК канала Kir2.2	117
IV.4.3 мРНК α_{1A} -адренорецепторов	117
IV.4.3 мРНК транскрипционного фактора Nkx2-5	118
V ОБСУЖДЕНИЕ	120

V.1 Преобразование электрически вызванных ПД в миокарде полых вен в ходе постнатального онтогенеза	120
V.2 Изменение МПП и уровня мРНК канала Kir2.2 в миокарде ППВ в ходе постнатального онтогенеза	121
V.3 Изменение скорости проведения возбуждения и количества коннексинов высокой проводимости Cx43 в миокарде ППВ в ходе постнатального онтогенеза	123
V.4 Изменение способности к автоматии в базальных условиях в миокарде ППВ и уровень мРНК HCN4 в ходе постнатального онтогенеза	127
V.5 Изменение способности к автоматии при адренергической стимуляции и экспрессия α_{1A}-АР в миокарде ППВ в ходе постнатального онтогенеза	129
V.6 Cav3 и каналы HCN4 пейсмекерного тока I_f в миокардиальной ткани ППВ в ходе постнатально развития.....	131
VI ЗАКЛЮЧЕНИЕ	134
VII ВЫВОДЫ	136
VIII СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	137

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)

сАМР/ цАМФ – циклический аденозинмонофосфат (cyclic adenosine monophosphate)

Саv3 – кавеолин 3

Сх40/43/45 – коннексины 40/43/45

DAГ – 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-AP – α-адренорецепторы
β-AP – β-адренорецепторы

I ВВЕДЕНИЕ

I.1 Актуальность темы исследования

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 простираться 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 [Linz 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.

I.2 Степень разработанности темы

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]. Наиболее важным в этом исследовании была наглядная демонстрация того, что миокард полых вен обладает свойствами автоматии и способен генерировать спонтанную биоэлектрическую активность (потенциалы действия), которая может активно распространяться в предсердие. 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 полых венах кролика [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 – т.н. 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 тахикардии могут быть инициированы триггерными очагами возбуждения именно в миокарде различных торакальных вен [Haïssaguerre 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 полых вены и правого предсердия [Haïssaguerre et al., 1994]. Позже был выявлен еще один

случай фокальной ФП, при хирургическом лечении которой, разрушение электрической связи между миокардом полых вен и правым предсердием успешно устранило нарушения ритма [Ino et al., 2000]. В 2002 году было продемонстрировано, что при инвазивной терапии ФП абляция миокарда верхней полых вен приводит к реверсии синусового ритма, прекращению циркуляции фибрилляторных волн в правом предсердии, однако в самом изолированном миокарде полых вен 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.

Согласно современным данным предсердные аритмии возникают вследствие триггерной электрической активности в 70-80% случаев в ЛВ. Однако, 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 целевых 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.

I.3 Цели и задачи исследования

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 симпатэктомизированных 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.

I.4 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.

I.5 Научно-практическая значимость исследования

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.

I.6 Методология

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 полых вены крысы с использованием стандартной мик-роэлектродной 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.

I.7 Степень достоверности данных

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.

I.8 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.

I.9 Апробация результатов

Результаты данной диссертационной работы были представлены на Scandinavian Physiological Society Annual Meeting (Рейкьявик, Исландия, 9-11 августа 2019), 41nd, 42nd, 43rd Euro-pean 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.

I.10 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 колокализированы 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.

I.11 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.

II ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

II.1 Миокардиальная ткань полых вен

II.1.1 Полые вены – часть системы торакальных вен

Поверхностные и внутренние вены, приносящие кровь от конечностей и висцеральных органов, последовательно соединяются вместе и формируют большие вены в торакальной (грудной) и брюшной полостях. Передние полые вены, задняя полая вена и легочные вены являются главными торакальными венами млекопитающих, обеспечивающими приток крови из большого и малого кругов кровообращения. Как правило, для «четвероногих» млекопитающих принято использовать термины «передние» (или «задняя») полые вены, в то время как у человека торакальные вены называют «верхняя» (или «нижняя») полая вена.

У млекопитающих количество и расположение передних (верхних) полых вен может отличаться. Передние полые вены являются продолжением «безымянных» вен (*Рисунок 1В*), которые также относятся к торакальным венам. Безымянные вены обеих сторон тела образованы подключичной и внутренней яремной венами, которые приносят кровь от верхней части туловища. У человека левая безымянная вена соединяется с правой, образуя верхнюю (правую) полую вену (ВПВ), которая впадает в правое предсердие [Mueller et al., 2015]. Иногда правая и левая безымянные вены впадают в правое предсердие по отдельности, при этом образуются и правая, и левая верхние (передние) полые вены. Для человека такие случаи являются исключением, однако у других млекопитающих, например, у крыс и кроликов [Halpern, 1953; Ito et al., 1967], левая безымянная вена не имеет соединения с правой, а левая передняя полая вена присутствует.

От нижней части туловища кровь в правое предсердие приносит нижняя полая вена (НПВ). Выше слияния с печеночными венами НПВ входит в торакальную полость через центральное сухожилие диафрагмы. Супрадиафрагмальная (ближняя к сердцу) часть НПВ, является «внутриперикардиальной», так как она окружена перикардом [Mueller et al., 2015].

К торакальным венам относится также и система непарных вен, которая включает собственно непарную вену (*Рисунок 1В*), полунепарную, добавочную непарную и левые верхние межреберные вены. Эти вены приносят кровь от нижней части тела, диафрагмы, стенки грудной клетки, трахеи и бронхов, пищевода и перикарда. У человека непарная вена впадает в верхнюю полую вену [Mueller et al., 2015]. У крыс и некоторых млекопитающих непарная вена располагается на левой стороне тела и впадает в левую переднюю полую вену [Bowsher, 1954; Halpern, 1953].

Кроме полых вен в торакальной полости находятся и легочные вены, по которым в левое предсердие поступает кровь от легких. У человека от левого предсердия отходят две

правые и две левые легочные вены [Nathan, Eliakim, 1966]. Довольно часто встречаются дополнительные легочные вены [Mueller et al., 2015]. Легочные вены ветвятся и образуют древоподобную структуру. Устья легочных вен не имеют четких границ, их диаметр, характер начального ветвления могут значительно варьироваться [Lacomis et al., 2007]. У человека часто левые передняя и задняя легочные вены выходят из общего левого легочного ствола [Kato et al., 2003].

Полые вены являются производными эмбриональных кардинальных вен (*Рисунок 1*). У человека передняя и задняя кардинальные вены появляются в течение четвертой недели эмбрионального развития [Mueller et al., 2015]. Эти вены отводят дезоксигенированную кровь из краниальной и хвостовой части эмбриона в венозный синус через правую и левую общие кардинальные вены. В течение следующих недель, между передними кардинальными венами образуется соединительная вена (левая безымянная вена). У человека при дальнейшем развитии происходит регрессия левой передней кардинальной вены, а правая общая и передняя кардинальные вены образуют верхнюю полую и правую безымянную вены. Нижняя полая вена образована эмбриональной правой желточной веной.

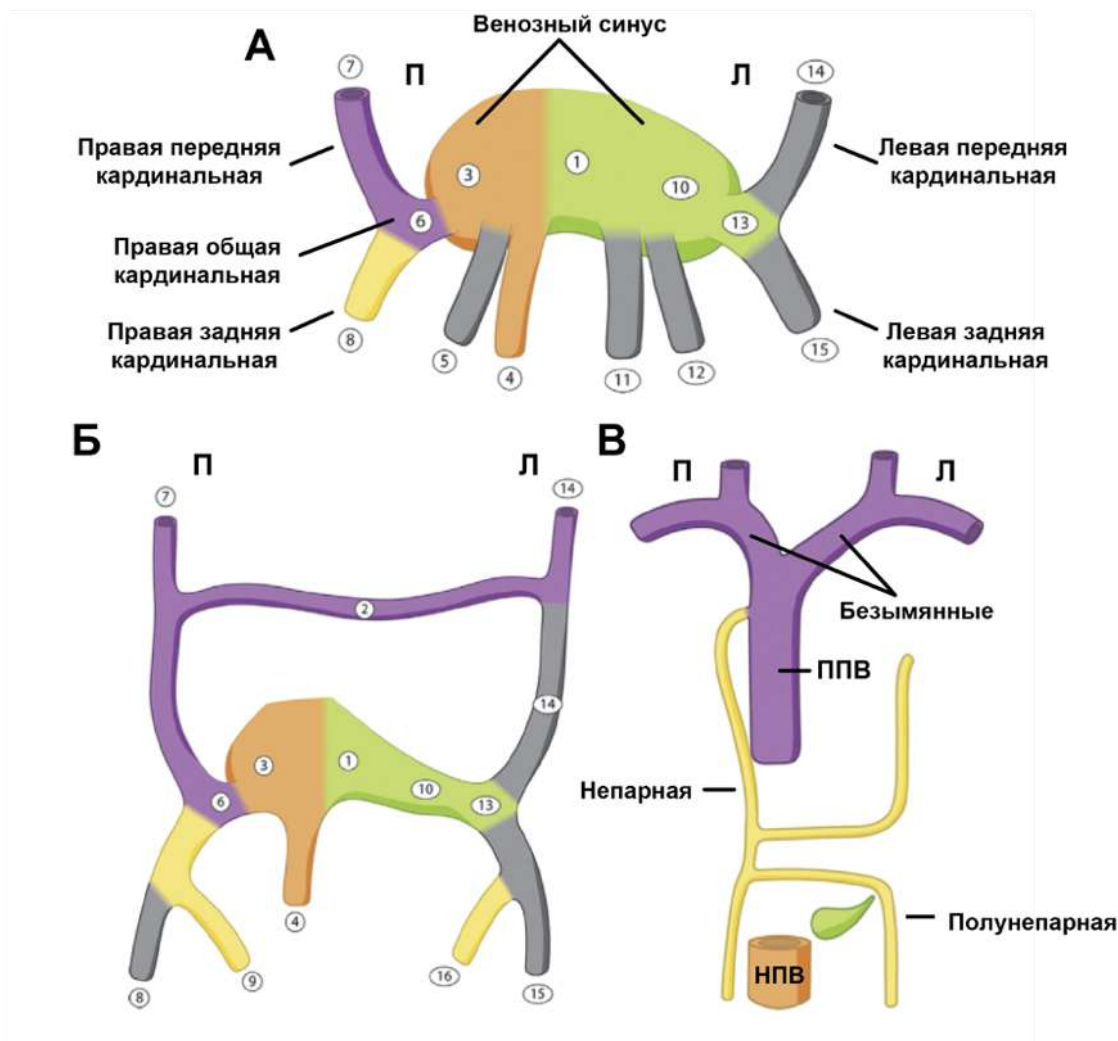


Рисунок 1. Развитие системы полых вен. Вены, обозначенные серым цветом, присутствуют на этапах эмбрионального развития, но в конечном итоге редуцируются. Структуры, обозначенные оранжевым, образуют правое предсердие и нижнюю полую вену (НПВ). Структуры, обозначенные зеленым цветом, преобразуются в коронарную венозную систему. Вены, обозначенные фиолетовым цветом, преобразуются в переднюю (верхнюю) полую вену (ППВ) и безымянные вены. Вены, обозначенные желтым цветом, преобразуются в систему непарных вен. А. Венозная система в раннем эмбриогенезе. Б. Венозная система в позднем эмбриогенезе. В. Зрелая венозная система. П – правая сторона, Л – левая сторона, 1 – центральная часть венозного синуса, 2 – соединяющая вена левой и правой передней кардинальной вены, 3 – правый рог венозного синуса, 4 – правая желточная вена, 5 – правая пупочная вена, 6 – правая общая кардинальная вена, 7 – правая передняя кардинальная вена, 8 – правая задняя кардинальная вена, (9) правая супракардинальная вена, 10 – левый рог венозного синуса, 11 – левая желточная вена, 12 – левая пупочная вена, 13 – левая общая кардинальная вена, 14 – левая передняя кардинальная вена, 15 – левая задняя кардинальная вена, 16 – левая супракардинальная вена. Приведено с изменениями по Mueller, Lu et al, 2015.

II.1.2 Строение миокардиальных рукавов полых вен

Стенка всех торакальных вен состоит из трех слоев: внутренний слой – интима (эндотелий, базальная пластинка), средний слой – медиа (гладкомышечный слой) и

наружный слой – адвентиция (соединительная ткань). У большинства млекопитающих от предсердия через вено-предсердное соединение в стенку вены в составе медиального слоя распространяется миокардиальная ткань, которая располагается снаружи от гладкомышечного слоя. Кардиомиоциты в стенке торакальных вен образуют так называемые «миокардиальные рукава», которые распространяются от предсердия к дистальным участкам вен непрерывно.

Важной анатомической особенностью миокардиальных рукавов человека является то, что они отделены от гладкомышечных клеток слоем фиброзно-жировой ткани. Поэтому между слоями гладкомышечных клеток и кардиомиоцитов нет прямого контакта и взаимодействия. У грызунов миокардиальные рукава также расположены близко к наружной части сосуда и отделены от гладкомышечных клеток слоем коллагеновых и эластических волокон [Mueller-Hoecker et al., 2008].

В основании устья полых вен человека миокардиальный рукав состоит из 5-8 слоев, а в дистальной части - из 1-2 слоев кардиомиоцитов. Пучки миокардиальной ткани располагаются в разных направлениях по отношению к продольной оси вены, что формирует многослойное, гетерогенное миокардиальное покрытие проксимальных участков вен. У человека пучки миокардиальных волокон могут разделяться и смыкаться друг с другом, образуя ячеистую структуру; направление волокон в одном слое может меняться на 90°, что, по-видимому, оказывает влияние на проведение возбуждения [Chen et al., 2004].

У человека в полых венах по направлению от проксимальной к дистальной части как правило наблюдается утолщение слоя фиброзно-жировой ткани. Фиброзная ткань может обособлять кардиомиоциты миокардиальных рукавов в отдельные группы. Таким образом, миокардиальный рукав начинается в проксимальной части как многослойное продолжение миокарда предсердий, а ближе к дистальной части вен становится однослойной структурой, переходящей в мелкие островки кардиомиоцитов, исчезающие в фиброзно-жировой ткани. Фиброзно-жировая ткань может играть важную роль в электрическом разобщении групп кардиомиоцитов миокардиальных рукавов. В настоящее время показано, что неоднородность макроскопической организации миокардиальной ткани в ПВ, наряду с другими факторами, способствует возникновению и поддержанию аритмий [Chen et al., 2004; Hashizume et al., 1995; Spach et al., 1988].

У человека миокардиальная обкладка ПВ может достигать 4.5 см в длину. У собак миокард пучками распространяется на расстояние до 3 см от устья передней полой вены, а у крупного рогатого скота длина миокардиальных рукавов передней полой вены может достигать 13.7 см [Nathan, Gloobe, 1970]. В задней полый вене у большинства

млекопитающих миокардиальная ткань обрывается сразу после вено-предсердного соединения [Nathan, Gloobe, 1970]. Относительно человека, существуют данные, указывающие, что миокардиальная ткань распространяется и в НПВ на расстояние до 1.8 см [Hashizume et al., 1995]. Согласно другим исследованиям, в стенке НПВ у человека миокардиальная ткань отсутствует, что согласуется с тем, что эта область крайне редко является источником предсердных аритмий [Desimone et al., 2012]. Толщина миокардиальной обкладки полых вен у человека составляет от 0.9 до 3.0 мм, и она больше в проксимальной части, по сравнению с дистальной [Hashizume et al., 1995].

Морфологически кардиомиоциты миокардиальных рукавов ППВ собак и человека не отличаются от кардиомиоцитов рабочего миокарда предсердий: содержат большое количество сократительных филаментов, митохондрий, имеют хорошо выраженный саркоплазматический ретикулум [Verheule et al., 2002]. Кардиомиоциты имеют цилиндрическую форму («rod-shaped»), длина кардиомиоцитов в ППВ и ЛВ составляет от 40 до 240 мкм. Во всех кардиомиоцитах торакальных вен можно обнаружить α -актин и винакулин, белки характерные для сократительного аппарата миокардиальной ткани, и не обнаруживаются белков, характерных для гладкомышечной ткани [Yeh et al., 2003].

В миокардиальной ткани торакальных вен имеются вставочные диски, включающие щелевые контакты. Однако в области дистальных участков обкладки связи между клетками гораздо слабее [Ludatscher, 1968; Mueller-Hoecker et al., 2008]. У собак в легочных и полых венах в щелевых контактах между кардиомиоцитами содержатся высокопроводящие коннексины Cx40, 43, а также коннексин 45 на протяжении всего миокардиального рукава. В ППВ у собак были описаны атипичные участки, в которых кардиомиоциты экспрессируют Cx43 в большом количестве и окружены диффузной экспрессией Cx40 [Yeh et al., 2001].

II.1.3 Формирование миокардиальной ткани полых вен в ходе эмбриогенеза

Электрофизиологические свойства миокарда полых вен обусловлены особенностями кардиомиоцитов, которые его формируют. Для того, чтобы составить представление о том, каким электрофизиологическим фенотипом обладают кардиомиоциты в стенке ПВ, необходимо рассмотреть происхождение этих клеток в контексте раннего кардиогенеза, морфогенеза венозного синуса (ВС) и САУ.

Кардиомиоциты, составляющие камеры сердца и «экстракардиальный» миокард, имеют мезодермальное происхождение. В раннем кардиогенезе, на этапе формирования «сердечного полумесяца», в кардиогенной мезодерме выделяют два основных пула клеток, так называемые кардиогенные поля — первое и второе.

Мезодермальные и мезенхимальные клетки, происходящие из билатеральных участков первого кардиогенного поля, формируют первичную сердечную трубку, которая характерна для всех позвоночных животных и выполняет функцию эмбрионального сердца [Stalsberg, DeHaan, 1969]. После формирования сердечной трубки, «первичный» миокард, состоящий всего лишь из двух-трех клеточных слоев, проявляет способность спонтанно сокращаться [Patten, 1949]. При этом спонтанная активность возникает в области венозного (заднего) конца, индуцируя сокращения перистальтического характера, что определяет направленное движение крови от приносящего к выносящему тракту сердечной трубки [Forouhar et al., 2006]. Важно понимать, что сердечная трубка не содержит в себе зачатков будущего венозного синуса, пейсмекера сердца (САУ) и миокарда ПВ [Gittenberger-de Groot et al., 2013]. Однако, механизмы, обеспечивающие спонтанную активность в эмбриональной сердечной трубке и будущем пейсмейкере сходны: миоциты как сердечной трубки, так и САУ экспрессируют ионные каналы, активируемые гиперполяризацией, управляемые циклическими нуклеотидами (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-sensitive channel – HCN каналы). Эти каналы, в частности HCN4, обеспечивают деполяризующий «пейсмекерный» ток I_f [Garcia-Frigola et al., 2003; Später et al., 2013]. Ток I_f является одним из основных механизмов, обеспечивающих медленную диастолическую деполяризацию (МДД), благодаря которой возможно спонтанное возникновение потенциалов действия в пейсмекерных клетках [Aminu et al., 2021; Christoffels et al., 2006; DiFrancesco, 2010].

В ходе дальнейшего развития миокард сердечной трубки теряет пейсмекерные характеристики [Mommersteeg et al., 2007]. Производными первичной сердечной трубки (мезодермы первого кардиогенного поля) в зрелом сердце являются структуры, не обладающие пейсмекерными свойствами: рабочий миокард левого желудочка, часть миокарда правого и левого предсердий зрелого сердца. Роль эмбрионального пейсмекера переходит в область венозного синуса, который формируется за счет прокардиогенных клеток второго кардиогенного поля.

Второе кардиогенное поле служит источником прокардиогенных клеток, которые сформируют целый ряд структур сердца, включая ВС, синоатриальный клапан, атриовентрикулярное соединение, правый желудочек и желудочковую перегородку, часть предсердий, предсердную перегородку, миокардиальную ткань стенки легочных и ПВ [Galli et al., 2008; Snarr et al., 2007]. Клетки второго кардиогенного поля, располагающиеся дорзально от первичной сердечной трубки, активно делятся, мигрируют и формируют «артериальный» и «венозный» полюса эмбрионального сердца позвоночных [Buckingham et al., 2005; Douglas et al., 2011; Kelly et al., 2001]. Мезенхимальные клетки второго

кардиогенного поля на венозном полюсе иммигрируют и встраиваются в стенку проксимальных отделов общих (правой и левой) кардинальных вен и самого каудального отдела сердечной трубки, формируя венозный синус (*sinus venosus*). В результате такой миокардиализации кардинальных вен образуются симметричные удлиненные отделы — рога ВС, которые и составляют его основной объем у млекопитающих [Anderson et al., 2006; Sizarov et al., 2010].

При дальнейшем развитии, в пренатальном периоде происходит редукция ВС: левый рог преобразуется в коронарный синус, правый рог включается в состав стенки правого предсердия в ходе процесса атриализации [Mommersteeg et al., 2007], часть миокарда ВС включается также в состав стенки левого предсердия. Одновременно, передние и задние кардинальные вены, приносящие кровь в ВС на эмбриональных стадиях, преобразуются в верхние полые (краниальные) и непарные вены, соответственно [Mueller et al., 2015; Кузьмин et al., 2017]. Также на основе ВС у всех млекопитающих формируется САУ.

ВС играет роль эмбрионального ритмоводителя с момента завершения петлеобразного изгиба сердечной трубки вплоть до момента окончания так называемого процесса атриализации структур ВС. При этом, пейсмекером является не локализованная, четко ограниченная структура, а целая область, включающая миокард ВС и кардинальных вен [Кузьмин et al., 2017]. Миокард как кардинальных вен, так и всего ВС экспрессирует HCN4-каналы вплоть до позднего пренатального периода [Liang et al., 2013; Singh et al., 2012]. Таким образом, в эмбриональном периоде миокард кардинальных вен является частью комплекса (который также в себя включает миокард ВС и будущего САУ), выполняющим функцию пейсмекера.

В позднем пренатальном периоде, а у некоторых млекопитающих, возможно, и в раннем постнатальном периоде, область миокарда на венозном полюсе сердца, способная к спонтанной автоматической активности, уменьшается. Считается, что потеря пейсмекерной способности в участках миокарда ВС и кардинальных вен (но не САУ) происходит за счет снижения экспрессии каналов HCN4 и усиления экспрессии белков «рабочего» электрофизиологического фенотипа. Таким образом, процесс атриализации заключается не только в морфологическом встраивании участков ВС в правое предсердие, но и изменением электрофизиологических свойств участков ВС, включая кардинальные вены. Другими словами, происходит компактизация и локализация пейсмекера в САУ, а миокардиальная ткань кардинальных вен теряет способность к спонтанной активности. *Миокардиальная ткань полых вен, следовательно, наследует кардиомиоциты кардинальных вен, претерпевших процесс атриализации.*

II.1.4 Молекулярные механизмы контроля развития пейсмекерного и рабочего миокарда

Электрофизиологический фенотип кардиомиоцитов обусловлен наличием определенных групп ионных каналов, мембранных белков, типов белков щелевых контактов. Различают «рабочий» и «пейсмекерный» электрофизиологический фенотип. То, каким фенотипом будут обладать кардиомиоциты, определяется действием транскрипционных факторов (ТФ), которые регулируют экспрессию ионных каналов и мембранных белков в клетках. В ходе кардиогенеза, по мере морфологических изменений структур сердца, происходит и изменение паттернов экспрессии ТФ и, соответственно, фенотипов клеток. Основными ТФ, определяющими судьбы кардиогенных клеток и их электрофизиологический фенотип, являются Nkx2.5, GATA4, Isl1, TBX2/3/5/18/20 [Mommersteeg et al., 2007].

Комплекс ТФ Nkx2.5/TBX5/GATA4 активирует транскрипцию генов, определяющих сократительные и электрофизиологические свойства, характерные для «рабочего» миокарда [Christoffels et al., 2006]. Действие комплекса Nkx2.5/TBX5/GATA4 приводит к подавлению экспрессии каналов пейсмекерного тока – HCN4, но стимулирует экспрессию белков сократительного аппарата, белков щелевых контактов – коннексинов высокой проводимости Cx40 (*Gjal1*) и Cx43 (*Gja5*), потенциал-чувствительных натриевых каналов Nav1.5 (*Scn5a*), генов калиевых каналов Kir2.x (*Kcnj2*, *Kcnj12*). Cx43 и Cx40 являются основными белками щелевых контактов рабочего миокарда предсердий и обеспечивают высокую проводимость между кардиомиоцитами [Nielsen et al., 2012; Rodríguez-Sinovas et al., 2021]. Nav1.5 каналы проводят быстрый деполярирующий натриевый ток I_{Na} , который обеспечивает высокую скорость нарастания переднего фронта и амплитуду ПД, характерную для рабочих кардиомиоцитов [Zipes et al., 2017]. Каналы Kir2.1/2 проводят калиевый ток аномального выпрямления I_{K1} , способствующий поддержанию стабильного потенциала покоя, характерного для зрелого рабочего миокарда [Lopatin, Nichols, 2001].

Транскрипционные факторы TBX2, TBX3, TBX18 препятствуют работе комплекса Nkx2.5/TBX5/GATA4. ТФ TBX2/3/18 подавляют пролиферацию кардиомиоцитов и формирование камер сердца [Mommersteeg et al., 2007; Moorman, Anderson, 2011; Moorman, Christoffels, 2003]. Эти транскрипционные факторы подавляют экспрессию генов Cx40, Cx43 и Nav1.5, но повышают экспрессию генов щелевых контактов низкой проводимости (Cx30.2 и Cx45), а также генов ионных каналов HCN1, HCN4 (каналы пейсмекерного тока I_f). Также, к антагонистам камерообразующего комплекса можно отнести ТФ Isl1, который поддерживает экспрессию HCN4 на ранних этапах эмбриогенеза [Mommersteeg et al., 2007].

Клетки-предшественники кардиомиоцитов, которые будут составлять миокардиальную обкладку ПВ, а именно мезодермальные клетки второго кардиогенного поля, исходно являются Nkx2.5-положительными и Isl1-положительными (Nkx2.5⁺, Isl1⁺) [Ma et al., 2008]. Субпопуляция клеток второго кардиогенного поля во время формирования ВС теряет экспрессию Nkx2.5 и Isl1, однако начинает экспрессировать «пропейсмекерный» ТФ TBX18. Таким образом, в основании рогов ВС – в области устьев правой и/или левой общих кардинальных вен – локализуются Nkx2.5⁻/Isl1⁻/TBX18⁺-предшественники кардиомиоцитов. Экспрессия TBX18 позволяет этой области, включающей в себя клетки ВС, кардинальных вен и будущего САУ, выполнять роль эмбрионального пейсмекера. Далее, в ходе преобразования ВС одновременно происходит два события: атриализация части ВС, которая будет составлять миокардиальную ткань правого предсердия и кардинальных (будущих полых) вен, а также компактизация пейсмекера в САУ. При этом «атриализующиеся» клетки, обретают экспрессию Nkx2.5/GATA4 в комплексе с транскрипционным активатором TBX5. И противоположно, развивающийся САУ оказывается защищен от программы атриализации благодаря повышению экспрессии транскрипционных факторов «пропейсмекерной» генетической программы, TBX3 [Hoogaars et al., 2004, 2007], TBX18 [Wiese et al., 2009] и TBX2 [Christoffels et al., 2004].

Таким образом, развитие миокардиальной ткани ПВ тесно связано с процессом формирования ритмоводителя сердца, САУ. Эти миокардиальные структуры имеют по крайней мере часть общих предшественников – клетки второго кардиогенного поля. В ходе кардиогенеза в клетках-предшественниках кардиомиоцитов, относящимся ко второму кардиогенному полю, неоднократно меняется паттерн экспрессии ТФ. Венозный синус – как предшественник миокарда полых вен и САУ, приобретает способность к пейсмекерной активности благодаря повышению экспрессии TBX18 и подавлению экспрессии Nkx2.5. Однако для обособления и локализации пейсмекера в САУ, необходимо, чтобы большая часть ВС, включая предшественников кардиомиоцитов ПВ, перестроилась на генетическую программу «рабочего электрофизиологического фенотипа». Предположительно, в миокардиальной ткани ПВ должна осуществляться программа атриализации, как и в участке ВС, формирующего миокард стенки правого предсердия: необходимо подавление экспрессии «пропейсмекерных» TBX2, TBX3, TBX18 и усиление экспрессии «камерообразующего» ТФ Nkx2.5. Такая программа атриализации способствует локализации пейсмекерных свойств в одном участке – САУ. Однако, показано, что миокард полых вен способен генерировать спонтанные ПД, проявлять эктопическую биоэлектрическую активность [Ito et al., 1964; Sicouri et al., 2012]. Также известно, что

миокард полых вен может служить источником предсердных аритмий [Ino et al., 2000; Lin et al., 2003; Ooie et al., 2002; Tsai et al., 2000].

II.2 Биоэлектрические свойства миокарда полых вен

II.2.1 Биоэлектрические свойства миокарда полых вен в базальных условиях

Показано, что миокардиальная ткань ПВ функционально активна, способна генерировать ПД и проводить волну возбуждения. Электрическая активность в миокардиальных рукавах ПВ может служить триггером возникновения различных аритмий, в том числе и фибрилляций предсердий [Chen et al., 2004].

Некоторые электрофизиологические свойства миокардиальной ткани полых вен были изучены ранее несколькими исследовательскими группами. В исследованиях 1960-1970х годов Zipes и Кноре, а также Spach et al. показали, что у человека с нормальным синусовым ритмом волна возбуждения от предсердия проходит в миокардиальные рукава ППВ на 2-5 см от границы устья вены (в то время как распространения возбуждения в нижнюю полую вену не было обнаружено). Также было показано, что у собак волна возбуждения может распространяться в ППВ на относительно большее расстояние [Spach et al., 1972; Zipes, Кноре, 1972]. В другом исследовании было показано, что проведение возбуждения от области САУ распространяется в миокард ППВ у кролика, при этом наблюдали блоки проведения в этой области [Ito et al., 1964]. Tsai et al. впервые показали, что миокардиальная ткань ППВ может служить источником эктопической электрической активности, инициирующей возникновение фибрилляции предсердий, а также они продемонстрировали эффективность и безопасность абляции миокарда ППВ [Lu et al., 2001; Tsai et al., 2000]. В другом исследовании было продемонстрировано, что миокардиальные рукава ПВ могут быть источником предсердной тахикардии [Maruyama et al., 2003].

Способность к эктопической электрической активности миокарда ПВ указывает на то, что их биоэлектрические свойства отличаются от таковых в предсердном рабочем миокарде. Исследований, сфокусированных на изучении электрофизиологических характеристик кардиомиоцитов ПВ, крайне мало. Однако некоторые данные были получены, в основном, на миокардиальной ткани ПВ собак или кроликов.

В экспериментах с использованием препаратов правой и левой полых вен собак и кроликов были зарегистрированы ПД различного типа. В этих экспериментах было показано, что в случаях, когда миокард полых вен получает возбуждение от предсердия (САУ), в кардиомиоцитах полых вен ПД имеет фенотип, характерный для рабочего миокарда предсердий. Такие ПД обладают стабильным и высоким уровнем мембранного потенциала покоя (МПП), высокой скоростью нарастания переднего фронта ПД, а также

большой амплитудой ПД. В отсутствие стимуляции МПП в миокарде полых вен нестабилен [Yanaga et al., 1966]. В таких не стимулируемых препаратах были зарегистрированы спонтанные «пейсмекер-подобные» ПД, обладающие фазой МДД, низкими МПП и амплитудой [Arita et al., 1967, 1966; Ito et al., 1964; Sicouri et al., 2012; Yanaga et al., 1966]. В экспериментах Sicouri et al. с использованием различных протоколов электрической стимуляции многоклеточных препаратов ППВ собак было показано, что при стимуляции с базальной частотой (с длительностью цикла 1000 мс) миокард ППВ генерирует ПД, характерные для рабочего миокарда. Однако при высокочастотной стимуляции (с длительностью цикла 100-500 мс) в препаратах ППВ наблюдается гиперполяризация МПП, появляется фаза МДД, а при прекращении стимуляции МПП теряет стабильность и деполяризуется [Sicouri et al., 2012].

Таким образом, в экспериментах на многоклеточных препаратах ПВ собак и кроликов было показано, что волна возбуждения распространяется от предсердия (САУ) через вено-предсердное соединение к дистальным участкам миокардиальных рукавов ПВ. При возбуждении миокарда полых вен от предсердия (САУ) или при внешней электрической стимуляции с базальной частотой, в препаратах ППВ регистрируют характерные «рабочие» ПД. Однако, в отсутствие эндо- или экзогенной стимуляции, в препаратах ППВ можно зарегистрировать пейсмекер-подобную активность.

В начале 2000х были проведены эксперименты на изолированных кардиомиоцитах, полученных из миокардиальной ткани ППВ собак. В этих исследованиях было показано, что кардиомиоциты полых вен не однородны по своим электрофизиологическим характеристиками. Так, Chen et al. показали, что одна группа изолированных кардиомиоцитов ПВ обладала электрофизиологическими свойствами, характерными для рабочего миокарда предсердий, а другая часть клеток обладала пейсмекерными свойствами [Chen et al., 2002]. В этом исследовании в 51% изолированных кардиомиоцитов были зарегистрированы спонтанные ПД, обладающие фазой МДД, сниженными МПП и амплитудой, характерной для САУ. В остальной части кардиомиоцитов не наблюдали спонтанных ПД, а МПП в таких клетках был стабилен. Однако, во всех кардиомиоцитах параметры деполяризующих и реполяризующих токов были сходны. В частности, не было обнаружено различий в плотности тока I_{K1} , который обеспечивает стабильный высокий МПП в предсердных кардиомиоцитах. Плотность тока I_f , необходимого для спонтанной диастолической деполяризации в пейсмекерных кардиомиоцитах САУ, также соответствует уровню, наблюдаемому в предсердиях.

Таким образом, в базальных условиях миокард полых вен, по крайней мере у некоторых млекопитающих, способен проводить возбуждение от САУ и генерировать ПД,

характерные для рабочего миокарда. Однако, в определенных условиях кардиомиоциты полых вен способны проявлять пейсмекерные свойства, генерировать спонтанные ПД, аналогичные таковым в САУ, и инициировать формирование очага эктопической автоматической активности.

II.2.2 Эффекты активации адренергических рецепторов в миокарде полых вен

Существует крайне мало работ, посвященных изучению влияния адренергической стимуляции на биоэлектрические свойства миокарда ПВ. Тем не менее, в нескольких исследованиях было выявлено влияние катехоламинов на сократительную способность в миокарде ПВ крысы и кролика. Норадrenalин (НА), адреналин (АД), изопротеренол (ИЗО) и фенилэфрин (ФЭ) оказывают положительные инотропный и хронотропный эффекты в препаратах левой и правой ППВ у (кролика и крысы, соответственно) [Arita et al., 1967; MacLeod, Hunter, 1967]. У кролика при действии катехоламинов были зарегистрированы изменения в форме и длительности ПД: в миокардиальной ткани ППВ наблюдали увеличение сократительной способности при действии НА и АД, что было ассоциировано с увеличением длительности фазы плато ПД. Кроме того, в отличие от действия НА и АД, у кролика ИЗО вызывал снижение длительности всех фаз реполяризации ПД. Селективный антагонист β -адренорецепторов пропранолол вызывал отрицательные хронотропный и инотропный эффекты, а при длительном действии приводил к полному подавлению возникновения ПД в левой полых вене кролика [Arita et al., 1967].

В экспериментах на изолированных кардиомиоцитах миокардиальной обкладки ППВ собак стимуляция β -адренорецепторов изопротеренолом приводила к увеличению частоты возникновения спонтанных ПД и способствовала проявлению аритмогенной активности [Chen et al., 2002]. ИЗО вызывал ранние и поздние постдеполяризации, что, как считают авторы исследования, было обусловлено увеличением амплитуды пейсмекерного тока I_f . К таким же эффектам приводило действие агониста α -адренорецепторов ФЭ, однако, увеличения тока I_f при этом не наблюдали. В экспериментах на многоклеточных препаратах миокардиальной ткани ППВ собаки в отсутствие внешней электрической стимуляции ИЗО вызывал поздние постдеполяризации и спонтанные ПД в части экспериментов [Sicouri et al., 2012]. В остальных экспериментах ИЗО вызывал усиление уже ранее присутствующей автоматической активности за счет увеличения скорости МДД.

Таким образом, существует небольшое количество данных о влиянии адреноагонистов на некоторые электрофизиологические свойства миокарда полых вен кролика и крыс. Эти данные показывают, что адреностимуляция способствует возникновению спонтанных ПД и проаритмической биоэлектрической активности по

крайней мере в многоклеточных препаратах и изолированных кардиомиоцитах полых вен кролика.

II.3 Симпатическая и адренергическая регуляция электрической активности сердца

Данные, полученные в экспериментах на многоклеточных препаратах и изолированных кардиомиоцитах полых вен, указывают на то, что важную роль в инициации и поддержании проаритмогенной активности играет адренергическая регуляция и симпатический контроль миокардиальных рукавов полых вен. Поэтому, необходимо рассмотреть существующие механизмы адренергической регуляции миокардиальной ткани.

Система адренергической регуляции сердца включает симпатические нервы, гормоны/трансммиттеры и рецепторы. Преганглионарные адренергические нейроны спинного мозга, симпатического ствола, шейных ганглиев и сердечных сплетений образуют синапсы с постганглионарными нейронами. Они распространяются в миокард вдоль коронарных сосудов, заканчиваясь на миоцитах и сосудах всех камер сердца [Kawashima, 2005]. Адренергическая стимуляция приводит к высвобождению катехоламинов, в том числе норадреналина (НА) из постганглионарных нервных окончаний и адреналина (АД) из мозгового вещества надпочечников, которые взаимодействуют с адренорецепторами в миокарде (*Рисунок 2*).

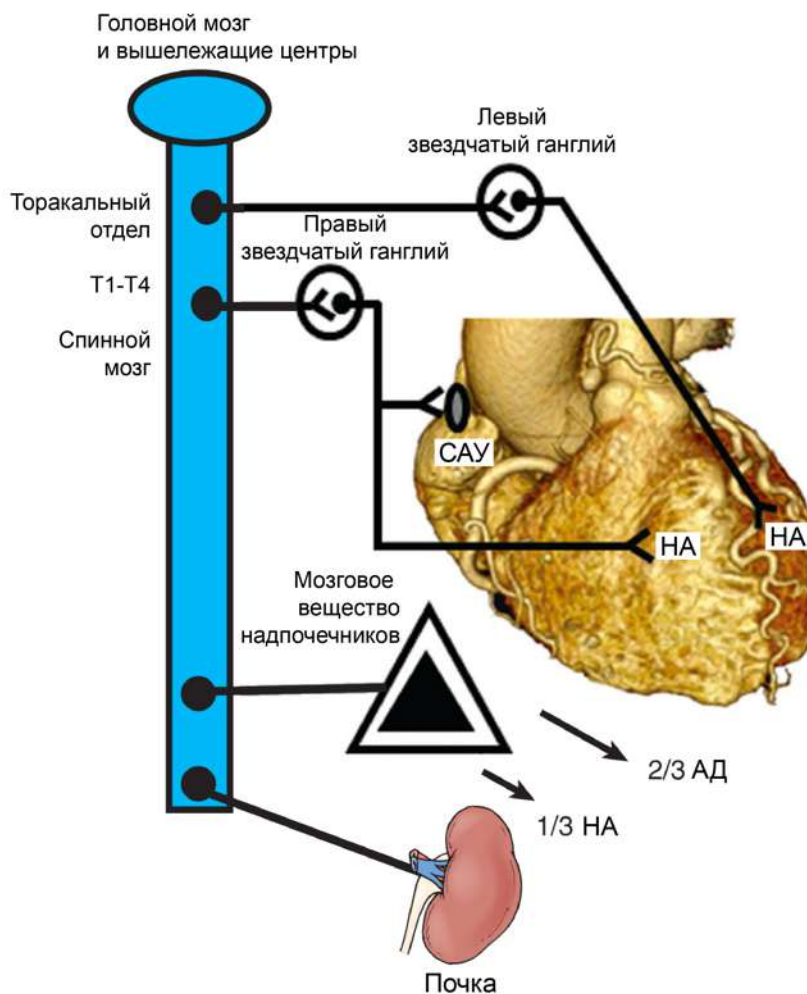


Рисунок 2. Система адренергического контроля сердца, включающая головной мозг, спинной мозг, симпатическую цепочку (левый и правый звездчатые ганглии, ганглии торакального отдела Т1-Т4 спинного мозга), мозговое вещество надпочечников, а также нервы, иннервирующие почки. НА – норадреналин, АД – адреналин. Приведено с изменениями по Zipes D.P., Jalife J. Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside, Fourth Edition. 6th ed. Philadelphia, 2004. Vol. 110. 453–453 p. [Zipes et al., 2017].

II.3.1 Адренергические рецепторы - экспрессия и локализация в сердце

По сегодняшним представлениям, существует 3 семейства адренорецепторов (АР): α_1 , α_2 и β . Каждое семейство включает в себя три изоформы рецепторов: α_{1A} -, α_{1B} -, α_{1D} -, α_{2A} -, α_{2B} -, α_{2C} -, β_1 -, β_2 - и β_3 - АР [Brodde et al., 2006]. Адренергические α - и β - рецепторы активируются катехоламинами, в частности адреналином или норадреналином, которые эндогенно поступают в миокард из окончаний постганглионарных симпатических волокон, с кровотоком от мозгового вещества надпочечников или из хромаффинных адренергических клеток эмбрионального миокарда.

У взрослых млекопитающих в миокарде преобладают β -АР и составляют около 85% всех АР. β -АР присутствуют во всех отделах сердца – узлах автоматии (синусном и атриовентрикулярном), проводящей системе, предсердном и желудочковом рабочем

миокарде [Riemann et al., 2003]. β_1 -АР являются основными адренорецепторами сердца, соотношение экспрессии β_1 -АР и β_2 -АР: 7:3 в предсердиях и 8:2 в желудочках. У человека в САУ плотность β -АР примерно в 3 раза выше по сравнению с предсердиями, при этом, хоть и β_1 -АР являются преобладающими, плотность β_2 -АР в САУ примерно в 2.5 раза выше по сравнению с миокардом правого предсердия [Rodefeld et al., 1996].

В дополнение к β_1 -АР и β_2 -АР у человека обнаружен и тип β_3 -АР. Экспрессия генов β_3 -АР была обнаружена в эндокарде межжелудочковой перегородки и левого предсердия у человека [Gauthier et al., 1996; Strosberg, 1997]. Существует мнение, что экспрессия β_3 -АР находится на низком уровне в нормальных условиях, однако, она значительно повышена при различных патологиях сердца, в частности при различных аритмиях [Hasan, 2013; Zhou et al., 2018].

В меньшем количестве в миокарде представлены α -АР. У большинства видов, включая мышь, морскую свинку, кролика, свинью и корову, уровни α_1 -АР в сердце, определяемые радиолигандным связыванием, относительно постоянны, за исключением крыс, у которых уровень α_1 -АР в 10 раз выше. В настоящее время у человека в сердце обнаружены как α_1 -, так и α_2 -АР. Однако количество α_2 -АР в миокарде намного ниже, чем α_1 -АР, плотность которых в сердце человека составляет до 10-15% относительно всех АР [Brodde, Michel, 1999]. В сердечной ткани присутствуют подтипы α_{1A} , α_{1B} и в меньшей степени α_{1D} -АР [Colucci et al., 1986]. Преобладающим является α_{1B} подтип, α_{1A} - и α_{1B} -подтипы АР экспрессируются в соотношении 1:2-4 в кардиомиоцитах [O'Connell et al., 2003; Rokosh, Simpson, 2002]. Несмотря на присутствие мРНК α_{1D} -АР, у грызунов в сердце, по-видимому, не экспрессируется белок α_{1D} -АР в кардиомиоцитах [O'Connell et al., 2003], однако α_{1D} -АР были обнаружены в коронарных сосудах [Chalothorn et al., 2003]. У человека преобладающим подтипом также является α_{1B} -АР [O'Connell et al., 2003], а α_{1D} -АР присутствуют только в коронарных сосудах [Jensen et al., 2009].

Интересна локализация α_1 -АР в кардиомиоцитах. На мышцах было показано, что у взрослых животных как α_{1A} -АР, так и α_{1B} -АР преимущественно локализуются и проводят сигналы на ядерной мембране, а не на плазматической мембране кардиомиоцитов [O'Connell et al., 2014].

II.3.2 Экспрессия адренорецепторов у неонатальных и взрослых млекопитающих

Установлено, что в ходе онтогенеза экспрессия и распределение адренергических рецепторов меняется. В сердце неонатальных крыс установлено присутствие β -АР, а также и α_1 -АР. Существуют свидетельства, что по мере взросления животного и развития

миокарда и вегетативной иннервации постепенно увеличивается β_1 -адренергический контроль сердечного ритма [Ebert, Taylor, 2006; Natarajan et al., 2004].

Было показано, что в ходе пренатального и постнатального онтогенеза плотность β -АР возрастает, при этом аффинность этих рецепторов не меняется [Chen et al., 1979]. Данные результаты были получены с использованием метода меченного лиганда, а также оценки физиологического ответа на добавление селективного β_1 -агониста изопротеренола в миокарде мышей: эффект увеличения ритма сердца в ответ на изопротеренол появлялся только на третий семестр пренатального периода, что совпадало с увеличением плотности β -АР в сердце. Таким образом, в течение пренатального периода происходит постепенное увеличение плотности β -АР: на 13 день эмбрионального развития плотность β -АР крайне низкая и ответа на изопротеренол не наблюдается, но уже к 21 дню в эмбриональном сердце плотность β -АР составляет 75% от уровня плотности рецепторов у взрослых животных. Плотность β -АР возрастает до 93% от уровня у взрослых животных к 1 дню постнатального развития. Затем, к 3 дню постнатального развития плотность β -АР резко возрастает до 168% и этот пик сохраняется в течение 14 дней, после чего постепенно плотность β -АР снижается но нормального для взрослого сердца уровня [Chen et al., 1979].

В отличие от β -АР, плотность α_1 -АР в эмбриональном сердце мышей на 15-20 день пренатального развития практически такая же, как и во взрослом сердце [Yamada et al., 1980]. После рождения у неонатальных животных происходит увеличение плотности α_1 -АР, при этом аффинность рецепторов не меняется, как и в случае с β -АР. Развитие пика плотности α_1 -АР в неонатальном периоде является сходным с таковым для β -АР: у мышей к 14 дню постнатального онтогенеза плотность α_1 -АР – максимальная и практически в два раза выше, чем во взрослом сердце, начиная с 21 дня наблюдается постепенное снижение плотности α_1 -АР, к 21 дню плотность устанавливается на уровне, характерному для взрослых животных. Аналогичные данные были представлены и в сердце неонатальных крыс [Schaffer, Williams, 1986]. В другом исследовании, методом вестерн-блот было показано, что в ходе постнатального онтогенеза количество подтипов α_{1A} - и α_{1D} -АР не меняется, в то время как количество α_{1B} -АР становится значительно больше в сердце взрослых крыс, по сравнению с неонатальными [Shen et al., 2000].

II.3.3 Адренергические рецепторы и внутриклеточные сигнальные пути, сопряженные с активацией АР

Все адренорецепторы относятся к классу G-белок-связанных мембранных рецепторов (G-protein-coupled receptors, GPCRs) [Latek et al., 2012]. Адренорецепторы связаны с разными G-белками, α или $\beta\gamma$ субъединицы которых взаимодействуют с разными

мишенями, либо активируя, либо ингибируя их функции. α_1 -АР связаны с G_q -белком, α_2 -АР связаны с G_i -белком, β_1 - и β_2 -АР связаны с G_s -белком, а β_3 -АР с G_i -или G_s - белком [Ahles, Engelhardt, 2014].

α_1 -адренорецепторы

Известны три подтипа α_1 -АР: α_{1A} , α_{1B} и α_{1D} [Bylund et al., 1994]. α_1 -АР являются GPCR-рецепторами, связанными с $G_{q/11}$ -белком [Snabaitis et al., 2005] (Рисунок 3).

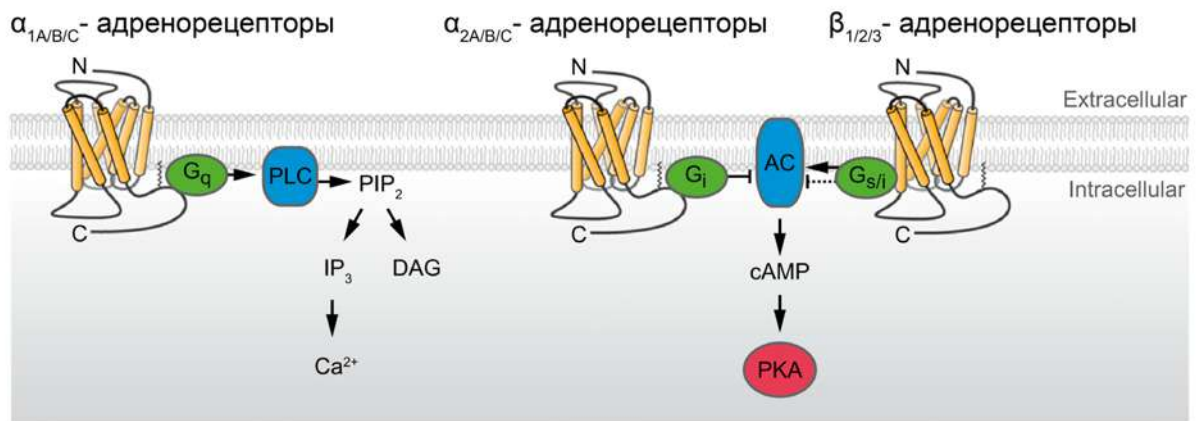


Рисунок 3. Сигнальная передача адренорецепторов. Активируемые катехоламинами α_1 -АР активируют G_q -белки, которые, в свою очередь, активируют фосфолипазу-С (PLC) и тем самым повышают концентрацию инозитолтрифосфата (IP₃) и внутриклеточного Ca²⁺. α_2 -АР связаны с G_i -белком и ингибируют аденилатциклазу (AC). β_1 -, β_2 - и β_3 -АР связаны с G_s -белком, активируют аденилатциклазу (AC) и способствуют увеличению внутриклеточного цАМФ (cAMP). цАМФ активирует протеинкиназу А (PKA), регулирующую активность множества белков. С изменениями по Ahles, Engelhardt, 2014.

Конвенциональная модель сигнального пути активации α_1 -АР – активация рецептора на плазматической мембране, которая инициирует последующую передачу сигнала внутри клетки «outside-in» [O’Connell et al., 2014]. В этой модели стимуляция α_1 -АР и $G_{q/11}$ -белка на плазматической мембране приводит к активации фосфатидил-инозитольного внутриклеточного каскада: $G_{\alpha q/11}$ -субъединица активированного АР связывается с фосфолипазой С (PLC- β) и стимулирует ее, что ведет к гидролизу фосфолипидного компонента клеточной мембраны фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (PIP₂) на два вторичных посредника инозитолтрифосфат (IP₃) и диацилглицерол (DAG).

IP₃ связывается с «инозитольными рецепторами» (IP₃R) на мембране саркоплазматического ретикулума. Активация IP₃R ведет к выбросу кальция из саркоплазматического ретикулума (СПР) и увеличению его уровня в цитоплазме [Ahles, Engelhardt, 2014; Pierpont et al., 1985].

Основной мишенью вторичного посредника DAG является семейство DAG-зависимых протеинкиназ С (PKC). PKC относится к классу серин/треониновых киназ, экспрессируется во многих тканях и органах млекопитающих, в том числе и в сердце

[Pucéat, Vassort, 1996]. Активированная РКС может фосфорилировать множество ионных каналов и транспортеров, реализуя таким образом «быстрые» эффекты. Кроме того, РКС может определять и «отставленные» эффекты в сердце, в частности, регулировать рост и пролиферацию миоцитов, влияя на транскрипцию генов [Steinberg, 2012].

Другая модель сигнального пути α_1 -АР – активация рецептора на ядерной мембране. Показано, что GPCR-рецепторы локализуются в ядре и проводят сигнал «inside-out». Ядерная передача сигналов наблюдается в нескольких типах клеток, включая кардиомиоциты сердца [Bkaily et al., 2009]. Для активации ядерных α_1 -АР необходимо проникновение лиганда (например, норадреналина) через внешнюю плазматическую мембрану клетки, транспортировка в ядро, связывание и активация рецептора на внутренней мембране ядра. В нейрональных клетках такой процесс проникновения лиганда внутрь ядра обеспечивает переносчик органических катионов 3 (organic cation transporter 3 – OCT3). Экспрессия OCT3 в сердце среди других органов наиболее высокая, OCT3 находится как на плазматической, так и на ядерной мембране зрелых кардиомиоцитов [Wright et al., 2008; Zwart et al., 2001]. В неонатальных кардиомиоцитах так же наблюдали проникновение меченого норадреналина ($[^3\text{H}]\text{НА}$), однако в отличие от зрелых кардиомиоцитов, время проникновения радиолиганда составляло около часа, что недостаточно для обеспечения быстрой ядерной α_1 -АР сигнализации [Buu et al., 1993]. Показано, что в культурах клеток взрослых кардиомиоцитов мышей захват катехоламинов в ядро, наоборот, происходит быстро. В этой системе поглощение катехоламина начинается в течение нескольких секунд, явно увеличивается через 5 минут после введения, достигает максимума через 30 минут и нейтрализуется добавлением немеченого НА [Wright et al., 2008].

В пользу модели ядерной сигнализации играет тот факт, что после добавления агониста существует длительная задержка ответа активации α_1 -АР, в отличие от быстрого проявления эффектов при активации β -АР. В частности, задержка эффекта на сократительную активность или кальциевую динамику в ответ на добавление α_1 -АР-агониста составляет 2-5 минут, в то время как эффекты активации β -АР в сарколемме проявляются в течение секунд [O’Connell et al., 2014].

Классическая мишень α_1 -АР – PLC- β , возможно, не участвует в сигнальном пути ядерных α_1 -АР. Одним из возможных участников сигнального пути, активируемого ядерными α_1 -АР, является киназа ERK (extracellular signal-regulated kinase) в кавеолах на плазматической мембране [Wright et al., 2008] (Рисунок 4). Однако, неизвестно, каким образом сигнал из ядра достигает цитоплазматических мишеней. Возможно, посредником этого варианта передачи сигнала является РКС, которая, как известно, может

транслоцироваться в цитоплазме после активации [O'Connell et al., 2014]. Другим медиатором ядерной α_1 -АР передачи может являться PLC- ϵ , которая может регулироваться малыми ГТФ-азами (Rho, Ras, Rap) и субъединицами $G_{\beta\gamma}$, но не $G_{\alpha q}$ [Lopez et al., 2001]. Многие данные свидетельствуют о том, что PLC- ϵ опосредует физиологическую гипертрофию миокарда путем гидролиза фосфатидилинозитол 4-фосфата (PI4P) в ядерной оболочке с образованием DAG и активацией протеинкиназы D (PKD), но механизмы, лежащие в основе их взаимодействия, неясны [Zhang et al., 2013].

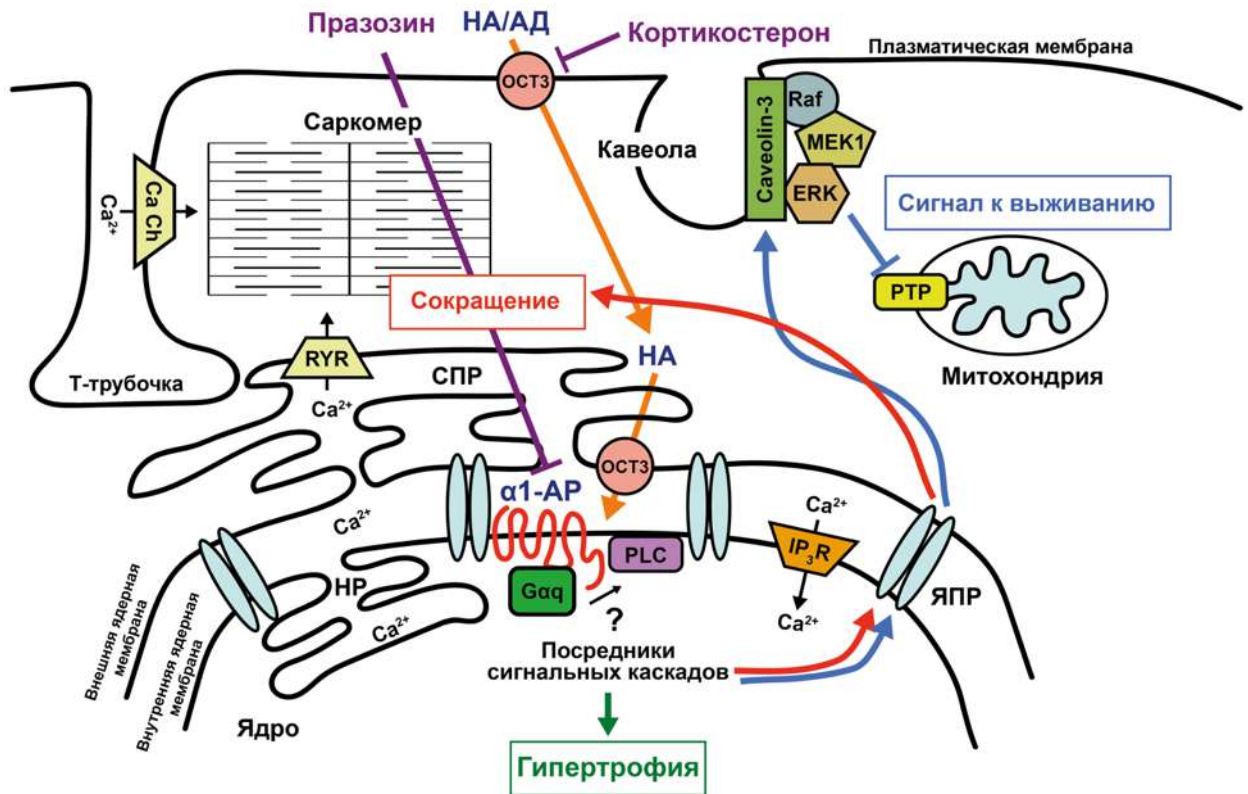


Рисунок 4. Модель сигнального пути при активации ядерных α_1 -АР. В зрелых кардиомиоцитах катехоламины-агонисты α_1 -АР (АД, НА) активно транспортируются в цитоплазму кардиомиоцита переносчиком органических катионов 3 (organic cation transporter 3 – OCT3), транспортировка может быть заблокирована кортикостероном. Антагонист α_1 -АР – празозин (и аналоги) способен проникать через мембраны и ингибировать передачу сигнала ядерных α_1 -АР. Данная модель предполагает, что α_1 -АР локализуется на внутренней мембране ядра, при этом, лиганд-связывающий домен находится в пространстве между внешней и внутренней мембраной ядра. Исходя из такой ориентации рецептора, связывание агонистов α_1 -АР активируют сигнальные пути внутри ядра, возможно посредством $G_{\alpha q}$ субъединицы, однако внутриядерные пути передачи сигнала неизвестны. Предполагается, что активация ядерных α_1 -АР может индуцировать внутриядерные сигналы физиологической гипертрофии, а также внеядерные сигналы, включающие активацию киназы ERK в кавеолах и передачу сигналов «выживания», либо к фосфорилированию сердечного тропонина I в саркомерах и регуляции сократительной активности. Ca Ch – кальциевый канал (calcium channel); RYR – рианодинорецептор; PTP – пора-транспортер проницаемости митохондрий, (mitochondrial permeability transition pore); СПР – саркоплазматический ретикулум; НР – нуклеоплазматический ретикулум; ЯПР – ядерно-поровый комплекс. С изменениями по O'Connell, Jensen и др., 2014b.

Активация α_1 -АР приводит к положительному инотропному эффекту [Benfey, 1982; Brodde, Michel, 1999; Li et al., 1997; Terzic et al., 1993]. Однако, максимальный инотропный эффект, развиваемый при активации α_1 -АР, значительно меньше по сравнению с таковым при стимуляции β -АР у человека. Длительная стимуляция α_1 -АР также приводит к развитию гипертрофии миокарда [Schlüter, Piper, 1999; Simpson, 1983], что может быть обусловлено действием ядерных α_1 -АР.

α_2 -адренорецепторы

Известны три подтипа α_2 -АР: α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} . α_2 -АР являются GPCR-рецепторами, связанными с G_i -белком. Активированная $G_{\alpha i}$ -субъединица ингибирует работу аденилатциклазы (АС), в следствие чего снижается цитоплазматический уровень циклического сАМР и, соответственно, активность протеинкиназы А (РКА) (Рисунок 3). РКА фосфорилирует различные белки, включая ферменты, ионные каналы и рецепторы. На данный момент известно, что α_2 -АР присутствуют в симпатических нервных окончаниях, иннервирующих сердечную мышцу. Пресинаптические α_2 -АР участвуют в регуляции высвобождения норадреналина в миокарде. Постсинаптические α_2 -АР стимулируют приток Ca^{2+} , активируют K^+ -каналы, фосфолипазу А2 (PLA2) и Na^+/H^+ обменник [Bylund et al., 1988]. В нескольких исследованиях показано наличие всех трех подтипов α_2 -АР в эндокарде, но количество этих рецепторов примерно в 30 раз меньше, чем α_1 -АР [Berkowitz et al., 1994].

α_2 -АР играют важную роль в пресинаптической регуляции: α_2 -АР ингибируют выброс норадреналина в изолированном предсердии человека *ex vivo* и *in vivo* [Minatoguchi et al., 1995; Parker et al., 1995; Rump et al., 1995, 1995].

β -адренорецепторы

Известны три подтипа β -АР: β_1 -, β_2 - и β_3 - АР. β -АР являются GPCR-рецепторами, связанными с G_s -белком. Активация β -АР приводит к диссоциации субъединиц G-белка, при этом $G_{\alpha s}$ -субъединица активирует аденилатциклазу, вследствие чего происходит увеличение количества внутриклеточного сАМР. Последний активирует протеинкиназу А (РКА) за счет диссоциации молекулы на регуляторную и каталитическую субъединицы (Рисунок 3). РКА имеет множество различных мишеней для фосфорилирования. В миокарде РКА фосфорилирует множество белков, в частности, вовлеченных в механизм электромеханического сопряжения: кальциевые каналы L-типа, фосфоламбан и тропонин I [Bers, 2002]. Эндогенными агонистами β -АР являются нейротрансмиттер норадреналин и гормон адреналин. Норадреналин (НА) высвобождается при симпатической стимуляции из постганглионарных волокон. НА в 60 раз селективнее к β_1 -АР по сравнению с β_2 -адренорецепторам. Адреналин (АД) является основным адренергическим гормоном,

синтезируемым в мозговом веществе надпочечников и поступает в сердце с кровотоком. АД имеет одинаковую селективность к β_1 - и β_2 -АР [Riemann et al., 2003].

Стимуляция β_1 -АР и β_2 -АР рецепторов приводит к положительным инотропному и хронотропному эффектам, а также к увеличению минутного объема кровообращения [Brodde, Michel, 1999]. 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, Michel, 1999].

β_1 -АР модулируют сократительную способность сердца исключительно через сАМР-зависимый механизм. Однако механизмы, лежащие в основе действия β_2 -АР в кардиомиоцитах, менее понятны. β_2 -АР также могут связываться и активировать АС, однако, экспериментально показано, что связь между β_2 -АР-зависимым увеличением сАМР и инотропными эффектами в сердце является незначительной. Вероятно, что сигнальные пути, опосредующие β_1 - и β_2 -АР-зависимую модуляцию сократительной функции, отличаются [Shen et al., 2000].

Минорные β_3 -АР могут быть ассоциированы как с $G_{\alpha i}$, так и с $G_{\alpha s}$ -субъединицами G-белка. Стимуляция β_3 -АР может приводить к отрицательному инотропному эффекту, что связывают с возможной активацией Gi-белка и синтаз оксида азота (eNOS и nNOS) и увеличению продукции оксида азота [Tavernier et al., 2003]. Однако, также показано, что активация β_3 -АР может вызывать и положительный инотропный эффект и увеличение кальциевого тока L-типа (I_{CaL}) посредством активации $G_{\alpha s}$ -белка и PKA [Skeberdis et al., 2008].

III.3.4 Онтогенез симпатической иннервации миокарда

Для обеспечения нормальной адренергической регуляции сердца необходима активация адренорецепторов эндогенными агонистами – адреналином и норадреналином. В зрелом сердце существует развитая система вегетативных нервных окончаний, которые являются источниками этих эндогенных агонистов, однако на ранних стадиях онтогенеза такая система еще не развита, и регуляция, возможно, в большей степени осуществляется за счет ненейрональных источников катехоламинов.

Время установления функционально активной симпатической иннервации различается у разных видов млекопитающих – это может быть поздний пренатальный, либо ранний постнатальный период онтогенеза. Так, у крыс, кроликов и мышей симпатические окончания в сердце отсутствуют до рождения [Friedman et al., 1968]. У крыс первые пучки

симпатических нервных волокон прорастают к участкам правого предсердия и САУ к 8-10 дню постнатального развития, и только к 22 дню нервные терминалы достигают миокарда желудочков. Полноценная симпатическая иннервация у крыс формируется только к 8 неделе постнатального развития [Lipp, Rudolph, 1972]. Таким образом, симпатический контроль сердечного ритма у грызунов осуществляется только в постнатальном онтогенезе [Tucker, 1985]. У морских свинок, овцы и человека симпатическая иннервация может быть выявлена уже на поздних стадиях плодного периода развития [Lebowitz et al., 1972; Lipp, Rudolph, 1972; Yiallourou et al., 2012]. Уже при рождении у морских свинок симпатические терминалы присутствуют в предсердиях, но не в желудочках. Развитую сеть симпатических нервов, которые прорастают и ветвятся и в предсердиях и в желудочках, у морской свинки можно наблюдать через два месяца после рождения [Lipp, Rudolph, 1972].

У человека большинство симпатических нейронов подходят к сердцу от звездчатого ганглия, который располагается на уровне первого ребра. Меньшая часть симпатических окончаний идет от среднего шейного ганглия [Janes et al., 1986]. Некоторые исследователи утверждают, что в ходе процесса формирования симпатической иннервации постганглионарные симпатические нейроны «используют» парасимпатические пути, чтобы прорасти к сердцу [Hildreth et al., 2009].

Иннервирующие сердце парасимпатические и симпатические волокна образуют нервное сердечное сплетение, которое располагается между аортой и легочным стволом. От сердечного сплетения вегетативные волокна поступают к сердцу вдоль коронарных артерий и далее разветвляются на ветви, идущие к предсердиям и желудочкам [Kawashima, 2005]. Нейроны, идущие от сердечного сплетения, могут иннервировать структуры сердца напрямую, либо через вставочные нейроны, расположенные в сердечных ганглиях. Количество сердечных ганглиев различается у разных видов животных. У млекопитающих сердечные ганглии преимущественно расположены вокруг предсердий в устьях легочных и полых вен. От этих ганглиев нервы распространяются к синоатриальному и атриовентрикулярному узлам [Armour et al., 1997; Baptista, Kirby, 1997]. У человека в среднем в сердце насчитывается 700-900 сердечных ганглиев, и около половины всех ганглиев находятся на дорсальной и дорсолатеральной поверхности левого предсердия [Pauza et al., 2000].

П.3.5 Экстра- и интракардиальные источники катехоламинов в сердце млекопитающих

Известно, что у разных животных и у человека установление вегетативной иннервации сердца происходит в разные моменты раннего онтогенеза. Показано, что

парасимпатические окончания присутствуют в миокарде эмбрионального сердца прежде, чем происходит «прорастание» симпатических терминалей [Marvin et al., 1980; Pappano, 1990]. Таким образом, в пренатальном периоде вегетативная регуляция сердечного ритма в основном осуществляется за счет парасимпатических влияний. Однако, до момента установления симпатической иннервации, в регуляцию сердечного ритма могут вносить вклад циркулирующие катехоламины [Ebert, Taylor, 2006].

Были проведены исследования с использованием фармакологических и хирургических подходов для определения вклада симпатических нервных волокон, мозгового вещества надпочечников и «надпочечниковых» источников катехоламинов в функциональный адренергический контроль работы сердца у неонатальных крыс [Tucker, 1985]. В этом исследовании было продемонстрировано, что при блокировке выброса НА из нервных терминалей (блокатор – бретилий), либо при химической симпатэктомии ритм сердца значительно замедляется у неонатальных крыс возраста 2, 5 и 8 дней на 29-54 уд/мин. При блокировке ганглия, регулирующего секрецию катехоламинов надпочечниками (гексаметоний), либо при хирургическом удалении надпочечников, сердечный ритм снижается еще больше, при этом больший эффект наблюдается в группах неонатальных крыс возраста 2 и 8 дней по сравнению с 24-дневными животными. На последнем этапе эксперимента с использованием β_1 -блокатора (атенолол), было установлено, что существуют другие источники катехоламинов в сердце, которые секретируются не симпатическими терминалями и не мозговым веществом надпочечников. При блокировке адренорецепторов наблюдается максимальное снижение сердечного ритма, при этом в наибольшей степени – в группах животных возраста 2 и 8 дней, и в меньшей – в группе 24 дней. Таким образом, большой вклад в адренергическую регуляцию сердечной деятельности у неонатальных животных оказывают циркулирующие катехоламины ненейронального и «надпочечникового» происхождения.

Одним из возможных источников катехоламинов в неонатальном сердце могут быть так называемые ненейрональные катехоламинергические клетки (КХК), которые локально поддерживают уровень катехоламинов в сердце еще до установления симпатической иннервации [Ignarro, Shideman, 1968; Miyagishima, 1975]. Изначально предполагали, что «эмбриональные» катехоламины сердца необходимы для поддержания пейсмекерной активности клеток САУ. Это предположение не было подтверждено, поскольку клетки-пейсмекеры демонстрируют спонтанную активность и без адренергической стимуляции [Vinogradova et al., 2006]. Оказалось, что эмбриональные катехоламины сердца необходимы для нормального развития его структур. Было показано, что как снижение, так и повышение

уровня катехоламинов в критические периоды органогенеза приводит к серьезным дисфункциям работы сердца у мышей и у человека [Sissman, 1970; Thomas et al., 1995].

Полагают, что КХК эмбрионального сердца располагаются кластерами вблизи пейсмекерных структур и участков проводящей системы, включая САУ, атриовентрикулярный узел, пучки Гиса и систему волокон Пуркинье [Ebert, Thompson, 2001]. Существуют исследования, показывающие, что по мере развития сердца, КХК утрачивают свою секреторную функцию и дифференцируются в клетки САУ, проводящей системы, а также и в другие типы кардиомиоцитов [Ebert et al., 2004; Garcia-Frigola et al., 2003]. Считают, что в ходе процесса дифференцировки, в этих клетках происходит снижение экспрессии ферментов, участвующих в биосинтезе катехоламинов, а экспрессия специфических для миокарда генов повышается. Это предположение поддержано несколькими фактами. Например, в структурах развивающегося САУ были обнаружены КХК, у которых был относительно повышенный уровень экспрессии α -актина, структурного элемента саркомеров [Ebert, Thompson, 2001]. В другом исследовании было показано, что КХК способны генерировать «кальциевые спарки» (спонтанные выбросы Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума в цитоплазму), что является характеристикой, присущей пейсмекерным клеткам САУ [Huang et al., 2005].

II.3.6 Влияние активации α - и β -АР на электрофизиологические характеристики кардиомиоцитов у некоторых животных и человека

Активация α - и β -АР у разных млекопитающих и в различных отделах миокарда приводит разным эффектам на электрофизические характеристики кардиомиоцитов. Поэтому ниже будут приведены примеры, широко известные из литературных данных.

Активация АР в кардиомиоцитах запускает ряд молекулярных внутриклеточных каскадов, что в итоге приводит к изменению функционального состояния ионных каналов мембраны. Изменение в работе ионных каналов означает и изменение амплитуды токов, уровня мембранного потенциала покоя (МПП) и конфигурации ПД. Изменение формы ПД можно оценить, используя ряд принятых параметров, таких как длительность ПД на уровне реполяризации 30%, 50% или 90% (ДПД_{30/50/90}).

Существует достаточно данных о влиянии адренергической стимуляции на ПД и МПП в различных отделах миокарда. У разных животных и в разных отделах сердца действие агонистов адренорецепторов может по-разному влиять на форму ПД и уровень МПП. Например, у собак в желудочковом миокарде β -адренергическая стимуляция изопротеренолом (агонист β -АР) приводит к укорочению фазы поздней реполяризации ПД – ДПД₉₀ (Рисунок 5) [Stengl et al., 2006; Volders, 2003]. У человека действие адреналина,

норадреналина и изопротеренола приводит к увеличению длительности ДПД₉₀ (Рисунок 5) [Eckel et al., 1982; Koumi et al., 1995].

При стимуляции β -АР происходит регуляция отдельных ионных каналов путем их фосфорилирования сАМР-зависимой протеинкиназой А (РКА). Например, РКА-зависимое фосфорилирование повышает активность кальциевых каналов L-типа, что приводит к увеличению входа кальция в кардиомиоцит, увеличению длительности ПД, а также увеличению внутриклеточного Ca^{2+} , который входит в систему саркоплазматического ретикулула. РКА-фосфорилирование также активирует ключевые внутриклеточные кальциевые каналы саркоплазматического ретикулула – рианодиновые рецепторы (RyR2), участвующие в выбросе кальциевых спарков, необходимых для мышечного сокращения [Marx et al., 2000]. Также, при адренергической стимуляции происходит фосфорилирование фосфоламбана, при этом он диссоциирует от сарко/эндоплазматической Ca^{2+} -АТФазы (SERCA), которая закачивает Ca^{2+} внутрь СПР, что повышает уровень Ca^{2+} в цитоплазме [Zipes et al., 2017].

Также, РКА-зависимое фосфорилирование повышает активность реполяризирующих калиевых каналов тока I_{Ks} . В этом случае, увеличение реполяризирующего тока I_{Ks} - противоположно влияет на длительность ПД, снижая ее [Kass, Wieggers, 1982]. Конечный эффект β -адренергической стимуляции будет зависеть от плотности деполяризирующих и реполяризирующих токов, подверженных РКА-зависимому фосфорилированию в кардиомиоцитах, а также и от концентрации катехоламинов.

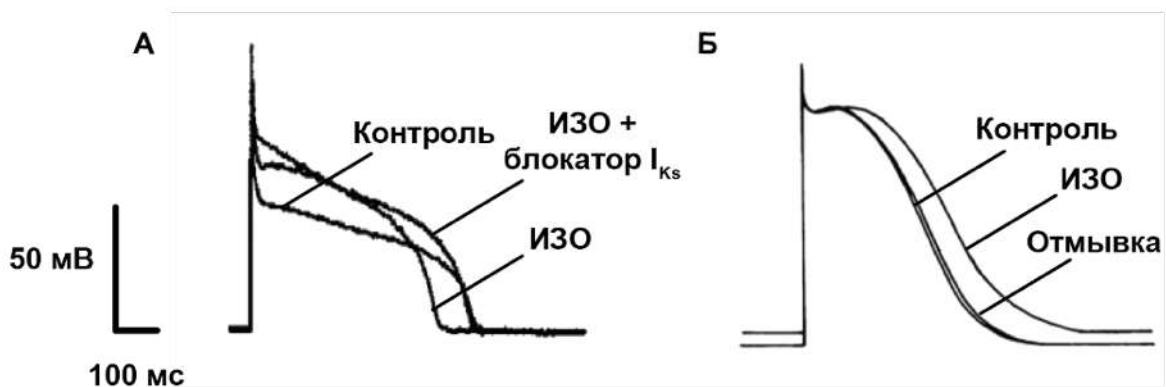


Рисунок 5. Примеры эффектов селективного агониста β -адренорецепторов изопротеренола (ИЗО) на длительность ПД в кардиомиоцитах желудочка у собак (А) и у человека (Б). Приведено с изменениями по Koumi, Backer et al, 1995; Volders, 2003.

В рабочем миокарде желудочков и предсердий β -адренергическая стимуляция приводит к гиперполяризации МПП. Этот эффект наблюдается как в ритмически возбуждаемом, так и в покое миокарде [Tamargo et al., 2004].

Селективная активация α -адренорецепторов фенилэфрином (агонист α_1 -АР) приводит к увеличению ДПД₉₀ в предсердиях и желудочках у разных видов млекопитающих [Vogel, Terzic, 1989]. Также было показано, что фенилэфрин вызывает увеличение ДПД₉₀ в кардиомиоцитах волокон Пуркинье собаки [Robinson et al., 2000].

Разнонаправленность эффектов при адренергической стимуляции в разных тканях и у разных животных обусловлена различиями в распределении α - и β -АР. Поскольку адреналин и норадреналин имеют сродство к обоим типам рецепторов, то при их действии происходит активация разных внутриклеточных каскадов.

В литературе имеется крайне мало данных, касающихся изменения МПП в предсердном и желудочковом миокарде при α -адренергической стимуляции.

II.4 Автоматическая активность в сердце

Автоматическая активность характерна для пейсмекерных клеток, которые обеспечивают инициацию возбуждения миокарда и поддержание сердечной функции. Спонтанная генерация потенциалов действия (ПД) в пейсмекерных клетках возможна благодаря их особому электрофизиологическому фенотипу – набору мембранных ионных каналов, транспортеров и обменников, а также белков электрических контактов, который отличается от такового в рабочем миокарде предсердий и желудочков. Электрическая активность пейсмекерных клеток характеризуется наличием фазы медленной диастолической деполяризации (МДД), которая обеспечивает спонтанный сдвиг мембранного потенциала до «порогового» уровня, необходимого для возникновения ПД. Спонтанные ПД пейсмекерных клеток характеризуются отсутствием фазы быстрой деполяризации, низкой скоростью нарастания переднего фронта ПД, а также деполяризованным МПП, что способствует спонтанной деполяризации [Satoh, 2003].

II.4.1 Электрофизиологические механизмы автоматической активности пейсмекерных кардиомиоцитов

В настоящее время существует несколько концепций электрофизиологических механизмов автоматической активности в кардиомиоцитах. Ниже будут кратко приведены основные электрофизиологические характеристики пейсмекерных кардиомиоцитов, а также наиболее распространённые концепции поддержания автоматии в этих клетках.

Набор ионных токов в пейсмекерных клетках отличается от такового в рабочем миокарде, что обеспечивает особую конфигурацию спонтанного ПД (*Рисунок 6*). Уровень МПП в пейсмекерных клетках составляет -50-60 мВ, в отличие от рабочих кардиомиоцитов, в которых МПП достигает -80 мВ [Satoh, 2003].

Диастолический уровень мембранного потенциала пейсмекерной клетки нестабилен и более положителен по сравнению с МПП рабочих кардиомиоцитов благодаря сниженной плотности каналов тока аномального выпрямления I_{K1} [Irisawa et al., 1993; Noma et al., 1984]. Именно этот ток является ответственным за установление и поддержание стабильного МПП в рабочих кардиомиоцитах [Lopatin, Nichols, 2001]. Калиевый ток аномального выпрямления I_{K1} в сердце млекопитающих обеспечен каналами Kir2.1-3 [Hibino et al., 2010]. Уровень экспрессии каналов Kir2.x наиболее высокий в желудочковых и предсердных кардиомиоцитах, однако в пейсмекерных клетках САУ экспрессия этих каналов практически отсутствует, что было показано на уровне мРНК и белка [Atkinson et al., 2013; Monfredi et al., 2010].

При низком уровне МПП невозможно функционирование потенциал-зависимых каналов быстрого натриевого тока I_{Na} , поскольку для их деактивации и активации необходима гиперполяризация мембранного потенциала [Armstrong, 1981]. Поэтому в пейсмекерных клетках I_{Na} отсутствует, а основными деполяризующими токами являются кальциевые токи I_{CaL} и I_{CaT} . Благодаря этому фаза деполяризации пейсмекерного ПД имеет низкую скорость нарастания.

Способность пейсмекерных клеток генерировать МДД объясняется взаимодействием двух основных клеточных механизмов, называемых «мембранными часами» и «кальциевыми часами».

Мембранные часы включают активность всех ионных каналов и транспортеров, которые локализованы в клеточной мембране и вносят вклад в формирование МДД: кальциевые токи I_{CaL} и I_{CaT} , ток Na^+/Ca^{2+} обменника (I_{NCX}), а также ток I_f . На внутриклеточном уровне пейсмекерную активность поддерживает механизм «кальциевых часов», который обеспечивает спонтанные выбросы внутриклеточного Ca^{2+} , в этом механизме основными участниками являются саркоплазматический ретикулум (СПР), риадиноновые рецепторы (RyR), а также SERCA.

Сразу после завершения потенциала действия, при гиперполяризации пейсмекерной клетки до наиболее отрицательного диастолического уровня (≈ -60 мВ) происходит активация каналов семейства HCN, которые переносят «активируемый гиперполяризацией» или «funny» ток – I_f [Biel et al., 2002; DiFrancesco, 1981, 1982]. I_f ток активен в течение всей фазы МДД, однако одного его недостаточно для последующей деполяризации и инициации ПД. Этот ток лишь вносит вклад в начальную деполяризацию мембраны и оказывает модулирующее действие на частоту возникновения ПД, ускоряя фазу МДД [DiFrancesco, 1981, 1982]. При блокаде каналов HCN подавление пейсмекерной

активности не происходит. В таком случае наблюдают только замедление ритма [Denyer, Brown, 1990].

Ток I_f деполяризует мембранный потенциал до значений, при которых активируются потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы Т- и L-типа. I_{CaL} (long-lasting) является основным и необходимым для генерации пейсмекерных ПД [Satoh, 1993]. Каналы тока Т-типа I_{CaT} (transient) активны лишь в течение короткого времени в фазу деполяризации и вносят наименьший вклад в формировании пейсмекерного ПД [Noble, 1984; Satoh, 1995]. Комбинация из деполяризующих входящих токов дополнительно деполяризует мембрану во время поздней МДД, что приводит к дополнительному открытию потенциалзависимых каналов L-типа и повышению внутриклеточного Ca^{2+} .

Для обеспечения ритмичной пейсмекерной активности необходимо взаимодействие механизмов мембранных и кальциевых часов, между поступлением кальция через Ca^{2+} -каналы L- и Т-типа и круговоротом кальция между цитоплазмой и СПР [Lakatta, DiFrancesco, 2009; Lakatta et al., 2010].

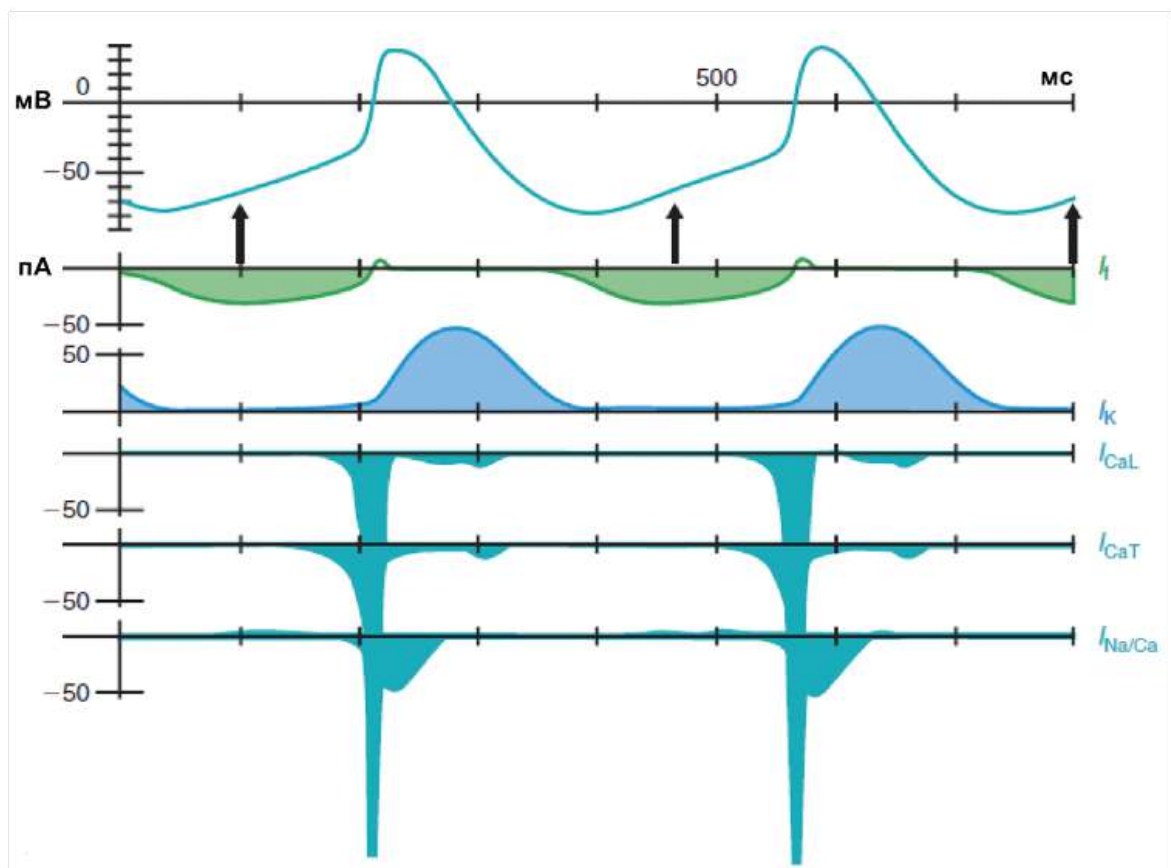


Рисунок 6. Потенциал действия в синоатриальном узле и токи, его формирующие. Представлено с изменениями по DiFrancesco, Camm, 2004.

Механизм кальциевых часов обеспечивает постоянную ритмическую циркуляцию Ca^{2+} между СПР, цитоплазмой клетки, а также внеклеточным пространством [Lakatta, DiFrancesco, 2009; Lakatta et al., 2010]. Работа внутренних кальциевых часов осуществляется благодаря спонтанной активации RyR2, расположенных на поверхности мембраны СПР. Через активированные RyR2 происходят локальные выбросы кальция в цитоплазму клетки из СПР в период времени, соответствующий диастолической деполяризации. В результате выброса кальция пик концентрации Ca^{2+} приходится на момент поздней стадии МДД [Vinogradova et al., 2004].

В момент, когда внутриклеточный Ca^{2+} достигает своего максимума, начинается реполяризация мембраны и активация работы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника (NCX) в прямом «режиме». При этом 1 Ca^{2+} переносится наружу клетки, а 3 Na^+ переносятся внутрь клетки, что создает деполяризующий ток. Амплитуда тока I_{NCX} постепенно нарастает и достигает максимума только в позднюю стадию МДД, в результате чего происходит сдвиг мембранного потенциала до пороговых значений, необходимых для запуска ПД. Немаловажную роль в этом процессе играет колокализация RyR2 и NCX, расположенным на мембране кардиомиоцита [Bogdanov et al., 2006, 2001; Maltsev et al., 2004]. Таким образом, ток I_{NCX} является важнейшим механизмом передачи сигнала кальциевыми и мембранными часами, и вносит существенный вклад в формирование МДД.

Регуляция пейсмекерной активности симпатическим и парасимпатическим отделами вегетативной нервной системы осуществляется главным образом за счет модуляции фазы МДД. Медиаторы норадреналин и ацетилхолин активируют β -АР и мускариновые М-рецепторы, сопряженные с G_s и G_i белками, что соответственно приводит либо к повышению уровня сАМР, либо к его снижению. Вегетативные нервы регулируют работу HCN каналов и ток I_f , что прямо влияет на длительность фазы МДД и частоту пейсмекерной активности [Biel et al., 2002].

II.4.2 HCN каналы миокарда и их адренергическая регуляция

HCN каналы (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-sensitive channel) широко распространены в организме в различных структурах. У млекопитающих известны четыре изоформы канала – HCN1-4, в миокардиальных клетках присутствуют три из них: HCN1 и HCN4 обнаружены в САУ, HCN2 в проводящей системе и рабочем миокарде; изоформа HCN3 встречается в нервных клетках [Biel et al., 2002].

Каналы HCN принадлежат к суперсемейству катионных потенциал-зависимых каналов. HCN каналы состоят из четырех субъединиц, которые образуют центральную пору. Каждая субъединица образована шестью трансмембранными доменами (S1-S6), N- и

C-концы которых располагаются во внутриклеточном пространстве. HCN каналы открываются при гиперполяризации и проводят катионный (преимущественно Na^+) деполяризующий пейсмекерный ток I_f [Biel et al., 2009].

Свойства канала модулируются путем связывания сAMP с доменом связывания циклических нуклеотидов (cyclic nucleotide-binding domain – CNBD), связывание с сAMP облегчает открытие канала и увеличивает его проводимость. Различные изоформы HCN каналов имеют разную кинетику и сAMP-регуляцию. Например, HCN4 обладает наиболее медленной кинетикой активации и дезактивации и открывается при более отрицательных потенциалах, чем другие изоформы. Напротив, HCN1 обладает быстрой кинетикой и открывается при более положительных потенциалах. Кроме того, HCN4 наиболее чувствителен к сAMP, в то время как подтип HCN1 лишь слабо подвержен влиянию сAMP [Wahl-Schott, Biel, 2009].

У мышей HCN4 является преобладающей изоформой в пейсмекерных клетках САУ, каналы HCN1 также присутствуют САУ и колокализуются с HCN4 [Fenske et al., 2013; Liu et al., 2007]. У человека HCN4 также является преобладающей изоформой в САУ, а уровень экспрессии HCN1 и HCN2 значительно ниже [Chandler et al., 2009].

В экспериментах с использованием ко-иммунопреципитации и иммуногистохимии было показано, что HCN4 могут взаимодействовать с кавеоллином 3 (Cav3), маркерным белком кавеол [Barbuti et al., 2007]. В рабочих кардиомиоцитах и пейсмекерных клетках в кавеолах также могут находиться β_2 -АР [Rybin et al., 2000]. Было показано, что в зрелых пейсмекерных кардиомиоцитах в кавеолах могут колокализироваться HCN4 и β_2 -АР (в большей степени, чем β_1 -АР) [Barbuti et al., 2007]. Такая пространственная организация HCN4 и β -АР способствует быстрой регуляции пейсмекерной активности: адренергическая стимуляция приводит к увеличению активности АС и продукции сAMP, который связывается с сAMP-чувствительным доменом канала HCN4 и способствует его открытию. В результате, происходит ускорение фазы МДД и частоты генерации спонтанных ПД. В другом исследовании были полученные данные о локализации HCN4 каналов в кавеолах в эмбриональных и зрелых кардиомиоцитах человека [Bosman et al., 2013]. Было показано, что колокализация HCN4 и Cav3 присутствует только в зрелых кардиомиоцитах, но не в эмбриональных. Таким образом, в ходе постнатального онтогенеза происходит перераспределение организации каналов HCN4, а значит и меняется и их регуляция.

II.4.3 Структуры, демонстрирующие способность к автоматической активности и естественный ритмоводитель сердца

САУ является не единственной структурой в сердце, способной генерировать спонтанные ПД. Согласно современным представлениям, в сердце взрослых млекопитающих могут проявлять автоматическую активность такие структуры как атриовентрикулярный узел, коронарный синус, пучок Гиса и волокна Пуркинье [Dobrzynski et al., 2013]. Нормальная ритмическая работа сердца возможна благодаря механизму иерархии автоматии: способные к автоматической активности структуры проводящей системы (латентные пейсмекеры) подчиняются главному водителю ритма – САУ (доминантному пейсмекеру). В нормальных условиях САУ возбуждает латентные пейсмекеры с более высокой частотой, чем их собственный спонтанный ритм. Ритмическое возбуждение латентных пейсмекеров приводит к повышению концентрации внутриклеточного Na^+ [Boyett et al., 1987] и стимуляции Na^+/K^+ -АТФазы. Усиленная работа Na^+/K^+ -АТФазы в свою очередь приводит к гиперполяризации ПП и подавлению МДД в латентных пейсмекерах, что не позволяет им генерировать их собственный ритм [Boyett, Fedida, 1984; Vassalle, 1970].

Таким образом, в сердце существует множество структур, обладающих автоматией. Для обеспечения нормальной работы сердца ритм задает только доминантный пейсмекер, а автоматическая активность остальных структур подавлена. Однако, при различных патологиях вторичные латентные пейсмекерные структуры могут избегать подавляющего влияния доминантного пейсмекера, например, в результате нарушения механизма иерархии автоматии или избыточной вегетативной стимуляции.

II.5 Роль миокардиальной ткани торакальных вен в формировании предсердных аритмий

II.5.1 Основные механизмы возникновения фибрилляций предсердий

Фибрилляция предсердий (ФП) является наиболее распространенной формой сердечной аритмии у людей, связана с высоким уровнем заболеваемости и смертности [Benjamin et al., 2019]. Основными причинами смертности при ФП являются серьезные осложнения, такие как тромбоэмболия и сердечная недостаточность [Kannel et al., 1982].

Этиология возникновения ФП может быть разной. В большинстве случаев ФП связана с сопутствующими заболеваниями сердца. Основной предрасполагающий фактор – старение, при котором происходит структурное ремоделирование, фиброзные изменения, замедление проводимости миокарда [Nattel, 2011]. Сердечная недостаточность, гипертоническая болезнь сердца, пороки клапанов и ишемическая болезнь сердца являются

основными причинами возникновения ФП. Также, в некоторых случаях ФП проявляется при перикардите, миокардите и других кардиомиопатиях. Кроме того, ФП проявляется в 30% случаев после кардиохирургического вмешательства. Также, существует и генетическая предрасположенность. С помощью полногеномного поиска ассоциаций был установлен широкий спектр мутаций, ассоциированных с предрасположенностью к ФП [Darbar, 2016; Tucker, Ellinor, 2014]. Другими «экстракардиальными» факторами могут быть: чрезмерное употребление алкоголя [Mukamal et al., 2005], гипертиреоз [Auer et al., 2001], ожирение [Schoonderwoerd et al., 2008], влияние вегетативной стимуляции [Chou, Chen, 2009].

Основными механизмами ФП являются очаговая эктопическая и циркулирующая («reentry») электрическая активность (Рисунок 7). Эктопический очаг (фокус) автоматии может вызвать единичные экстрасистолы, либо может быть триггером, инициирующим возникновение циркулирующих волн возбуждения (reentry) в «уязвимом» участке миокарда. Устойчивый эктопический фокус автоматии может служить в качестве источника высокочастотной электрической активности, которая гетерогенно распространяется и формирует фибрилляторное проведение и активность в предсердии [Berenfeld et al., 2002; Nattel et al., 2008]. Клинические ФП могут быть пароксизмальными (самоустраняющиеся), либо хроническими (прекращающиеся только при медицинском вмешательстве). Считается, что периодически возникающие очаги эктопической активности инициируют пароксизмальную ФП, а циркулирующая активность reentry вызывает развитие хронической ФП, устойчивой к терапии [Burstein, Nattel, 2008; de Groot et al., 2010].

Очаговая эктопическая активность. Известно несколько механизмов, формирующих аномальные электрические импульсы в кардиомиоцитах и, как следствие, очаговую эктопическую активность. В кардиомиоцитах спонтанная автоматическая активность зависит от баланса между входящими и выходящими токами во время фазы 4 (диастолическая фаза, предшествующая фазе быстрой деполяризации) ПД. Усиление входящих Na^+ и Ca^{2+} токов, в частности тока I_f , и/или снижение выходящих (калиевых) токов в фазу 4 ПД способствуют развитию спонтанной диастолической деполяризации и достижению порогового значения мембранного потенциала, что приводит к возникновению спонтанного ПД и эктопического фокуса возбуждения.

Очаговая эктопическая активность также может быть результатом ранних (возникающих в фазу быстрой реполяризации, РПД) или задержанных (возникающих после полной реполяризации, ЗПД) постдеполяризаций. Считается, что ЗПД являются основной причиной возникновения очагов эктопической активности. ЗПД возникают вследствие

«утечки» Ca^{2+} из СПР во время диастолы через рианодиновые рецепторы RyR2. Во время систолы выброс Ca^{2+} через RyR2 из СПР необходим для осуществления электромеханического сопряжения и сокращения кардиомиоцита.

Для расслабления кардиомиоцита необходима обратная закачка Ca^{2+} в СПР при помощи сарко/эндоплазматической Ca^{2+} -АТФазы (SERCA2a). RyR2 чувствительны к концентрации Ca^{2+} , как цитоплазматической, так и в люмене СПР. Выброс Ca^{2+} во время диастолы может быть следствием кальциевой перегрузки СПР, либо повышенной чувствительности RyR2 к низким концентрациям Ca^{2+} . Избыток цитоплазматического Ca^{2+} усиливает работу NCX, который создает входящий деполяризующий ток I_{NCX} и таким образом провоцирует возникновение ЗПД. Если при ЗПД мембранный потенциал достигает порогового значения, возникает преждевременный ПД [Lou et al., 2015]. Повторяющиеся ПД, вызванные ЗПД, генерируют возникновение очага предсердной тахикардии. Возникновению ЗПД способствует повышение чувствительности RyR2 к Ca^{2+} при гиперфосфорилировании этих рецепторов, а также увеличение несвязанного Ca^{2+} в СПР. Количество свободного Ca^{2+} может увеличиваться в СПР при неадекватном функционировании или недостаточной экспрессии основного Ca^{2+} -буфера в СПР – кальсеквестрина, что способствует диастолическому высвобождению Ca^{2+} через RyR2 из СПР [MacLennan, Chen, 2009].

Ранние постдеполяризации, как правило, возникают при чрезмерном увеличении длительности ПД. При очень длительной фазе реполяризации становится достаточно времени для восстановления Ca^{2+} каналов L-типа после их инактивации в фазу деполяризации и плато. Через восстановленные CaL-каналы вновь проходит Ca^{2+} внутрь клетки, вызывая РПД и спонтанный внеочередной ПД.

Циркуляция возбуждения «reentry». В результате распространения возбуждения, источником которого является эктопический очаг, между двумя различными зонами миокарда может возникнуть рециркуляция возбуждения, или «reentry». В процессе инициации ФП reentry дополняет эктопическую автоматию. Механизм reentry заключается в том, что волна возбуждения от эктопического очага может встретиться с зоной миокарда, находящейся в рефрактерном состоянии. Тогда волна возбуждения, распространяющаяся от эктопического фокуса, меняет свое направление и альтернативным путем возвращается к участкам, которые ранее были невозбудимыми. Волна возбуждения может начать циркулировать между двумя зонами миокарда, например между миокардом полых вен и предсердием, что и формирует reentry [Zipes et al., 2017].

Причиной возникновения reentry могут быть особенности тканевой организации миокардиальных рукавов торакальных вен, такие как ориентация миокардиальных волокон

[Verheule et al., 2002], компактные группы кардиомиоцитов [Hoyt et al., 1990] или атипичные участки распределения коннексинов Cx43 и Cx40 [Kwong et al., 1998; Saito et al., 2000]. Также, фиброз тканей замедляет проводимость, делает ее более неоднородной и создает блоки проведения, которые способствуют развитию стабильных или нескольких одновременных нерегулярных контуров reentry, поддерживающие ФП. Кроме того, пролиферация фибробластов может способствовать аритмогенезу посредством взаимодействий кардиомиоцитов и фибробластов, которые изменяют свойства ПД и снижают скорость поведения возбуждения.

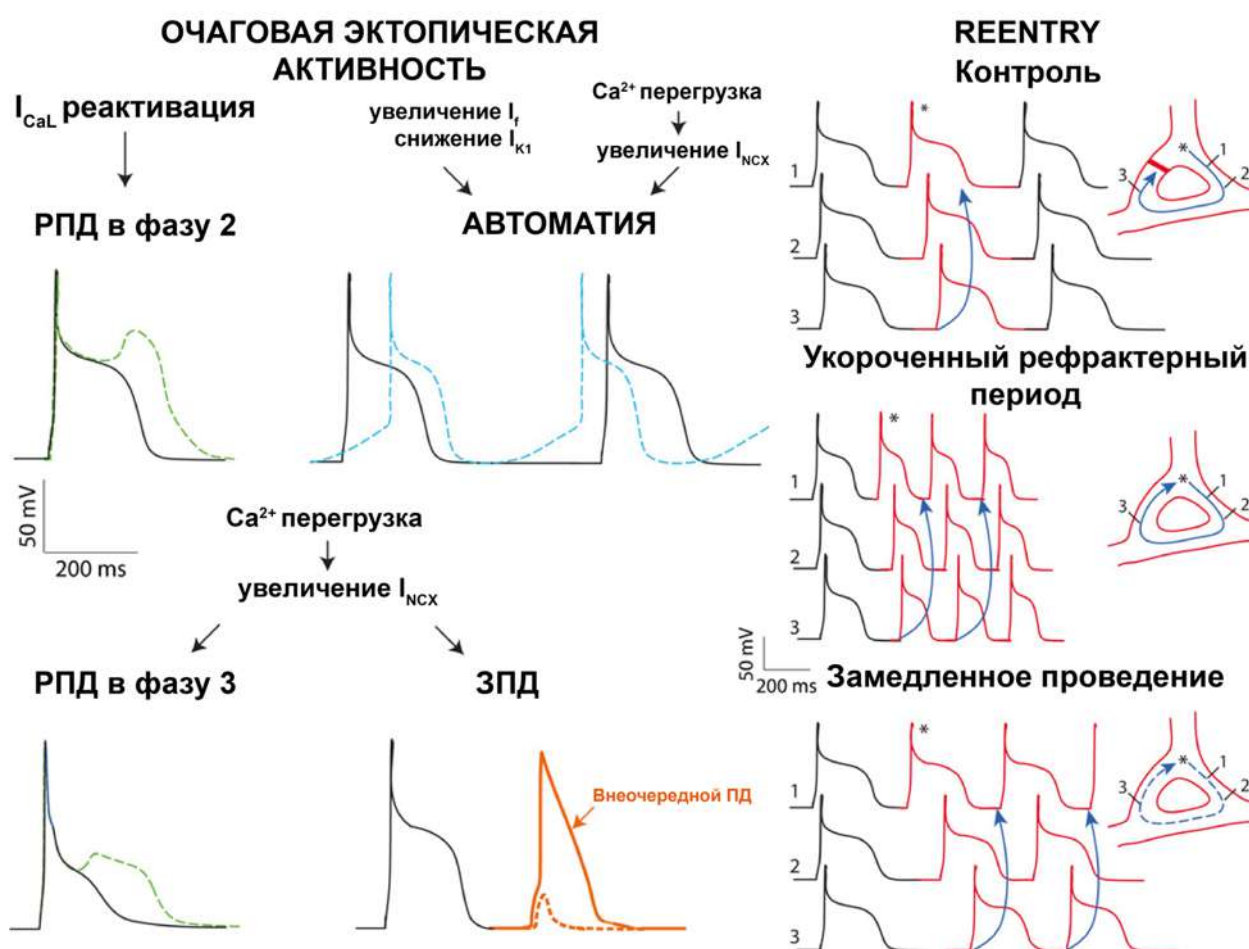


Рисунок 7. Механизмы возникновения очаговой эктопической активности и reentry. Слева: механизмы ранних и задержанных постдеполяризаций (РПД и ЗПД) и автоматии в кардиомиоцитах. Справа: механизмы рециркуляции возбуждения – reentry. С изменениями по Bartos, Grandi и др., 2015.

II.5.2 Вклад адренергической стимуляции в формировании эктопической спонтанной активности

Адренергическая стимуляция может способствовать возникновению очаговой эктопической активности, путем усиления автоматии, либо, индуцируя ранние и задержанные деполяризации. Усиление автоматии может быть вызвано снижением

калиевого тока аномального выпрямления (I_{K1}) [Sánchez-Chapula et al., 2001], что может происходить как при α - [Braun et al., 1992; Fedida et al., 1991], так и при так и β -адренергической стимуляции [Anumonwo, Lopatin, 2010; Koumi et al., 1995].

Показано, что изопротеренол (агонист β -АР) и форсколин (активатор аденилатциклазы) ингибируют I_{K1} в желудочковых кардиомиоцитах человека, что указывает на участие протеинкиназы А (РКА) в регуляции и фосфорилировании каналов Kir2.x. Также, показано участие РКС в негативном регулировании канала Kir2.1 при стимуляции α_1 -адренорецепторов в предсердных кардиомиоцитах [Zipes et al., 2017]. Kir-каналы также являются мишенями для фосфорилирования тирозинкиназами [Wischmeyer et al., 1998].

Также автоматической активности способствует усиление пейсмекерного тока I_f при β -адренергической стимуляции [DiFrancesco, 2010]. Активация β -АР также может увеличить вероятность ранней постдеполяризации.

Адренергическую стимуляцию чаще связывают с инициацией reentry [SATOH, ZIPES, 1998; Zipes et al., 2017].

II.5.3 Миокардиальная ткань полых вен как источник эктопической активности

В настоящее время миокардиальную ткань легочных и полых вен рассматривают в качестве основного источника триггерной активности, инициирующей предсердные аритмии. Поскольку большая часть клинических случаев (70-80%) связана с эктопической активностью в миокарде легочных вен, этому участку миокарда посвящено множество исследовательских работ. Количество случаев предсердных аритмий, связанных с эктопией в миокарде полых, а не легочных вен – значительно меньше, поэтому изучению свойств и механизмам возникновения эктопической активности миокарда полых вен посвящено крайне мало исследований.

Эктопическая активность была зарегистрирована в миокардиальных рукавах полых вен в экспериментальных условиях у кроликов, собак, а также в ходе клинических исследований у человека [Arita et al., 1966; Spach et al., 1972]. Пейсмекерные ПД были зарегистрированы в кардиомиоцитах, изолированных из миокардиальной ткани ППВ собак [Chen et al., 2002]. Описано несколько случаев, когда высокочастотная очаговая активность в верхней полой вене, а также и в нижней полой вене являлась причиной предсердной аритмии [Enriquez et al., 2017; Ino et al., 2000; Jime'nez-Lo'pez et al., 2017; Mansour et al., 2002; Sharma et al., 2017; Tsai et al., 2000].

Причиной возникновения пейсмекерных ПД вне САУ может быть изменение баланса ионных токов, активных в диастолическую фазу ПД. Так, например, усиление входящих ионных токов приводит к возникновению диастолической деполяризации и возникновению очаговой эктопической автоматии согласно механизмам, описанным в предыдущем разделе.

Существует множество исследований, демонстрирующих возникновение reentry в миокардиальной обкладке торакальных вен, но большая часть существующих исследований касается reentry в легочных венах [Nocini et al., 2002; Arora et al., 2003]. В этих исследованиях было показано, что блоки проведения, способствующие рециркуляции возбуждения, располагались в местах, где миокардиальная ткань меняла свою пространственную ориентацию [Nocini et al., 2002]. При помощи сложных многополярных электрографических катетеров было показано наличие reentry в миокарде легочных [Arentz et al., 2007] и полых [Shah et al., 2002] вен у пациентов с ФП.

В последние годы появилось больше клинических сообщений, демонстрирующих, что эктопические очаги, инициирующие ФП располагаются в полых венах. С начала 2000-х годов был опубликован ряд клинических случаев, когда катетерная абляция миокарда полых вен, а не легочных, приводила к успешному устранению предсердных тахиаритмий. Так, в работе 2014 года сообщается, что при катетерной абляции ЛВ у 1425 пациентов, страдающих ФП, у 74 (5.2%) из них процедура оказалось безуспешной, поскольку очаг эктопической активности находился в ВПВ [Miyazaki et al., 2014]. В мета-анализе 2017 года, в котором было проанализировано более 525 клинических случаев, было показано, что в 10-20% случаев ФП у пациентов не связана с эктопической активностью в ЛВ [Sharma et al., 2017]. В другом исследовании проанализировали более 1590 случаев хронической ФП в 2014-2018 годах, среди которых установили 507 (32%) случаев «нелегочного» происхождения, при этом ВПВ являлась источником эктопического очага возбуждения в 15% (239) случаев [Philpott, 2019].

У пациентов с ФП эктопические очаги возбуждения могут возникать как в верхней полый вене [Jiménez-Lopez et al., 2017], так и в нижней полый вене [Lim et al., 2017]. Также, существует мнение, что инициатором ФП является ВПВ у тех пациентов, у которых миокардиальные рукава в этой вене наиболее длинные [Higuchi et al., 2010].

В клинических условиях идентификация аритмогенных вен занимает много времени и является неточной. Поэтому, как правило, проводят «профилактическую» абляцию четырех ЛВ. Поскольку абляция ВПВ имеет более высокие риски осложнений, поэтому ее выполняют не регулярно, а только в случае точного установления источника триггерной активности [Higuchi et al., 2010].

Таким образом, клинические исследования показывают, что ВПВ действительно служит источником ФП. Количество случаев ФП, инициируемой полыми венами, достигает 20%, что, несомненно означает существенную долю пациентов, страдающих предсердными аритмиями. Это показывает, что изучение механизмов эктопической автоматии в полых венах крайне необходимо и имеет прикладное значение для клинической практики. Необходимо выяснить причины, в результате которых становится возможным возникновение автоматической активности в ПВ, а также установить, что служит триггером или облегчает возникновение этой активности в полых венах.

II.5.4 Молекулярный контроль экспрессии генов при ФП

Существует множество сведений о важной роли изменения генного контроля в патогенезе ФП. Одним из возможных механизмов изменения экспрессии генов – ФП-индуцирующие мутации транскрипционных факторов. Паттерны транскрипции специфичны для тканей и заболеваний, и находятся под контролем определенных ТФ, которые связываются со специфичными последовательностями ДНК и усиливают или подавляют транскрипцию генов. Установлено, что мутации в ТФ GATA, NKX2-5 и TBX5 вызывают различные формы врожденных пороков сердца и предрасполагают к ФП [Mahida, 2014]. Сама по себе ФП вызывает репрограммирование экспрессии генов, в частности, путем увеличения внутриклеточной нагрузки Ca^{2+} , активируя таким образом различные сигнальные системы [Nattel, Dobrev, 2012].

II.6 Заключение к обзору литературы

Итак, в предыдущих разделах нами было показано, что торакальные вены, в том числе и полые, являются источником эктопической автоматической активности, которая приводит к возникновению предсердных аритмий. Предрасположенность миокардиальной ткани к эктопической автоматической активности может быть обусловлена рядом свойств, которые позволяют кардиомиоцитам генерировать спонтанные потенциалы действия. На данный момент существует всего несколько экспериментальных исследований, касающихся изучения электрофизиологических свойств миокардиальной ткани полых вен. Однако, некоторые из существующих данных указывают на то, что миокард полых вен обладает характеристиками, отличающимися от рабочего предсердного миокарда. Это согласуется с клиническими данными, которые показывают, что очаг возникновения фибрилляций предсердий в ~15% случаев находится в полых венах. Тем не менее, каковы онтогенетические механизмы, приводящие к формированию особого электрофизиологического фенотипа и развитию предрасположенности к спонтанной

эктопической активности миокарда полых вен, не известны. В данной работе мы исследовали характеристики миокардиальной ткани полых вен на разных стадиях постнатального развития и при различных условиях. Мы проследили каким образом трансформируются электрофизиологические свойства кардиомиоцитов полых вен, а также провели ряд экспериментов, которые могут дать представления о возможных механизмах преобразования свойств миокарда полых вен.

III МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

III.1 Экспериментальные животные и препараты

III.1.1 Экспериментальные животные

В работе использовали самцов 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.

III.1.2 Химическая симпатэктомия

Часть экспериментов была проведена с использованием животных, лишенных симпатической иннервации. Хроническую неонатальную химическую симпатэктомию проводили при помощи гуанетидина сульфата (MedChemExpress, США). Использовали протокол симпатэктомии, описанный Johnson et al. [Johnson et al., 1976], с изменениями. 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.

III.1.3 Выделение препаратов передней правой поллой вены (ППВ) и левого предсердия (ЛП)

Эксперименты выполнены с использованием многоклеточных препаратов передней правой поллой вены (ППВ) и левого предсердия (ЛП) крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза P7-P60.

Перед проведением хирургических процедур животным проводили анестезию изофлураном (2-3%), декапитировали. Вскрывали грудную клетку, очищали сердце от перикарда, очищали ППВ от окружающих тканей от предсердия к дистальному участку вены. Делали надрез в области границы между правым желудочком и правым предсердием (ПП), далее вели разрез вдоль межпредсердной перегородки и синусного узла, отсекая таким образом 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 (NaCl - 129, KCl - 4, NaH₂PO₄ - 20.9, MgSO₄ - 0.5, NaHCO₃ - 20, CaCl₂ - 1.2, глюкоза - 5; pH 7.2 - 7.4) при 37°C. В перфузионной камере до

начала манипуляций промывали раствором Тироде полость ППВ и ПП для удаления остатков крови и предотвращения образования тромбов в препарате. Далее, делали продольный разрез вдоль ППВ, раскрывали препарат и фиксировали при помощи тонких игл таким образом, чтобы внутренняя оболочка вены и миокардиальный слой были ориентированы вверх (Рисунок 8, Рисунок 10). 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 (Рисунок 8).

В экспериментах по определению уровня мРНК в миокарде ППВ производили те же действия, однако после промывки препарата ППВ-ПП в перфузионной камере, сразу делали разрез дистальнее области САУ и извлекали препарат. Для сравнения уровня мРНК в миокарде ППВ и в рабочем предсердном миокарде использовали левое ЛП. Препарат ЛП извлекали после удаления перикарда от сердца, делали разрез в области границы левого предсердия и левого желудочка, вели разрез вдоль межпредсердной перегородки. Препарат помещали в перфузионную камеру, промывали раствором Тироде.

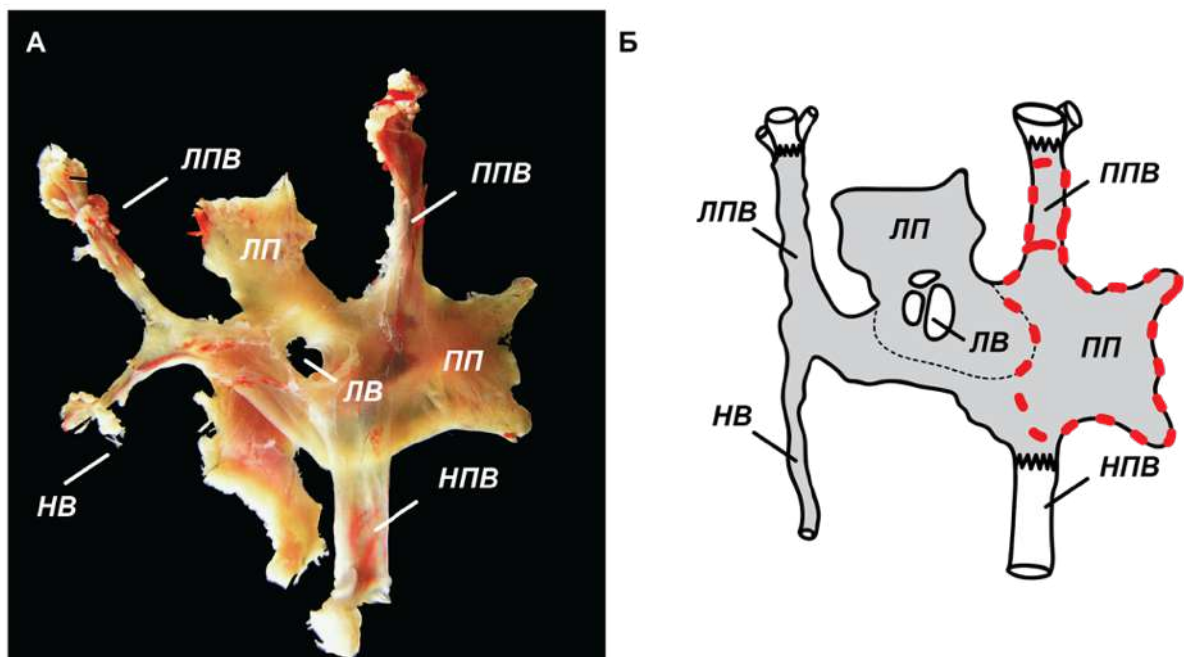


Рисунок 8. А - общий вид изолированного препарата суправентрикулярной области сердца крысы, включая передние полые вены, Б - схема препаровки суправентрикулярной области, включая ушко и свободную стенку правого предсердия (ПП), правую переднюю полую вену (ППВ), устья легочных вен (ЛВ), ушко левого предсердия (ЛП), левую переднюю полую вену (ЛПВ), непарную вену (НВ) и нижнюю полую вену (НПВ). Пунктиром отмечены места разрезов при выделении препаратов.

III.2 Регистрация потенциалов действия и потенциала покоя в различных препаратах

III.2.1 Перфузия изолированных препаратов

Выделенные миокардиальные препараты помещали в камеру с непрерывной перфузией при 37°C раствором Тиродэ. Перфузионный раствор непрерывно оксигенировали газовой смесью O₂ (95%) и CO₂ (5%). Скорость протока перфузионного раствора составляла 15 мл/мин, объем перфузионной камеры - 5 мл.

В части экспериментов препараты стимулировали при помощи серебряных биполярных электродов (диаметр 1 мм, расстояние между электродами 2-3 мм), соединенных со стимулятором ЭЛС-2 (частота 3,3 Гц, длительность импульса - 2 мс, амплитуду устанавливали в 1,5 раза больше пороговой). Стимулирующие электроды размещали непосредственно на поверхности ткани максимально удаленно от области регистрации ПД. Перед началом эксперимента препараты адаптировали в перфузионной камере в течение 20 -30 мин. В течение всего периода адаптации изолированные препараты, не обладающие спонтанной активностью, работали в навязанном ритме (4 Гц).

III.2.2 Экспериментальная установка, регистрация потенциалов действия

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 Е-154, L-card, Россия), сигнал поступал на компьютер, где был записан при помощи программы «Power Graph 3.3.8» («ДИСофт», Россия). Схема установки представлена на *Рисунок 9*. Область регистрации биоэлектрических параметров представлена на *Рисунок 10*.

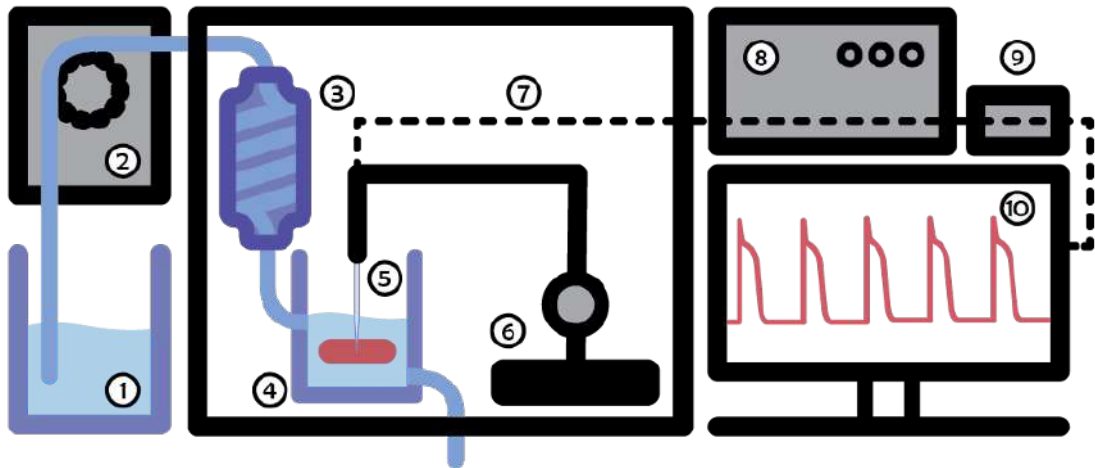


Рисунок 9. Схема установки для внутриклеточной регистрации биоэлектрической активности. 1 – перфузионный раствор, 2 – перистальтический насос, 3 – термостат, 4 – перфузионная камера с препаратом, 5 – микроэлектрод, 6 – микроманипулятор, 7 – аналоговый сигнал от микроэлектрода, 8 – усилитель, 9 – аналогово-цифровой преобразователь, 10 – компьютер.

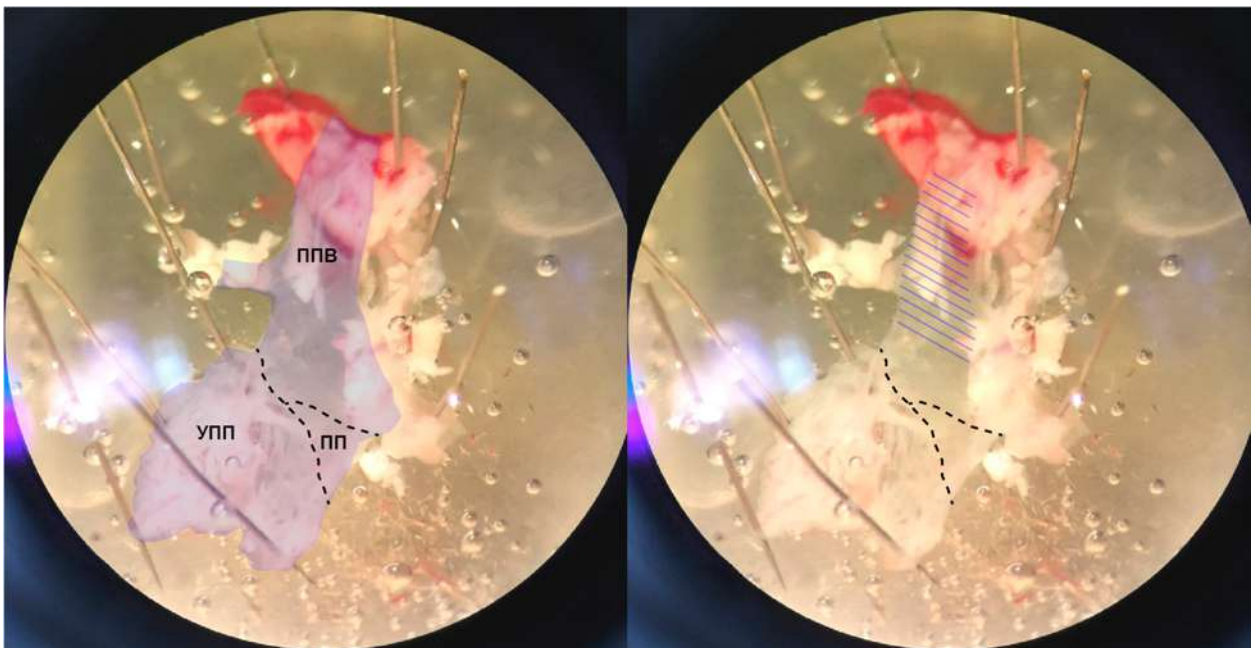


Рисунок 10. Общий вид препарата ППВ-ПП, используемый для экспериментов с микроэлектродной техникой и оптического картирования. Область, выделенная голубым цветом (слева), отображает расположение миокардиальной ткани ППВ; Область, выделенная полосами (справа), соответствует области регистрации биоэлектрических параметров. ППВ - передняя полая вен, ПП – правое предсердие (гладкостеночная часть), УПП – ушко правого предсердия.

III.2.3 Анализ данных электрофизиологических экспериментов

Анализ данных, зарегистрированных при помощи микроэлектродной техники в препаратах ППВ, проводили с использованием различных программ. Такие параметры как уровень мембранного потенциала покоя (МПП), частота следования спонтанных

потенциалов действия (ПД), максимальная скорость нарастания переднего фронта ПД (dv/dt_{\max}) анализировали в программе «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).

III.2.4 Протокол электрофизиологических экспериментов

Исследование биоэлектрической активности в препаратах ППВ контрольных и симпатэктомизированных крыс разных возрастов осуществляли согласно следующему протоколу: после извлечения многоклеточного препарата ПП-ППВ, помещали его в перфузионную камеру и адаптировали при постоянном протоке раствором Тиродэ (37°C) в течение 30-40 минут. В течение следующих 15-20 минут регистрировали биоэлектрическую активность, при этом стимуляция препарата происходила эндогенно, в собственном ритме САУ. Далее, проводили разрез дистальной артерии САУ, разобщая таким образом миокард правого предсердия с САУ и ППВ. Далее в течение 30 мин регистрировали МПП в дистальном участке миокарда ППВ. Часть препаратов ППВ проявляла собственную спонтанную активность через несколько минут после изоляции от пейсмекера (САУ), в таком случае регистрировали спонтанные ПД (СПД). В части препаратов ППВ спонтанная активность отсутствовала – в таком случае, не ранее, чем через 30 минут после изоляции миокарда ППВ от пейсмекера, подавали агонисты α - и β -адренорецепторов: норадреналин, НА (α - и β -); изопротеренол, ИЗО (β -); фенилэфрин, ФЭ (α -).

III.3 Оптическое картирование

Для изучения особенностей распространения возбуждения в миокарде полых вен контрольных и симпатэктомизированных животных использовали метод оптического картирования. Данный метод позволяет регистрировать изменение флуоресценции потенциалчувствительного красителя в миокардиальной ткани в режиме реального времени, что позволяет визуализировать последовательное распространение деполяризации ткани. В данной работе в качестве потенциалчувствительного зонда использован зонд di-4-ANEPPS (*Рисунок 11*). Максимум спектра поглощения этой молекулы, встроенной в липидный бислой соответствует 470 нм, а эмиссии - 620 нм.

Изменение трансмембранного потенциала в кардиомиоцитах приводит к изменению распределения заряда и сдвигу спектра флуоресценции. Благодаря сдвигу спектра флуоресценции интегральная эмиссия, регистрируемая в длинноволновой части спектра пропорциональна трансмембранному потенциалу. Для di-4-ANEPPS изменение интегральной эмиссии при сдвиге мембранного потенциала на 100 мВ составляет $10 \pm 5\%$

(Рисунок 12А). В ходе фаз деполяризации (и реполяризации) ПД суммарная эмиссия в длинноволновой части спектра флюоресценции зонда снижается (и восстанавливается) также быстро как развивается деполяризация и реполяризация (Рисунок 12Б). В результате оптический сигнал оказывается инвертирован, но пропорционален ПД по временным характеристикам. Благодаря свойствам потенциометрического зонда di-4-ANEPPS оказывается возможным регистрировать такие быстрые электрофизиологические процессы как фаза деполяризации ПД и распространение волны возбуждения в миокардиальной ткани.

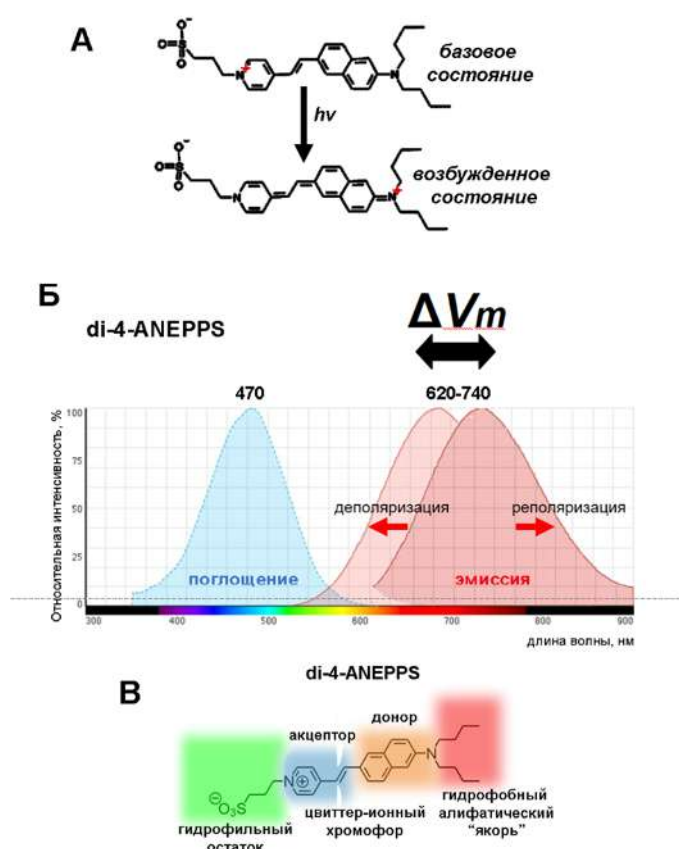


Рисунок 11. Спектральные свойства потенциометрического зонда di-4-ANEPPS, используемого при оптическом картировании биоэлектрической активности. А. Потенциометрический зонд di-4-ANEPPS в базальном и возбужденном состоянии. Б. Соотношение спектров поглощения и эмиссии, а также потенциалзависимость спектра эмиссии di-4-ANEPPS. В. Ключевые мотивы молекулы потенциометрического зонда di-4-ANEPPS. Гидрофобный алифатический «хвост» способствует интеркаляции зонда между липидами мембраны; цвигтер-ионный хромофор обеспечивает флюоресцентные свойства; гидрофильный остаток способствует растворимости молекул в водной среде.

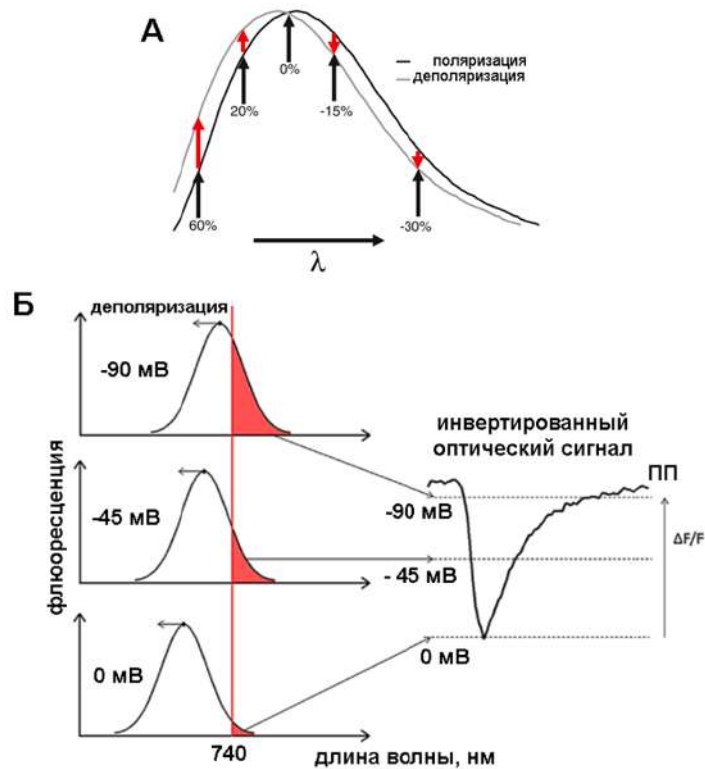


Рисунок 12. Формирование оптических сигналов при потенциалзависимом сдвиге спектра флюоресценции потенциметрического зонда di-4-ANEPPS. А. Изменение интенсивности флюоресценции в разных областях спектра эмиссии di-4-ANEPPS при его потенциалзависимом сдвиге. Б. Формирование инвертированного оптического сигнала пропорционального потенциалу действия при регистрации флюоресценции di-4-ANEPPS в диапазоне от 740 до 800 нм. ПП – потенциал покоя.

Для насыщения ткани ППВ красителем изолированные препараты перфузировали в течение 30 мин раствором, содержащим 5 μM di-4-ANEPPS («Sigma-Aldrich», США). Для этого предварительно растворяли 50 μl 10.5 mM раствора красителя в ДМСО в 100 мл перфузионного раствора. Для подавления механической активности миокардиальных препаратов (с целью снижения искажения регистрации при механических артефактах) использовали разобщитель электромеханического сопряжения BDM (2,3-butanedion monoxime, «Sigma-Aldrich», США), который добавляли в перфузионный раствор (1 г/л).

Флюоресценцию di-4-ANEPPS возбуждали с помощью кольцевого светодиодного осветителя с максимумом спектра излучения 520 нм, номинальной мощностью от 5 Ватт, суммарным световым потоком до 1500 люмен и пульсаций светового потока $<0.1\%$ до частоты 3 КГц.

Флуоресцентные сигналы 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. Матрица имеет гексагональную структуру, наибольшая «строка» включает 24 фотодиода. Оптическая система матрицы была настроена таким образом, что при картировании она «охватывает» участок препарата длиной 5.5 мм (площадь картирования $\approx 19 \text{ мм}^2$). При использовании вышеуказанной оптической системы каждый фотодиод матрицы регистрирует флюоресценцию с участка миокарда диаметром $\approx 0,23 \text{ мм}$, что приблизительно соответствует величине константы длины в миокардиальной ткани. Поле съемки PDA также проецировали на фотокамеру (NexImage, Celestron), что позволяло осуществлять анатомическую локализацию оптических сигналов при анализе данных. 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 всех 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. При построении изохронных карт активации определяли наличие либо отсутствие частичных или полных блоков проведения.

Для определения скорости распространения возбуждения в картируемых препаратах использовали такой параметр, как расчетная скорость (θ_p) – отношение длины картируемой области к времени активации ($t_{\text{акт}}$): $\theta_p, \text{ см/с} = (5 \text{ мм}/t_{\text{акт}}, \text{ мс}) \cdot 100$. Следует отметить, что θ_p и $t_{\text{акт}}$ представляют собой макроскопические параметры, в большей степени отражающие среднее значение скорости проведения в ткани, а не локальное его значение.

Также, многоклеточные препараты ППВ, окрашенные di-4-ANNEPS использовали для подготовки фотографий и визуализации мембраны кардиомиоцитов в стенке ППВ. Фотографии получали при помощи конфокального микроскопа AxioObserver LSM 700.

III.4 Визуализация симпатических волокон в стенке ППВ и оценка эффективности симпатэктомии

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 глиоксиловой кислоты. Данный метод представляет собой флуоресцентную гистохимическую визуализацию биогенных катехоламинов за счет формирования флуорофорного комплекса при взаимодействии с глиоксиловой кислотой [Axelsson et al.,

1972; Lindvall, Björklund, 1974]. При окрашивании многоклеточных препаратов, флуоресценция комплексов глиоксиловой кислоты с катехоламинами отображает расположение и распределение функционально активных симпатических волокон в ткани [Lindvall, Björklund, 1974].

Препараты ППВ или левого предсердия получали согласно методике, описанной в пункте III.1.3. Для оценки эффективности симпатэктомии использовали препараты левого предсердия (ЛП) тех же животных, у которых извлекали ППВ для экспериментов. Препараты помещали в препаровальную камеру, очищали от прилежащих тканей, разрезали вдоль и тщательно промывали раствором Тиродэ. Далее препараты инкубировали в растворе 2% глиоксиловой кислоты в фосфатно-солевом буфере (NaCl 0.09 M; Na₂HPO₄×H₂O 0.01M) с добавлением сахарозы (10%), pH раствора доводили до 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 сухожаровом шкафу при температуре 100°C. Высушенный препарат немедленно покрывали вазелиновым маслом и фиксировали под покровным стеклом. Получение и обработка изображений описана в пункте III.7.

III.5 Иммуногистохимическое окрашивание препаратов ППВ

В работе визуализировали и определяли пространственное и количественное распределение следующих белков ионных каналов и рецепторов в миокардиальной ткани ППВ контрольных (в группах P7 и P60) и симпатэктомизированных (P60-SE) крыс: α_{1A}-адренергические рецепторы; HCN4 – каналы пейсмекерного тока I_f; Cx43 – высокопроводящий коннексин щелевых контактов, характерный для рабочего миокарда, Cav3 – кавеолин 3, структурный белок кавеол кардиомиоцитов; Dystrophin – структурный белок сарколеммы.

III.5.1 Подготовка криосрезов

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 (*Рисунок 28*). Препараты получали аналогично методике, описанной в пункте III.1.3 с изменениями: после вскрытия грудной клетки очищали ППВ от прилежащих соединительных и жировых тканей, освобождая вену на максимальную длину от предсердия к дистальному концу вены,

извлекали сердце целиком вместе с ППВ, далее промывали сердце и сосуды ретроградно через аорту раствором Тиродэ, для полного избавления от остатков крови в камерах сердца и сосудов. Далее лезвием делали поперечный разрез на границе предсердий и желудочков, получая таким образом препарат суправентрикулярной области с ППВ. Препарат помещали в пластиковую камеру объемом 2-3 мл, расправляли препарат при помощи энтомологических иголок таким образом, чтобы участок ППВ находился по центру камеры, не соприкасался со стенками камеры, а полость вены не уплощалась по возможности. Препарат заливали средой для заморозки тканевых образцов Tissue-Tek O.C.T. Compound (Electron Microscopy Sciences, США) и замораживали в парах жидкого азота. Далее получали поперечные и сагиттальные срезы препаратов на криомикротоме (Thermo Scientific™ HM 325 Rotary Microtome) толщиной 16 μm , срезы помещали на предметные стекла, покрытые желатином. До дальнейших манипуляций срезы хранили в кельвинаторе при температуре -80°C .

III.5.2 Иммуногистохимическое окрашивание

Срезы 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 (NaCl 0.09 M; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 0.01M). 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 неспецифичных 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 (Таблица 1, Таблица 2) 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. Получение и обработка изображений описаны в пункте III.7.

Таблица 1. Первичные антитела, использованные в иммуногистохимическом окрашивании.

	Первичное антитело	Хозяин	Разведение	Производитель		Кат. номер
1	HCN4 Monoclonal Antibody (SHG 1E5)	Rat	1:100	Thermo Scientific	Fisher	MA3-903
2	Caveolin 3 Polyclonal Antibody	Rabbit	1:400	Thermo Scientific	Fisher	PA1-066
3	alpha-1a Adrenergic Receptor Polyclonal Antibody	Rabbit	1:100	Thermo Scientific	Fisher	PA1-047
4	Anti-Connexin 43 Antibody, CT Antibody, clone 1C5.1	Mouse	1:400	Merck-Millipore		MABT528
5	Anti-Dystrophin Polyclonal Antibody	Rabbit	1:50	Abcam		ab15277

Таблица 2. Вторичные антитела, использованные в иммуногистохимическом окрашивании.

	Вторичное антитело	Конъюгат	Хозяин	Разведение	Производитель		Кат. номер
1	Anti-Rat	Alexa 488	Goat	1:500	Thermo Scientific	Fisher	A-11006
2	Anti-Rabbit	Alexa 568	Goat	1:500	Thermo Scientific	Fisher	A-11036
3	Anti-Mouse	Alexa 488	Goat	1:500	Thermo Scientific	Fisher	A-11029
4	Anti-Rabbit	Alexa 488	Goat	1:500	Thermo Scientific	Fisher	A-11008

III.6 Гистохимическое окрашивание по Массону (трихром Массона) миокардиальной ткани ПИВ 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).

III.7 Получение, обработка и анализ конфокальных 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 x20.

III.7.1 Получение, обработка и анализ конфокальных изображений симпатических волокон в стенке ППВ и ЛП

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]. После вычитания фона на изображении, деконволюции и бинаризации рассчитывали общее количество флуоресцентно-положительных пикселей, соответствующих содержанию катехоламинов в стенке вены. Далее, при помощи плагина Skeletonize3D (<https://imagej.net/plugins/skeletonize3d>) проводили «скелетонизацию» и анализ «скелета» флуоресцентных волокон. На изображениях определяли площадь и длину «скелетонизированных» волокон, пропорциональную плотности симпатической иннервации [Sathyanesan et al., 2012]. Всего

в расчетах использовали n изображений (указано на *Рисунок 32*), полученных от 3х животных в каждой группе.

III.7.2 Получение, обработка и анализ конфокальных изображений иммуногистохимически окрашенных срезов ППВ

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 (указано на *Рисунок 33*, *Рисунок 35*, *Рисунок 36*), полученных от 3х животных в каждой группе.

Для анализа колокализации HCN4 и Cav3 использовали плагин JACoP [Bolte, Cordelières, 2006]. Использовали метод колокализации Ли и соавторов [Li et al., 2004] – корреляционный анализ интенсивности (Intensity correlation analysis – ICA). Принцип данного метода заключается в следующем: сумма отклонений уровня интенсивности отдельных пикселей от среднего значения интенсивности в каждом отдельном канале равна нулю:

$$\sum_{n \text{ pixels}} (A_i - a) = 0 \text{ и } \sum_{n \text{ pixels}} (B_i - b) = 0,$$

где A_i/B_i – интенсивность единичного пикселя в отдельном канале, a/b – средняя интенсивность в отдельном канале. В случае, если конкретный пиксель в одном канале колокализован с этим же пикселем в другом канале, произведение отклонений интенсивности этого пикселя в каждом из каналов будет положительно, так как в случае колокализации отклонения от средней интенсивности в каждом канале должны иметь одинаковый знак:

$$(A_i - a)(B_i - b) > 0$$

В результате корреляционного анализа интенсивности рассчитывается коэффициент корреляции интенсивности (intensity correlation quotient – ICQ) – отношение количества

положительных значений произведения $(A_i - a)(B_i - b)$ к общему количеству произведений, из которого вычтено 0.5:

$$ICQ = (N_{(A_i - a)(B_i - b) > 0} / N) - 0.5$$

Значения ICQ варьируют в диапазоне от 0.5 (колокализация) до -0.5 (взаимоисключение). В случае большого количества «шумов» или случайного совпадения интенсивностей значения ICQ близки к 0.

В результатах представлены графики, отображающие коэффициент ICQ в группах контрольных животных возраста 7 и 60 дней, а также симпатэктомированных взрослых животных. Всего в расчетах использовали n изображений (указано на *Рисунок 36*), полученных от 3х животных в каждой группе.

III.8 Оценка уровня целевых мРНК в миокарде ППВ методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

Тотальную РНК выделяли из препаратов ППВ и ЛП, которые получали по методике, описанной в пункте III.1.3. Сразу после выделения образцы ППВ и ЛП 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. Прямой

(F) и обратный (R) праймеры (специфичные для крысы, *Rattus norvegicus*) указаны в Таблица 3. В работе определяли относительный уровень мРНК следующих генов: Hcn4 (hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 4), кодирующий канал HCN4 пейсмейкерного тока I_f ; Adra1a (adrenoceptor alpha 1A), кодирующий адренорецептор $\alpha 1A$; 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 (Таблица 3).

Для определения относительного уровня мРНК использовали $\Delta\Delta Ct$ 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. Эффективности для каждой пары праймеров представлены в Таблица 3. Использовали следующую формулу для расчета относительного уровня мРНК:

$$\text{Относительный уровень мРНК} = E^{-\Delta\Delta Ct},$$

где $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (образец) – среднее ΔCt (контроль);

ΔCt (образец) – разница между Ct гена интереса (ГИ) и Ct референсного гена (*rplp0*):

$$\Delta Ct (\text{образец}) = Ct (\text{ГИ в образце}) - Ct (\text{rplp0 в образце});$$

среднее ΔCt (контроль) – средняя разница между Ct гена интереса (ГИ) и Ct референсного гена (*rplp0*) в контрольной группе:

$$\text{среднее } \Delta Ct (\text{контроль}) = \text{среднее} (Ct (\text{ГИ в контроле}) - Ct (\text{rplp0 в контроле})).$$

Относительный уровень мРНК исследовали в миокарде ППВ и рабочем миокарде ЛП в группах контрольных семидневных крыс (Контроль Р7), контрольных взрослых крыс (Контроль Р60) и симпатэктомизированных взрослых крыс (Симпатэктомия Р60). В качестве контрольной группы, относительно которой оценивали уровень мРНК в образцах, использовали группу с образцами рабочего миокарда ЛП взрослых крыс (ЛП – Контроль Р60).

Таблица 3. Последовательности праймеров (прямой – F, обратный – R, (специфичные для крысы, *Rattus norvegicus*)), используемые в работе.

	Ген	Описание	Референсная последовательность NCBI	Последовательность праймеров 5'-3'	Эффективность праймеров	Размер ПЦР-продукта
1	Rplp0	ribosomal protein lateral stalk subunit P0	NM_022402.2	F: AGGGTCCTGGCTTTGTCTGTGG R: AGCTGCAGGAGCAGCAGTGG	2.072	135
2	Hcn4	hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 4	NM_021658.2	F: ACCAGGAGAAGTACAAGCAGGTGG R: TGATGATCTCCTCTCGAAGCGGCT	1.953	168
3	Adra1a	adrenoceptor alpha 1A	NM_017191.2	F: GTAGCCAAGAGAGAAAGCCG R: CAACCCACCACGATGCCAG	1.968	212
4	Kcnj12	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12	NM_053981.2	F: GGCATCATCTTCTGGGTCAT R: CACTGGGCACTCTTCAGTCA	1.941	177
5	Nkx2-5	NK2 homeobox 5	NM_053651.2	F: GGCGGATAAGAAAGAGCTGTGC R: ACACTTGTAGCGGCGGTTCT	2.066	259

III.9 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). *P*-уровни значимости указаны на графиках.

III.10 Реактивы, используемые в работе

Таблица 4. Реактивы, используемые в работе

Название	Фармакологическая активность	Производитель	Растворитель	Рабочая концентрация
di-4-ANNEPS	Потенциалчувствительный флуоресцентный краситель	Sigma Aldrich	DMSO	5 μ M
ДМСО (диметилсульфоксид)	Растворитель органических молекул	Helicon	-	50 мкл 10.5 мМ / 100 мл р-ра
BDM (2,3-butanedion monoxime)	Разобщитель электромеханического сопряжения	Sigma Aldrich	H ₂ O	1 г/л
Глиоксиловая кислота	Флуоресцентный маркер симпатических волокон	Sigma Aldrich	H ₂ O	2%
Гуанетидина сульфат	Препарат, блокирующий адренергические нейроны, проникает в норадренергические нервные окончания, вытесняя норадреналин	MedChemExpress	0.9% физ. раствор	25 мг/кг и 50 мг/кг
Норадреналин	Агонист α - и β -адренорецепторов	Sigma Aldrich	H ₂ O	10 μ M
Фенилэфрин	Агонист α -адренорецепторов	Sigma Aldrich	H ₂ O	10 μ M
Изопротеренол	Агонист β -адренорецепторов	Sigma Aldrich	H ₂ O	10 μ M
Параформальдегид	Фиксатор тканевых структур	Sigma Aldrich	Фосфатно-солевой буфер	4%

Triton-x100	Детергент	Sigma Aldrich	Фосфатно-солевой буфер	0.1%
Козья сыворотка	Блокировка неспецифичных сайтов связывания антител	Sigma Aldrich	Фосфатно-солевой буфер	5%
DAPI	Ядерный краситель	Sigma Aldrich	Фосфатно-солевой буфер	1:2000
Vectashield Antifade Mounting Medium H-1000-10	Среда для фиксации препаратов	Vector Laboratories	-	-
ExtractRNA	Реагент для выделения суммарной РНК	Евроген	-	Согласно инструкции производителя
Хлороформ	Экстракция нуклеиновых кислот	Химмед	-	100%
Изопропанол	Осаждение РНК	Химмед	-	100%
RNase-free DNase I kit	Эндонуклеаза, удаляющая одно- и двухцепочечную ДНК	Thermo Fisher	-	В соответствии с инструкцией производителя
MMLV RT kit	Обратная транскриптаза	Евроген	-	Согласно инструкции производителя
qPCRMix-HS SYBR kit	5X реакционная смесь qPCRMix-HS SYBR предназначена для высокоспецифичной ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем SYBR Green I	Евроген	-	Согласно инструкции производителя

IV РЕЗУЛЬТАТЫ

IV.1 Электрофизиологические характеристики миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза

IV.1.1 Мембранный потенциал покоя (МПП) и потенциал действия (ПД) в 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 (Рисунок 13А). 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 (Рисунок 13Б, Таблица 5).

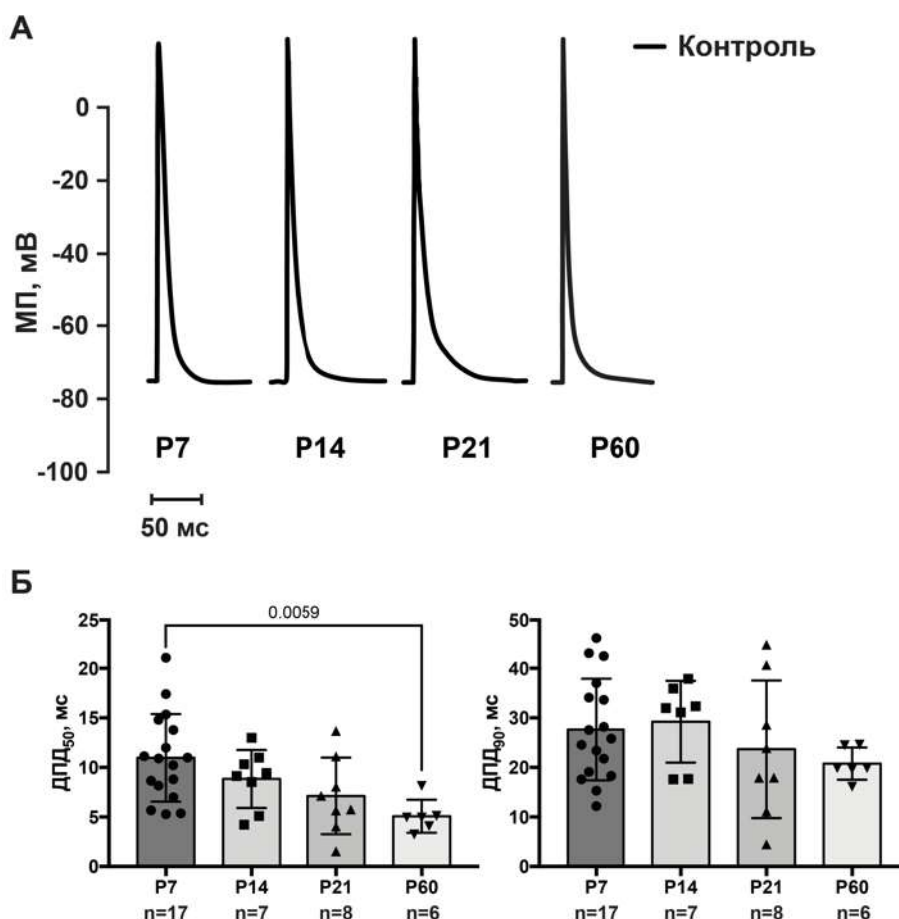


Рисунок 13. Электрически вызванные ПД в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза (P7-P60). А – репрезентативные примеры электрически вызванных ПД. МП – мембранный потенциал. Б – длительность ПД на уровне 50% и 90% реполяризации (ДПД₅₀ и ДПД₉₀). Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест Даннета

Таблица 5. Длительность ПД на уровне 50% и 90% реполяризации (ДПД₅₀ и ДПД₉₀) в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс на разных этапах постнатального онтогенеза (P7-P60).

ДПД ₅₀					ДПД ₉₀				
	P7	P14	P21	P60		P7	P14	P21	P60
n	17	7	8	6	n	17	7	8	6
Среднее	11.0	8.8	7.1	5.1	Среднее	27.7	29.2	23.7	20.8
Ст. откл.	4.4	2.9	3.9	1.7	Ст. откл.	10.3	8.3	13.9	3.3

Мембранный потенциал покоя в миокардиальной ткани ППВ не отличался среди разных возрастов при электрической стимуляции препаратов (Рисунок 14, Таблица 6). Прекращение электрической стимуляции препаратов приводило к значительной деполяризации МПП во всех возрастных группах (Рисунок 14). Степень спонтанной деполяризации не различалась среди разных возрастных групп.

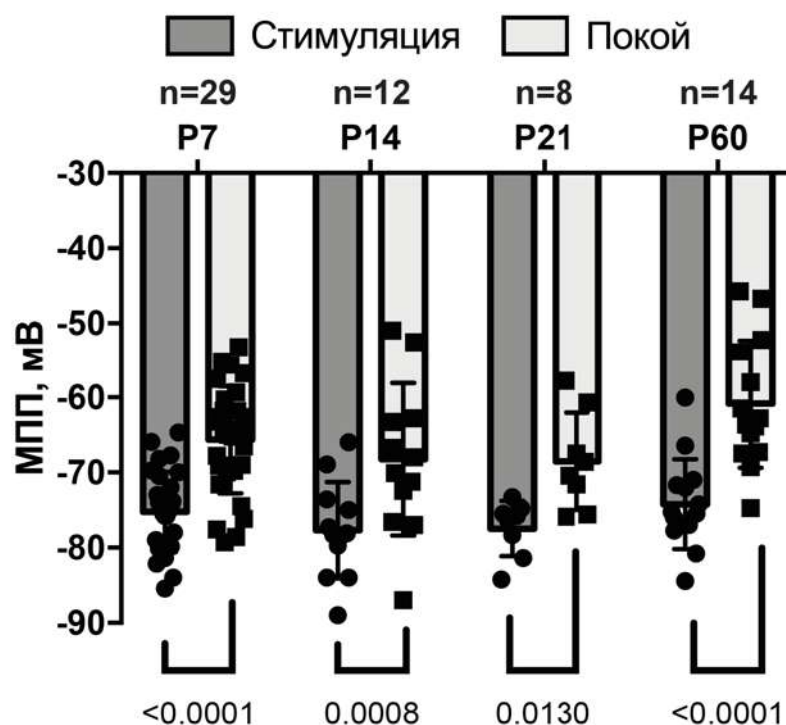


Рисунок 14. Потенциал покоя в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза (P7-P60) при электрической стимуляции и в состоянии покоя. Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест Шидака.

Таблица 6. Потенциал покоя в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза (P7-P60).

Контроль	Стимуляция			Покой		
	Среднее	Ст. откл.	n	Среднее	Ст. откл.	n
P7	-75.25	5.34	29	-65.65	7.13	29
P14	-77.69	6.40	12	-68.22	10.13	12
P21	-77.46	3.67	8	-68.51	6.49	8
P60	-74.22	5.97	14	-60.84	8.52	14

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 (Рисунок 15). dv/dt_{\max} в препаратах ППВ семидневных крыс (P7) была значительно ниже по сравнению с таковой в группе взрослых животных (P60) ($p=0.0068$).

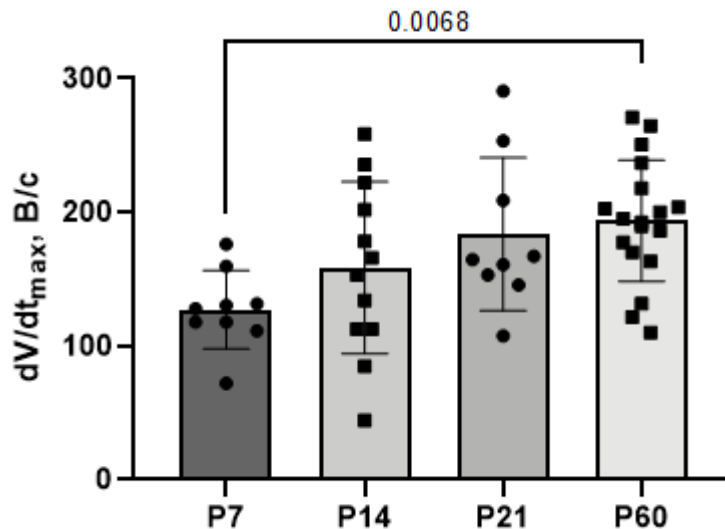


Рисунок 15. Максимальная скорость нарастания переднего фронта ПД (dv/dt_{\max}) в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза (P7-P60) при электрической стимуляции. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест Даннета.

IV.1.2 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 (*Рисунок 16*). 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) (*Рисунок 16Г, Рисунок 16А,*

Таблица 7).

Спонтанные ПД в группе P7 имели форму пейсмекер-подобных ПД: обладали медленным фронтом нарастания и фазой медленной диастолической деполяризации (МДД) (*Рисунок 16А*). Фазой МДД обладали 7 из 9 препаратов ППВ в группе P7. В группах P14 и P21 СПД, обладающие фазой МДД, были зарегистрированы в одном случае в каждой группе, в остальных же случаях в спонтанно активных препаратах СПД не имели фазы МДД (*Таблица 8*).

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) (*Рисунок 16Г*). В группах P7, P14, P21 и P60 частота САУ составляла 3.92 ± 0.69 Гц, 4.6 ± 1.1 Гц, 4.6 ± 1.7 Гц и 4.62 ± 0.8 Гц, в то время как в изолированных спонтанно-активных препаратах частота СПД составляла 2.5 ± 1.6 Гц, 2.4 ± 2.0 Гц, 1.9 ± 1.5 Гц и 0.0 ± 0.0 Гц, соответственно (*Таблица 9*).

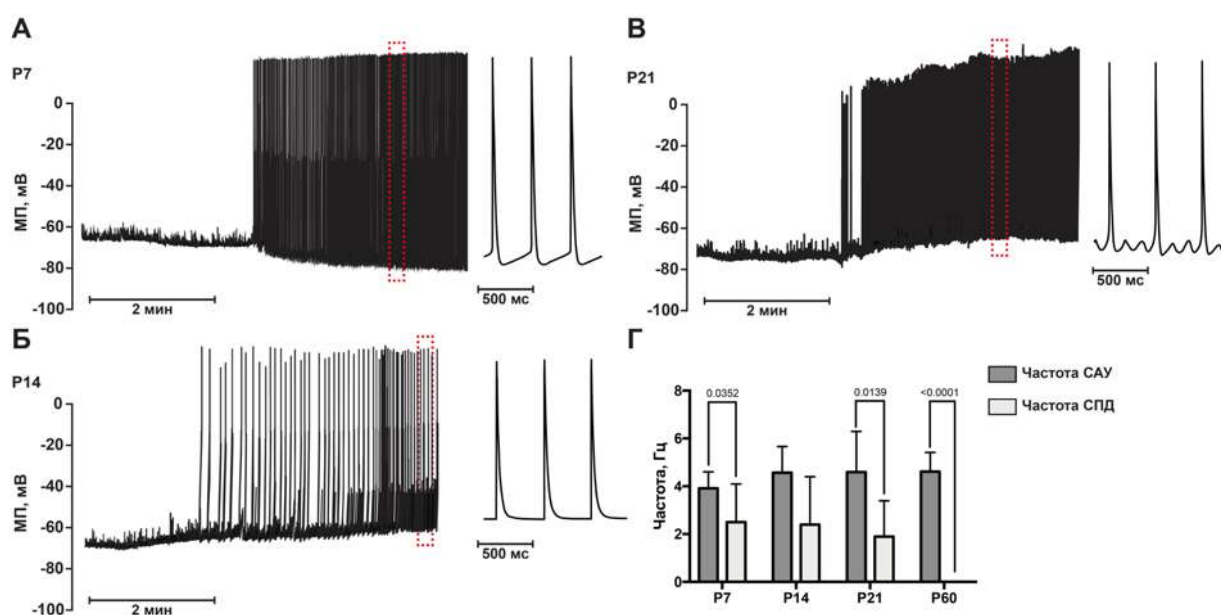


Рисунок 16. Спонтанная эктопическая активность в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза в базальных условиях. А-В – репрезентативные примеры спонтанной активности и отдельных СПД в базальных условиях и в отсутствие электрической стимуляции в препаратах ППВ 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 дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест Шидака.

IV.1.3 Спонтанная активность в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза при адренергической стимуляции

Спонтанная активность в миокарде ППВ контрольных крыс при действии норадреналина

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, *Рисунок 17*). 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) (*Рисунок 20Б*). При действии НА в препаратах ППВ наблюдали СПД различного характера: пейсмекер-подобные с фазой МДД (7 случаев в P7, 4 случая в P14, 2 случая в P21 и 0 случаев в P60), и ПД, не обладающие фазой МДД (*Рисунок 17*).

Характер индуцированной НА спонтанной активности в миокардиальной ткани ППВ изменялся в ходе увеличения возраста животных: в группах P7-P21 спонтанная активность

представляла собой permanently возникающие СПД, в то время как в группе взрослых животных Р60 спонтанная активность была зарегистрирована в форме залпов возникающих СПД с интервалами покоя (*Рисунок 17Г*). Наиболее высокая частота возникновения НА-индуцированных СПД была зарегистрирована в группе Р7 и составляла 2.8 ± 1.5 Гц, наименьшая – в группе Р60 – 0.2 ± 0.6 Гц (*Таблица 9*).

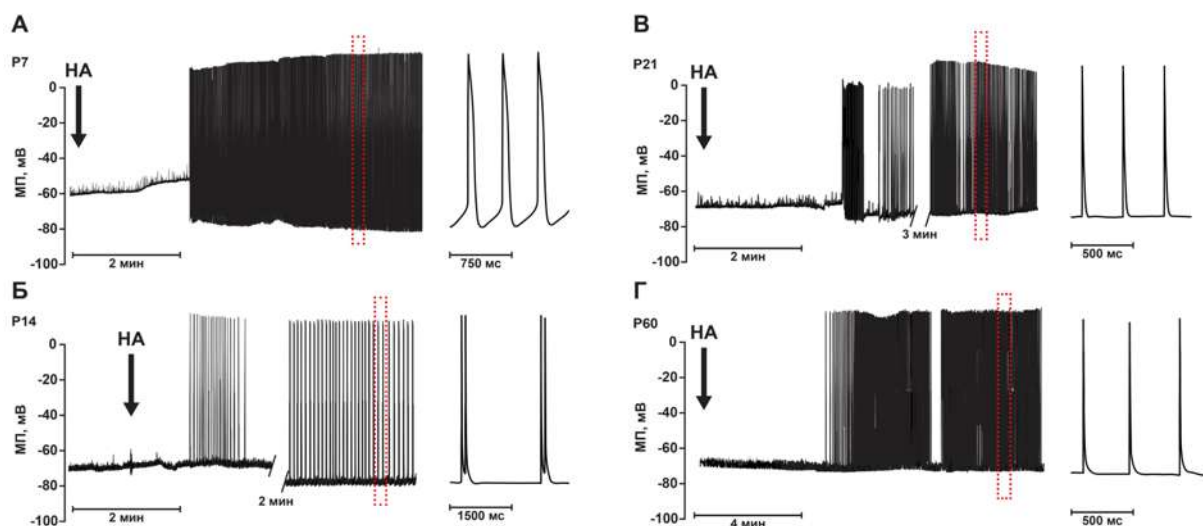


Рисунок 17. Спонтанная эктопическая активность в миокардиальной такни ППВ контрольных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза при действии норадреналина (НА, 10 мкМ) в отсутствие электрической стимуляции. А-Г – репрезентативные примеры спонтанной активности и отдельных СПД при действии НА в препаратах ППВ контрольных крыс возраста 7, 14, 21 и 60 дней (Р7, Р14, Р21 и Р60). Примеры СПД справа были зарегистрированы в области записи, обозначенной пунктирными прямоугольниками.

Спонтанная активность в миокарде ППВ контрольных крыс при действии изопротеренола

Изопротеренол (ИЗО, 10 мкМ), агонист β -АР, индуцировал возникновение СПД в препаратах ППВ контрольных животных всех возрастов (Р7-Р60). Действие ИЗО индуцировало возникновение permanently следующих или «залпов» СПД в 43% (3 из 7), 17% (1 из 6), 33% (2 из 6) и 45% (5 из 11) в группах Р7, Р14, Р21 и Р60, соответственно (*Рисунок 18*). Способность ИЗО индуцировать спонтанную активность в миокарде ППВ контрольных животных в группе взрослых животных (Р60) была на уровне таковой у неонатальных животных (*Рисунок 20*). Индуцированные изопротеренолом СПД преимущественно не обладали фазой МДД (*Таблица 8*).

Спонтанная активность в ППВ при действии ИЗО возникала как в форме permanently следующих СПД (преимущественно в группах Р7 и Р14), так и в виде залпов СПД. Частота следования СПД при действии ИЗО представлена в *Таблица 9*.

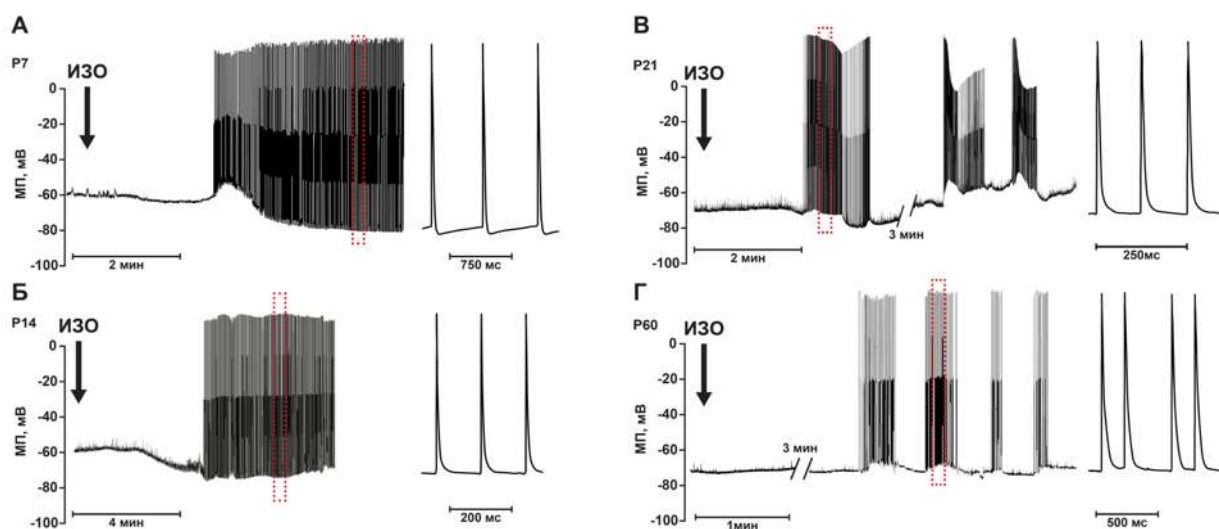


Рисунок 18. Спонтанная эктопическая активность в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза при действии изопротеренола (ИЗО, 10 мкМ) в отсутствие электрической стимуляции. А-Г – репрезентативные примеры спонтанной активности и отдельных СПД при действии ИЗО в препаратах ППВ контрольных крыс возраста 7, 14, 21 и 60 дней (P7, P14, P21 и P60). Примеры СПД справа были зарегистрированы в области записи, обозначенной пунктирными прямоугольниками.

Спонтанная активность в миокарде ППВ контрольных крыс при действии фенилэфрина

Фенилэфрин (ФЭ, 10 мкМ), агонист α_1 -АР, индуцировал возникновение СПД в препаратах ППВ контрольных животных всех возрастов (P7-P60). Действие ФЭ индуцировало 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 (*Рисунок 19, Рисунок 20*). При действии ФЭ регистрировали пейсмекер-подобные СПД, обладающие фазой МДД (все случаи в группе P7, два случая в P14 и один в P21), так и СПД без фазы спонтанной деполяризации (*Таблица 8*).

Спонтанная активность в ППВ при действии ФЭ имела перманентный характер во всех случаях, за исключением одного – в группе P21 (*Рисунок 19*). Частота следования СПД при действии ФЭ представлена в *Таблица 9*.

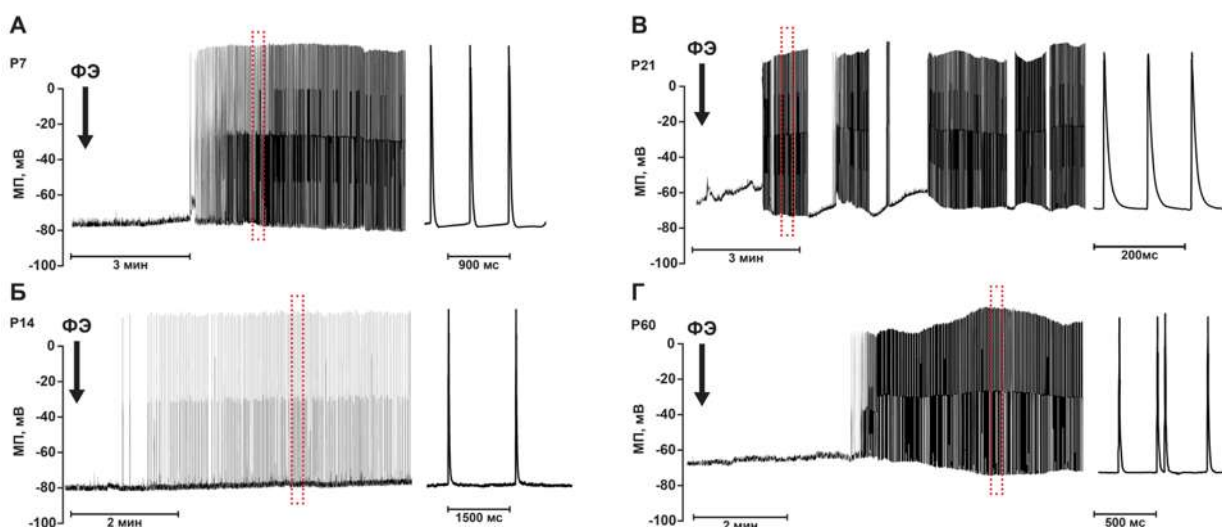


Рисунок 19 Спонтанная эктопическая активность в миокардиальной такни ППВ контрольных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза при действии фенилэфрина (ФЭ, 10 мкМ) в отсутствие электрической стимуляции. А-Г – репрезентативные примеры спонтанной активности и отдельных СПД при действии ФЭ в препаратах ППВ контрольных крыс возраста 7, 14, 21 и 60 дней (P7, P14, P21 и P60). Примеры СПД справа были зарегистрированы в области записи, обозначенной пунктирными прямоугольниками.

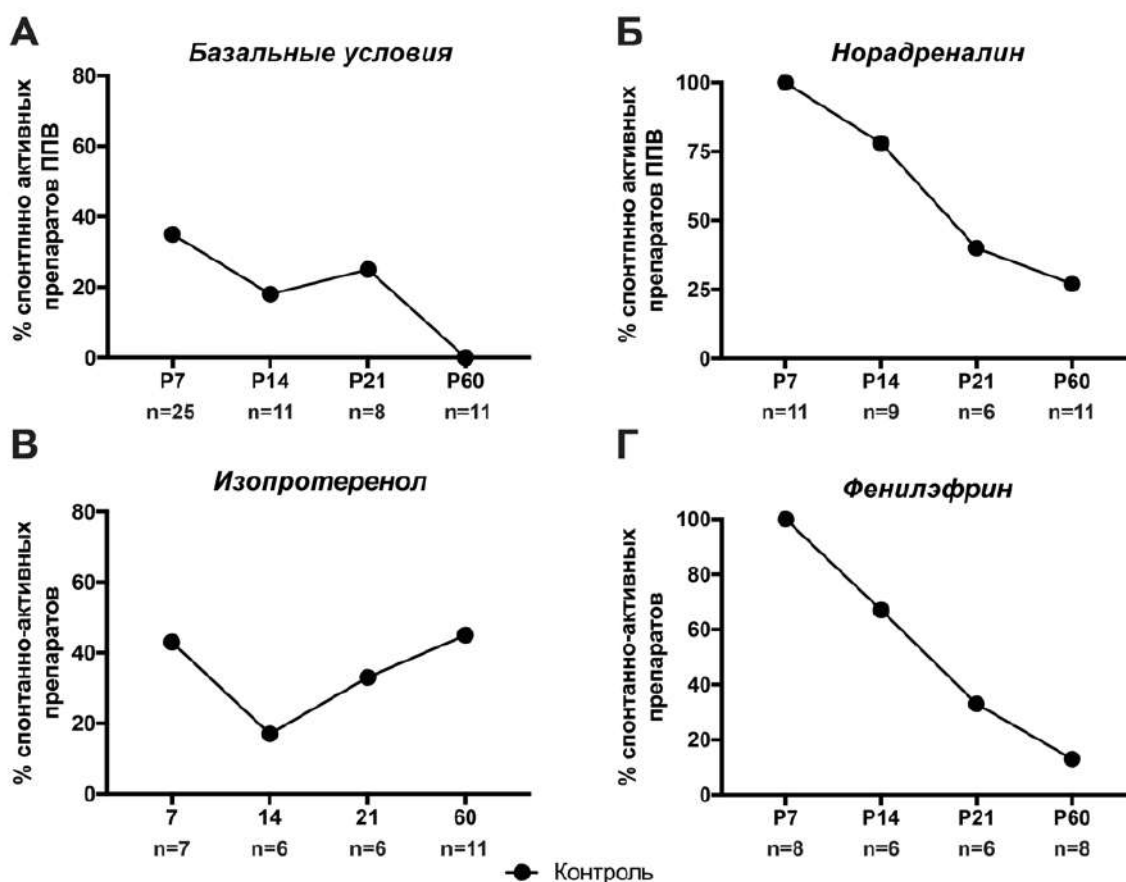


Рисунок 20. Процентное соотношение количества спонтанно активных препаратов ППВ контрольных крыс в различных условиях на разных стадиях постнатального онтогенеза (группы P7-P60). Суммарное количество препаратов в каждой группе указано на графике.

Таблица 7. Количество случаев возникновения спонтанной активности в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза (P7-P60) в базальных условиях и при адренергической стимуляции норадреналином (НА, 10 мкМ), изопротеренолом (ИЗО, 10 мкМ) и фенилэфрином (ФЭ, 10 мкМ). n – общее количество экспериментов, СПД+ – количество случаев возникновения спонтанных потенциалов действия (СПД), %СПД – процент спонтанно-активных препаратов в каждой группе.

	Базальные условия			НА			ИЗО			ФЭ		
	n	СПД+	% СПД	n	СПД+	% СПД	n	СПД+	% СПД	n	СПД+	% СПД
P7	25	9	36%	11	11	100%	7	3	43%	8	8	100%
P14	11	2	18%	9	7	78%	6	1	17%	6	4	67%
P21	8	2	25%	6	3	50%	6	2	33%	6	2	33%
P60	11	0	0%	11	3	27%	11	5	45%	8	1	13%

Таблица 8. Количество случаев возникновения СПД, обладающих фазой МДД, в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс разных возрастов (P7-P60) в различных условиях.

	Базальные условия		НА		ИЗО		ФЭ	
	n СПД+	МДД+	n СПД+	МДД+	n СПД+	МДД+	n СПД+	МДД+
P7	9	7	11	7	3	1	8	8
P14	2	1	7	4	1	0	4	2
P21	2	1	3	2	2	0	2	1
P60	0	0	3	0	5	0	1	0

Таблица 9. Частота следования СПД в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс разных возрастов (P7-P60) в различных условиях. САУ – частота следования ПД, зарегистрированных до изоляции миокарда ППВ от САУ; Базальные условия – частота следования СПД в изолированной миокардиальной ткани ППВ в отсутствие электрической стимуляции; Норадреналин, Изопротеренол, Фенилэфрин – частота следования СПД в миокардиальной ткани ППВ действии соответствующих агонистов адренорецепторов в отсутствие электрической стимуляции.

	P7			P14			P21			P60		
	Ср.	Ст.откл.	n	Ср.	Ст.откл.	n	Ср.	Ст.откл.	n	Ср.	Ст.откл.	n
САУ	3.92	0.69	10	4.57	1.1	6	4.6	1.7	7	4.62	0.8	10
Базальные условия	2.5	1.6	8	2.4	2	2	1.9	1.5	2	0	0	0
Норадреналин	2.8	1.5	15	1.2	2.3	9	1.8	1.8	6	0.2	0.6	11
Фенилэфрин	2.4	1.2	8	1.5	2.4	6	2	3.9	6	0.3	0.8	8
Изопротеренол	0.8	1	7	1.2	2.9	6	1	2.2	6	0.9	1.5	11

IV.2 Электрофизиологические характеристики миокардиальной ткани ППВ симпатэктомированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза

IV.2.1 Мембранный потенциал покоя (МПП) и потенциал действия (ПД) в миокардиальной ткани ППВ симпатэктомированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза

Как и в группе контрольных животных, в базальных условиях электрически вызванные ПД с миокардиальной ткани ППВ симпатэктомированных крыс обладали характеристиками ПД рабочего миокарда предсердий: имели высокую скорость нарастания переднего фронта ПД и стабильный уровень максимальной диастолической реполяризации (*Рисунок 21*). 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), $p=0.0247$, *Рисунок 21*). ДПД₉₀ в группе симпатэктомированных животных, в отличие от контрольной группы, 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 (*Рисунок 21Б, Таблица 10*).

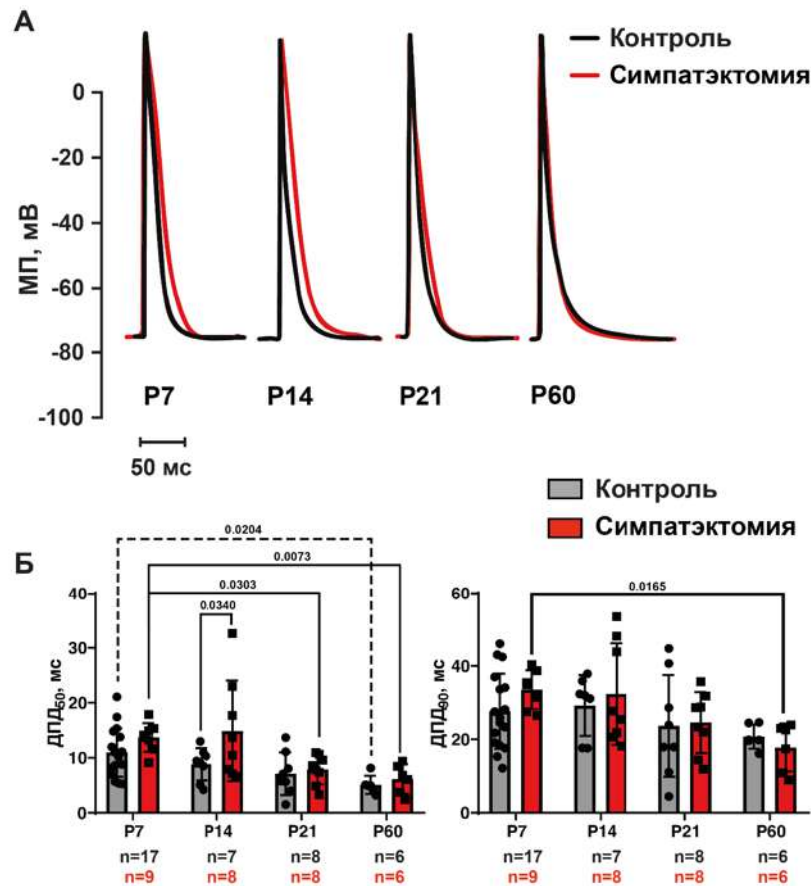


Рисунок 21. Электрически вызванные ПД в миокардиальной ткани ППВ контрольных и симпатэктомированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза (P7-P60). А – репрезентативные примеры электрически вызванных ПД, МП – мембранный потенциал. Б – длительность ПД на уровне 50% и 90% реполяризации (ДПД₅₀ и ДПД₉₀). Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест Шидака.

Таблица 10. Длительность ПД на уровне 50% и 90% реполяризации (ДПД₅₀ и ДПД₉₀) в миокардиальной ткани ППВ симпатэктомированных крыс на разных этапах постнатального онтогенеза (P7-P60).

ДПД ₅₀				ДПД ₉₀					
	P7	P14	P21	P60		P7	P14	P21	P60
n	9	8	8	6	n	9	8	8	6
Среднее	13.5	15.0	7.9	6.2	Среднее	33.9	35.3	24.6	17.8
Ст. откл.	2.5	8.9	2.7	2.7	Ст. откл.	4.8	12.6	8.3	6.5

Аналогично контрольной группе, МПП в миокардиальной ткани ППВ симпатэктомированных крыс не различался среди разных возрастов при электрической стимуляции препаратов (*Рисунок 22, Таблица 11*). Также, как и в контрольной группе, прекращение электрической стимуляции препаратов приводило к значительной деполяризации МПП во всех возрастных группах (*Рисунок 22*). Степень спонтанной

деполяризации не различалась среди разных возрастных групп и была сходной с таковой в контрольной группе.

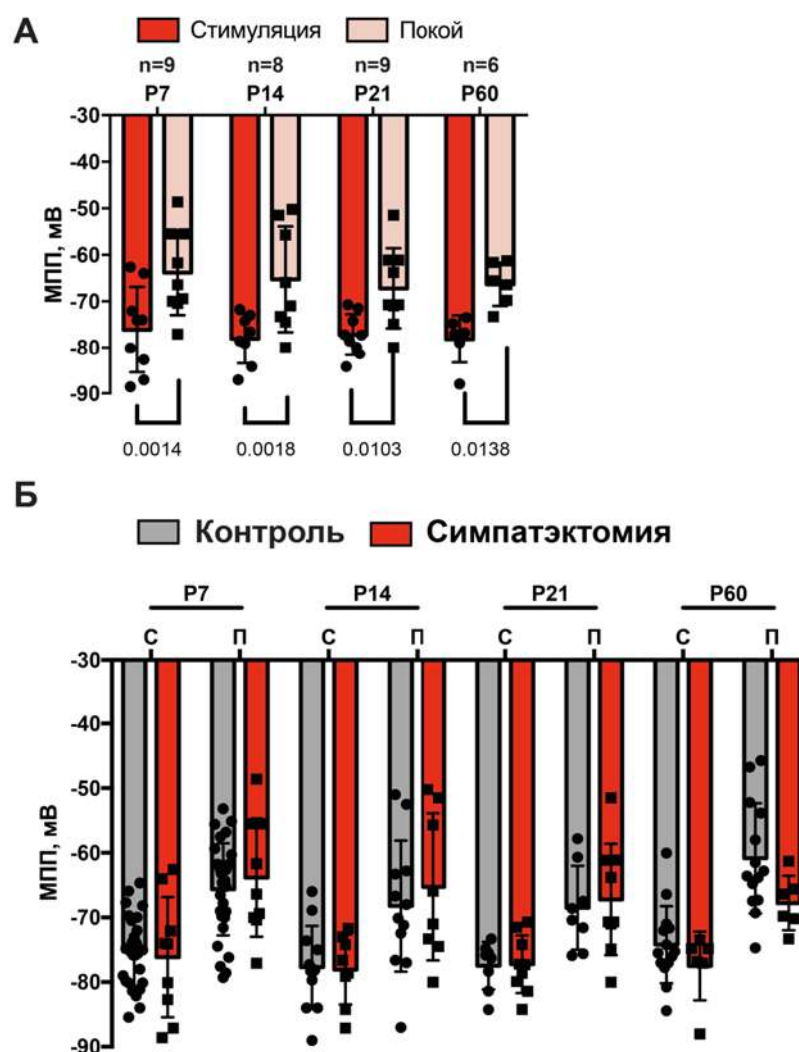


Рисунок 22. Мембранный потенциал покоя (МПП) в миокардиальной ткани ПШВ контрольных и симпатэктомированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза (P7-P60) при электрической стимуляции и в состоянии покоя. А – МПП в миокарде ПШВ симпатэктомированных крыс. Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест на множественные сравнения Шидака. Б – МПП контрольных и симпатэктомированных крыс. С – стимуляция, П – покой.

Таблица 11. Мембранный потенциал покоя в миокардиальной ткани ПШВ симпатэктомированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза (P7-P60).

	Стимуляция			Покой		
	Среднее	Ст. откл.	n	Среднее	Ст. откл.	n
P7	-76.14	9.29	9	-63.84	9.15	9
P14	-78.06	5.40	8	-65.26	11.39	8
P21	-77.23	4.46	9	-67.20	8.62	9
P60	-78.18	5.17	6	-66.34	4.66	6

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 ($p>0.05$) (Рисунок 23,

Таблица 12). В отличие от контрольной группы животных, значимого различия в dv/dt_{\max} между разными возрастными группами у симпатэктомированных крыс обнаружено не было.

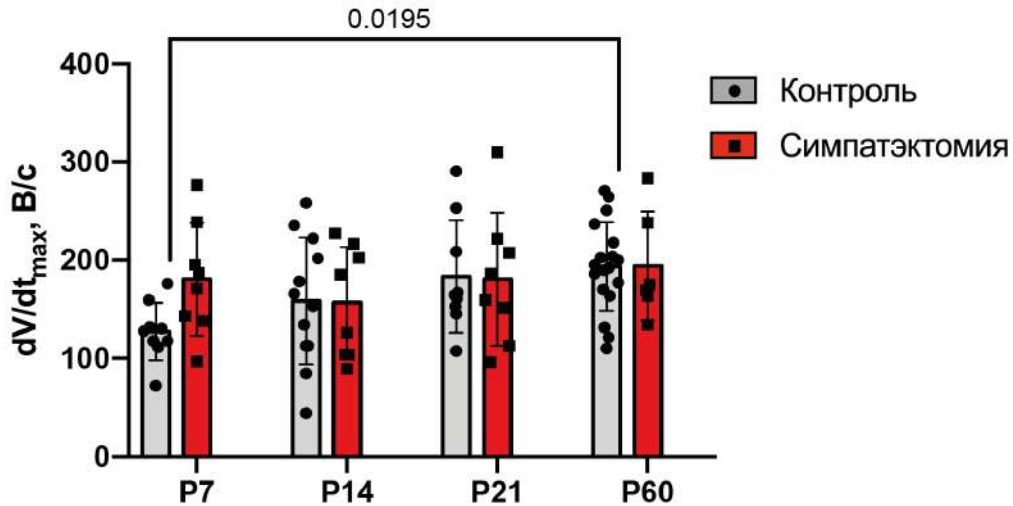


Рисунок 23. Максимальная скорость нарастания переднего фронта ПД (dv/dt_{\max}) в миокардиальной ткани ППВ контрольных и симпатэктомированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза (P7-P60) при электрической стимуляции. Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест на множественные сравнения Шидака.

Таблица 12. Скорость нарастания переднего фронта ПД (dv/dt_{\max}) в миокардиальной ткани ППВ симпатэктомированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза (P7-P60).

	Контроль			Симпатэктомия		
	Среднее	Ст.откл.	n	Среднее	Ст.откл.	n
P7	127.2	29.4	9	180.8	57.5	8
P14	158.7	64.3	12	156.7	56.7	8
P21	183.5	57.3	9	180.7	67.8	8
P60	193.6	45.2	18	194.1	55.5	6

IV.2.2 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 (*Рисунок 24*). У симпатэктомированных крыс СПД наблюдали в 75% (6 из 8) препаратов в группе Р7; в 50% (4 из 8) в Р14, в 25% (2 из 8) в Р21 и в 67% (4 из 6) в Р60 (*Таблица 13*).

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 Р7, 3 из 4 препаратов ППВ в группе Р14, 1 из 2 препаратов ППВ в группе Р21, 2 из 4 препаратов ППВ в группе Р60 (*Таблица 14*).

Характер спонтанной активности в миокарде ППВ симпатэктомированных крыс был преимущественно перманентный, залповую спонтанную активность наблюдали лишь в одном случае (в группе Р21) (*Рисунок 24*). 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 Р14 (*Рисунок 24Д*). В группах Р7, Р14, Р21 и Р60 частота САУ составляла 4.55 ± 1.52 Гц, 4.82 ± 0.54 Гц, 4.91 ± 1.2 Гц и 5.3 ± 0.45 Гц, в то время как в изолированных спонтанно-активных препаратах частота СПД составляла 1.41 ± 0.52 Гц, 3.92 ± 1.72 Гц, 1.59 ± 2.23 Гц и 0.92 ± 0.94 Гц, соответственно (*Таблица 15*).

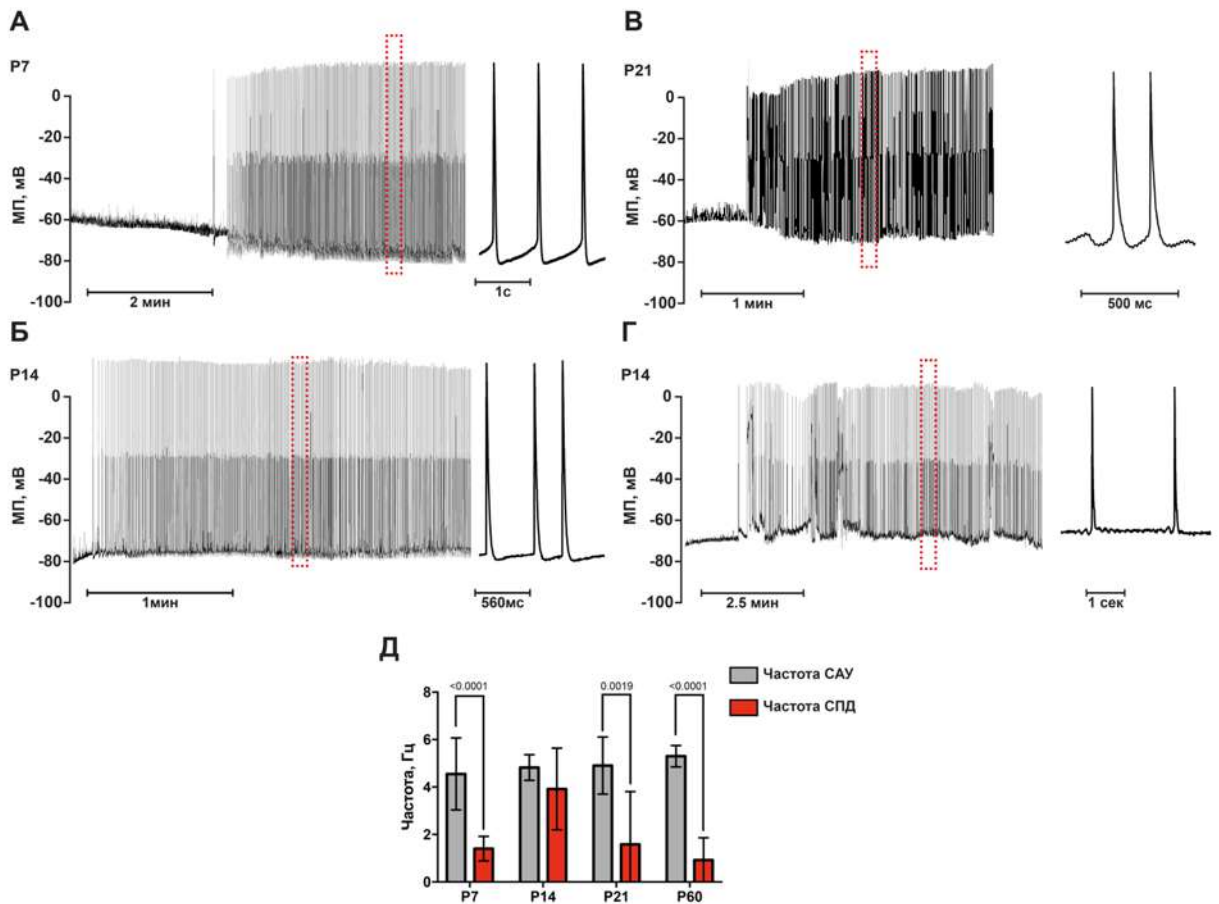


Рисунок 24. Спонтанная эктопическая активность в миокардиальной ткани ППВ симпатэктомизированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза в базальных условиях. А-В – репрезентативные примеры спонтанной активности и отдельных СПД в базальных условиях и в отсутствие электрической стимуляции в препаратах ППВ контрольных крыс возраста 7, 14, 21 и 60 дней (P7, P14, P21 и P60). Примеры СПД справа были зарегистрированы в области записи, обозначенной пунктирными прямоугольниками. Д – частота возникновения ПД, зарегистрированных до изоляции препарата ППВ от САУ (частота САУ) и частота возникновения СПД в миокарде ППВ симпатэктомизированных крыс в базальных условиях в отсутствие электрической стимуляции препаратов. Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест на множественные сравнения Шидака.

IV.2.3 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_{1A} -АР –ИЗО и ФЭ.

Спонтанная активность в миокарде ППВ контрольных крыс при действии изопротеренола

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 (*Рисунок 25, Рисунок 26*). Фазой МДД обладали индуцированные изопротеренолом СПД в группах P7 и P14 (*Рисунок 25А*), но не в P60 (*Рисунок 25Б, Таблица 14*).

За исключением одного случая (в группе P60) характер спонтанной активности в препаратах ППВ симпатэктомированных крыс при действии ИЗО был перманентный. Частота следования СПД при действии ИЗО представлена в *Таблица 15*.

Спонтанная активность в миокарде ППВ контрольных крыс при действии фенилэфрина

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 (*Рисунок 25, Рисунок 26*). Фазой МДД обладали все индуцированные фенилэфрином СПД, за исключением группы P60 (*Рисунок 25В-Е, Таблица 14*).

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). Частота следования СПД при действии ФЭ представлена в *Таблица 15*.

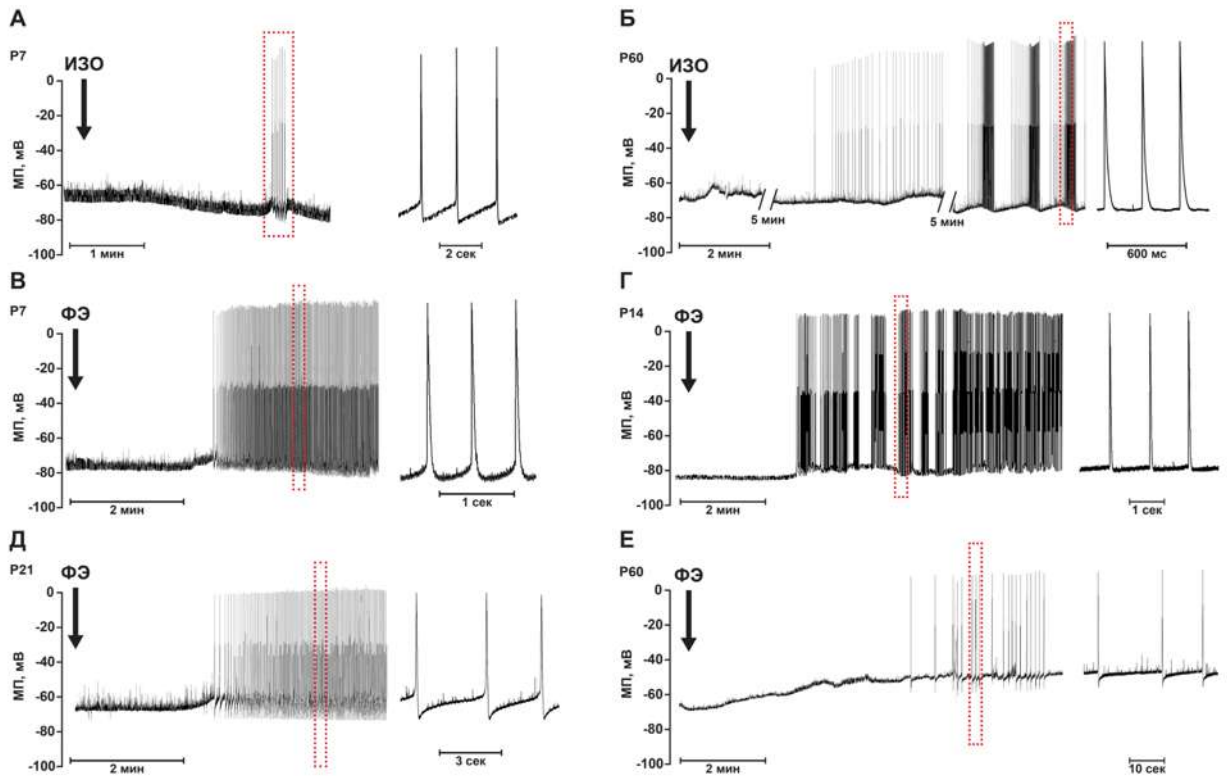


Рисунок 25. Спонтанная эктопическая активность в миокардиальной такни ППВ симпатэктомированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза при адренергической стимуляции (ИЗО, 10 мкМ; ФЭ, 10 мкМ) в отсутствие электрической стимуляции. А-Б – репрезентативные примеры спонтанной активности и отдельных СПД при действии ИЗО в препаратах ППВ симпатэктомированных крыс возраста 7 и 60 дней (P7 и P60). В-Е – репрезентативные примеры спонтанной активности и отдельных СПД при действии ФЭ в препаратах ППВ симпатэктомированных крыс возраста 7, 14, 21 и 60 дней (P7, P14, P21 и P60). Примеры СПД справа были зарегистрированы в области записи, обозначенной пунктирными прямоугольниками.

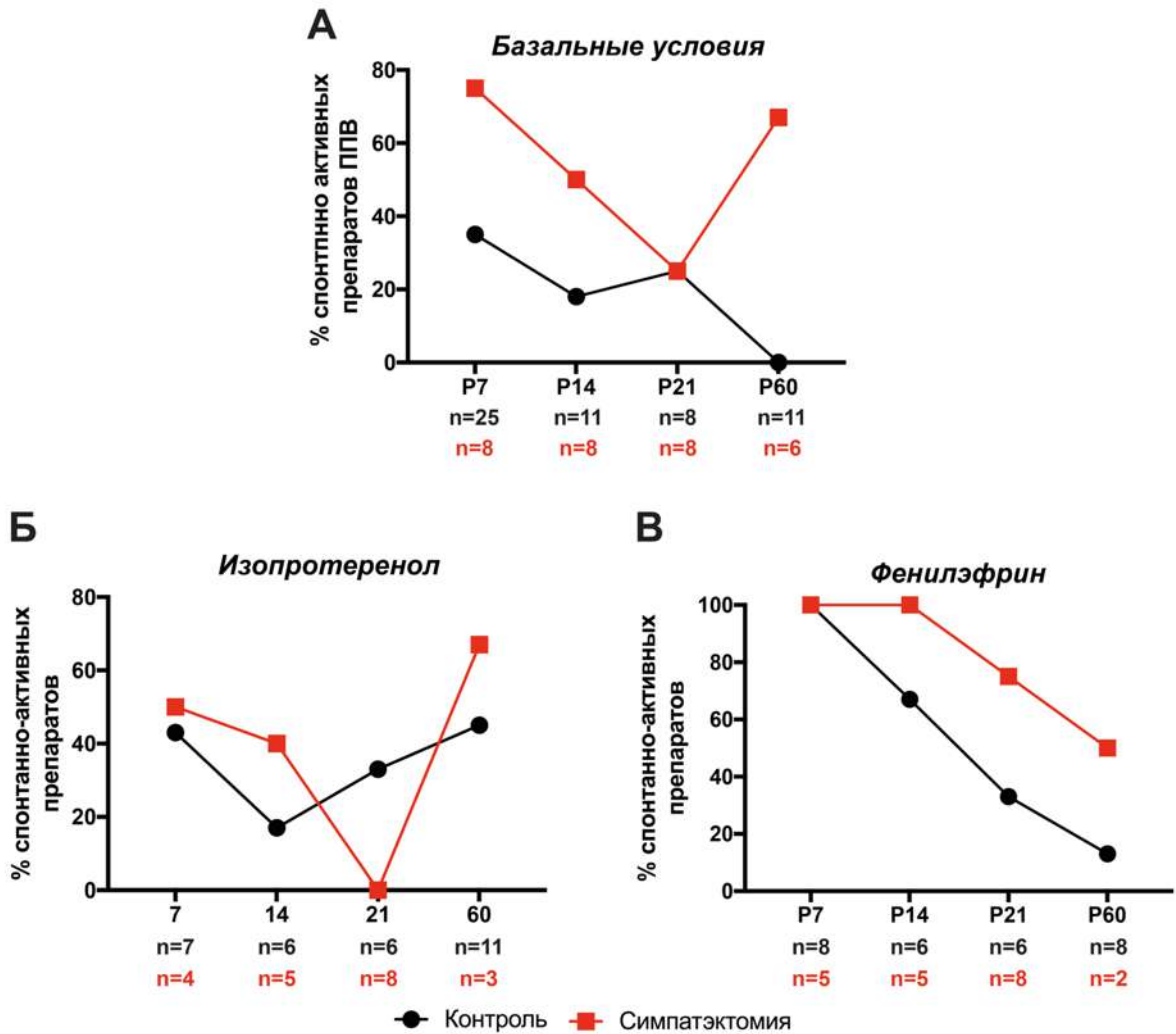


Рисунок 26. Процентное соотношение количества спонтанно активных препаратов ППВ симпатэктомизированных и контрольных крыс в различных условиях на разных стадиях постнатального онтогенеза (группы P7-P60). Суммарное количество препаратов в каждой группе указано на графике.

Таблица 13. Количество случаев возникновения СПД, в миокардиальной ткани ППВ симпатэктомизированных крыс разных возрастов (P7-P60) в различных условиях.

	Базальные условия			ИЗО			ФЭ		
	n	СПД+	% СПД	n	СПД+	% СПД	n	СПД+	% СПД
P7	8	6	75%	4	2	50%	5	5	100%
P14	8	4	50%	5	2	40%	5	5	100%
P21	8	2	25%	8	0	0%	8	6	75%
P60	6	4	67%	3	2	67%	2	1	50%

Таблица 14. Количество случаев возникновения СПД, обладающих фазой МДД, в миокардиальной ткани ППВ симпатэктомизированных крыс разных возрастов (P7-P60) в различных условиях.

	Базальные условия		ИЗО		ФЭ	
	п СПД+	МДД+	п СПД+	МДД+	п СПД+	МДД+
Р7	6	5	2	2	5	5
Р14	4	3	2	1	5	5
Р21	2	1	0	0	6	6
Р60	4	2	2	0	1	0

Таблица 15. Частота следования СПД в миокардиальной ткани ППВ симпатэктомированных крыс разных возрастов (Р7-Р60) в различных условиях. САУ – частота следования ПД, зарегистрированных до изоляции миокарда ППВ от САУ; Базальные условия – частота следования СПД в изолированной миокардиальной ткани ППВ в отсутствие электрической стимуляции; Норадреналин, Изопротеренол, Фенилэфрин – частота следования СПД в миокардиальной ткани ППВ действия соответствующих агонистов адренорецепторов в отсутствие электрической стимуляции. В группе Р21 при аппликации ИЗО не наблюдали СПД.

	Р7			Р14			Р21			Р60		
	Ср.	Ст.откл.	п	Ср.	Ст.откл.	п	Ср.	Ст.откл.	п	Ср.	Ст.откл.	п
САУ	4.6	1.5	7	4.8	0.5	8	4.9	1.2	8	5.3	0.4	6
Базальные условия	1.4	0.5	5	3.9	1.7	3	1.6	2.2	2	0.9	0.9	4
Фенилэфрин	1.6	0.4	6	1.8	1.7	7	1.5	0.9	6	2.7	2.6	4
Изопротеренол	0.9	0.6	4	2.0	0.6	3	–	–	–	0.9	0.8	5

IV.3 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 (*Рисунок 27*) – 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 (*Рисунок 27Ж*). 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. (*Рисунок 27А*) 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 (*Рисунок 27В*).

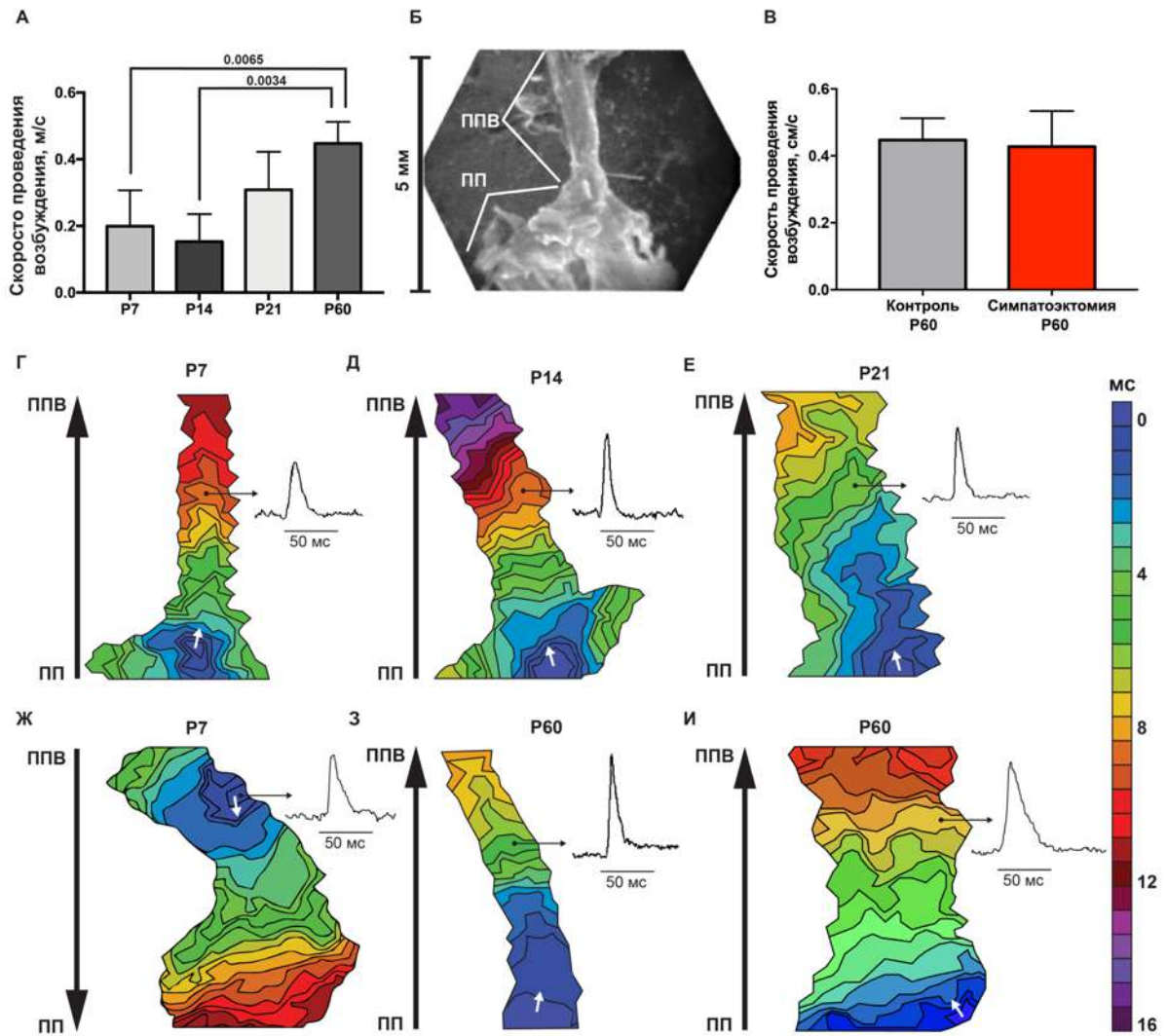


Рисунок 27. Проведение возбуждения в препаратах ПП-ППВ. А – скорость проведения возбуждения в атриовенозном соединении в контрольной группе животных разных возрастов (P7-P60) (Однофакторная ANOVA, апостериорный тест на множественные сравнения Тьюки). Б – фотография картируемой области препарата ПП-ПП. В – скорость проведения возбуждения в атриовенозном соединении в группе P60 контрольных и симпатэктомированных крыс значительно не различается (непарный t-тест). Г–И – репрезентативные примеры изохронных карт проведения возбуждения в ППВ контрольных и симпатэктомированных животных разных возрастов (P7-P60). Ж – пример изохронной карты в ППВ группы P7, где наблюдали ретроградное направление распространения волн возбуждения (от проксимального участка ППВ к предсердию). Синий цвет соответствует участку начала возбуждения, красные и фиолетовые цвета соответствуют более позднему возбуждению. Вертикальными черными стрелками показано направление проведения возбуждения, белыми стрелками показан участок инициации возбуждения. Примеры ПД, зарегистрированных при помощи оптического картирования, показаны справа от изохронных карт.

IV.3 Гистологические исследования миокардиальной ткани ППВ контрольных и симпатэктомированных крыс на разных стадиях постнатального онтогенеза

IV.3.1 Миокардиальная ткань в стенке правой передней полой вены крысы

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 (Рисунок 28).

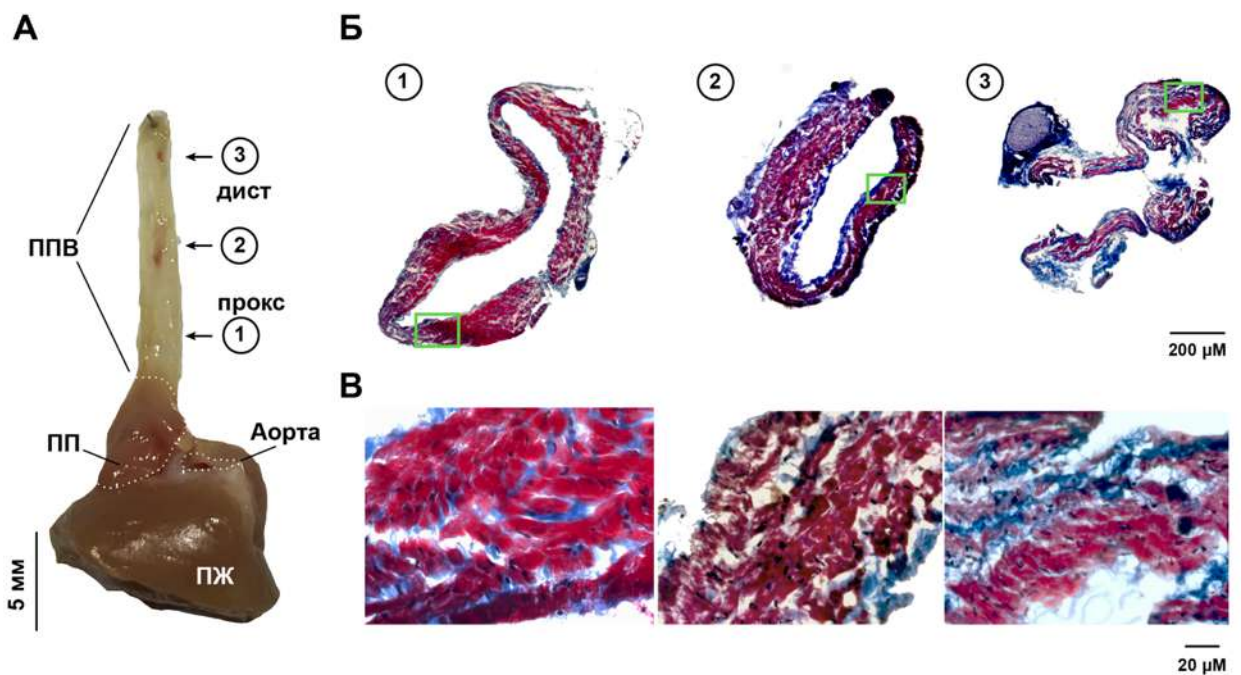


Рисунок 28 Общий вид и миокардиальная ткани правой полой вены (ППВ) крысы. А – изолированный препарат ППВ с прилегающими правым предсердием (ПП) и правым желудочком (ПЖ). Цифрами указаны участки ППВ, из которых были получены криосрезы, окрашенные трихромом Массона (Б-В). Б-В – окрашенные поперечные срезы, полученные из проксимального (1), медиального (2) и дистального (3) участков ППВ. Ярво-красный цвет отражает 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. В – слой кардиомиоцитов в ППВ. Черный цвет отражает на ядра кардиомиоцитов, синий цвет отражает соединительную ткань, которая более распространена в дистальной области ППВ.

При помощи красителя Di-4-ANEPPS нами было определено, что клетки, составляющие мышечный слой в стенке ППВ обладали типичной для кардиомиоцитов «прямоугольной» или «палочковидной» («rod-shaped») формой (*Рисунок 29*).

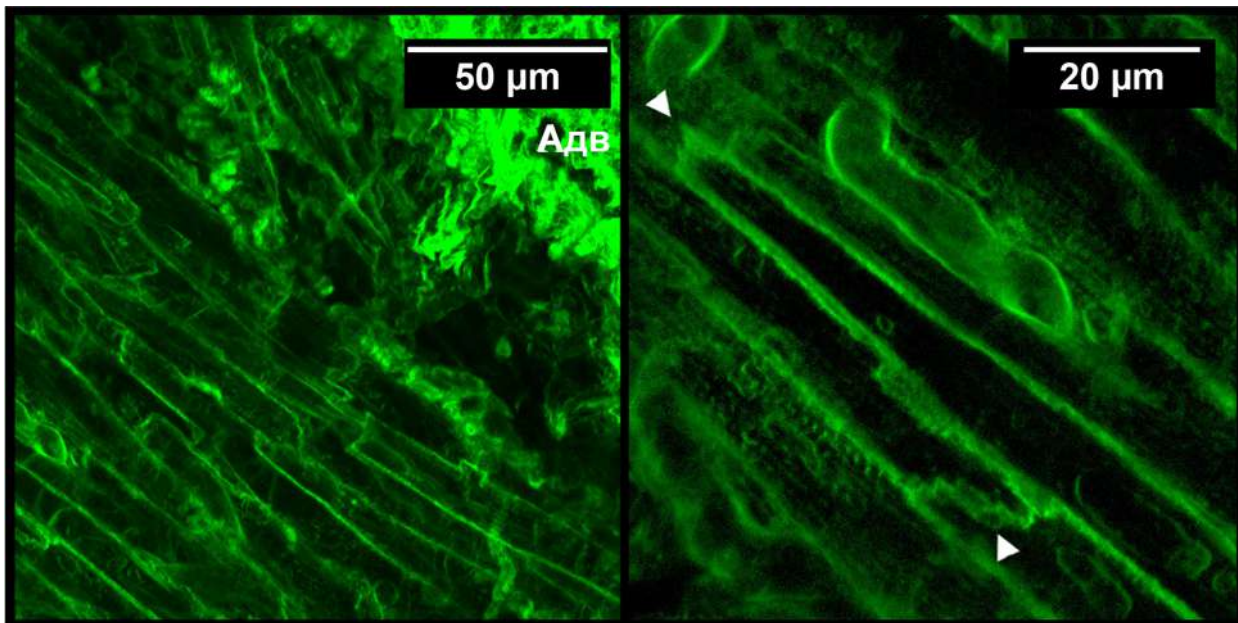


Рисунок 29. Конфокальные изображения препаратов ткани ППВ, окрашенных di-4-ANEPPS. А – Di-4-ANEPPS локализуется в мембранах клеток, отображая размеры и «палочковидную» форму, типичную для кардиомиоцитов рабочего миокарда предсердий. Б – изображение с высоким разрешением одного из препаратов ППВ. Белые стрелки указывают на торцевые участки клеток, соответствующие типичным для миокардиальной ткани интеркалирующим дискам.

Иммуногистохимическое окрашивание на коннексин 43 показало, что по всей толщине слоя мышечной ткани в стенке ППВ, детектируется специфическая флуоресценция Сх43. Флуоресценция Сх43 была выявлена в форме скоплений, соответствующих интеркалирующим дискам, что характерно для миокардиальной ткани (*Рисунок 30*). Сх43-специфичная флуоресценция подтверждает, что визуализированные мышечные волокна в стенке ППВ методом трихрома Массона соответствуют миокардиальной ткани, как в дистальных, так и в проксимальных участках вены.

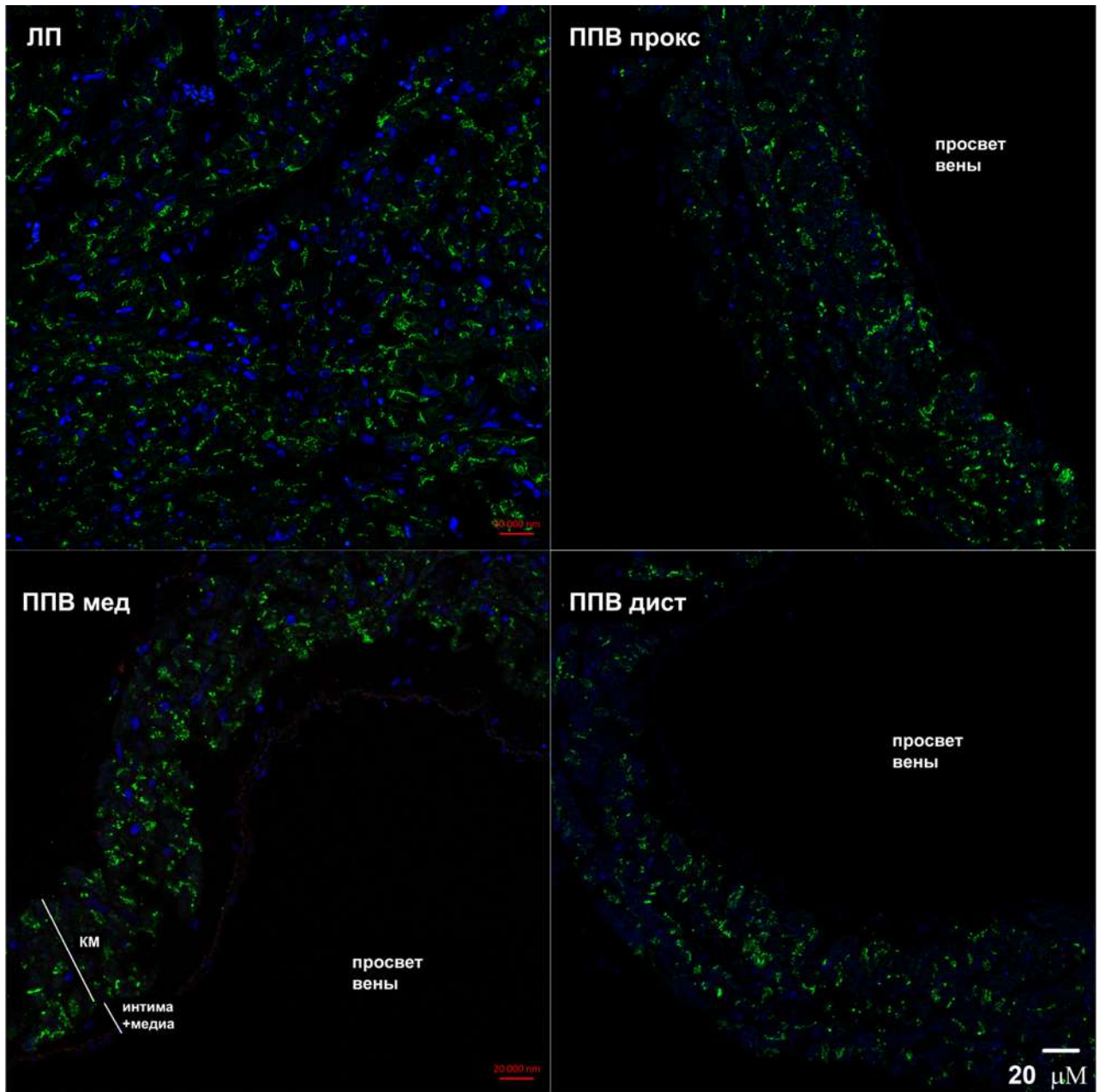


Рисунок 30. Sx43 в стенке ППВ и в левом предсердии (ЛП) контрольных крыс зрелого возраста (P60). Sx43-флуоресценция визуализируется в виде типичных полос, как в ЛП, так и в различных участках ППВ. Наблюдаемая флуоресценция Sx43 соответствует локализации интеркалирующих дисков между кардиомиоцитами. Зеленый цвет - Sx43, синий цвет – ядра клеток (DAPI). КМ – слой кардиомиоцитов, экспрессирующих Sx43, ППВ прокс, мед, дист – проксимальный, медиальный и дистальный участки 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, $n=20$) (*Рисунок 31*). 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 (Рисунок 31).

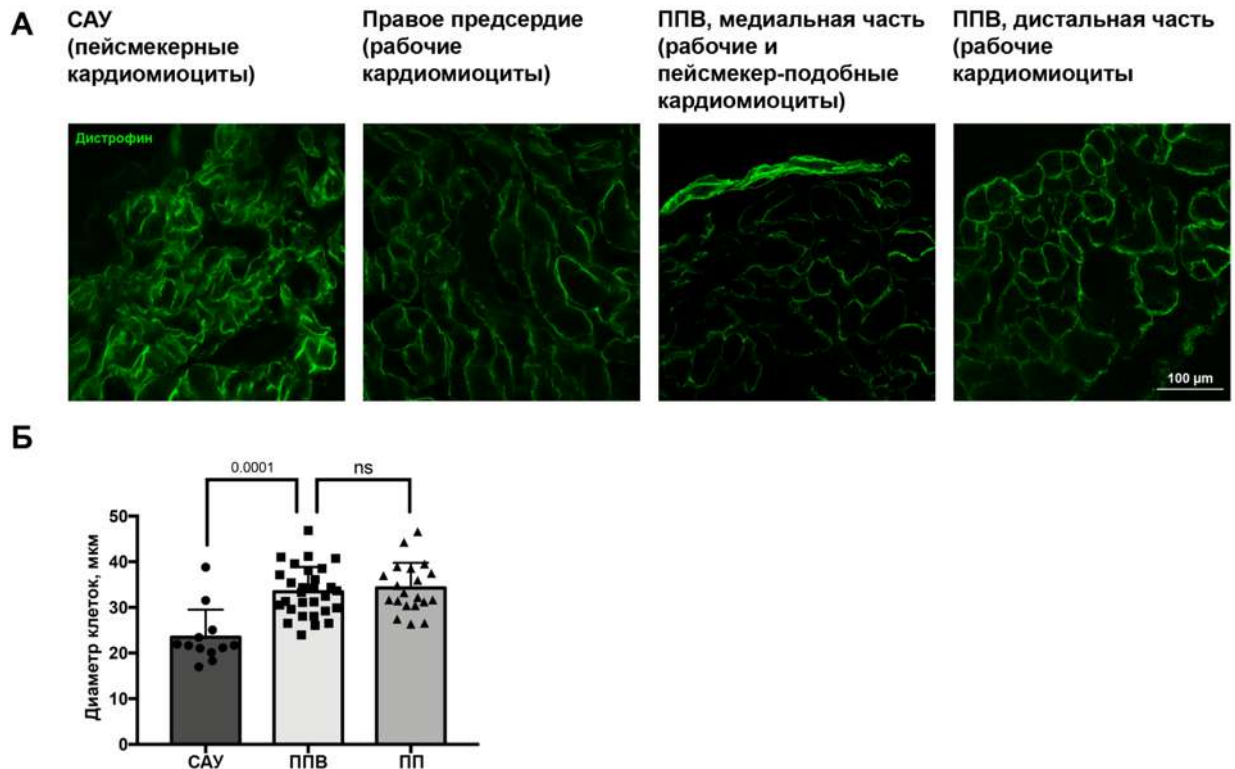


Рисунок 31. Дистрофин в стенке правой полой вены (ППВ), синоатриального узла (САУ) и правого предсердия (А) и диаметр клеток в этих областях миокарда (Б) у взрослых крыс (Р60). Точные значения p указаны на рисунке (однофакторная ANOVA, апостериорный тест на множественные сравнения Тьюки).

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.

IV.3.2 Визуализация нервных волокон в стенке ППВ

При помощи гистохимического окрашивания с использованием глиоксильной кислоты в препаратах ПП-ППВ, полученных от контрольных животных возраста 14 и 60 дней (Р14, Р60), нами были визуализированы разветвленные сети катехоламин-содержащих волокон, соответствующие расположению функционально активных симпатических

нервных волокон (*Рисунок 32Б*). Флуоресценцию наблюдали как в области ПП, так по всей площади поллой вены. В препаратах ППВ семидневных животных (P7) флуоресценция была близка к фоновой, что указывает на отсутствие функционально-активных симпатических волокон (*Рисунок 32А*). Площадь катехоламин⁺ флуоресценции, длина волокон и их сложность значительно увеличивались с возрастом, наиболее развитая сеть была обнаружена в препаратах ППВ взрослых животных (P60) (*Рисунок 32Б,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 (*Рисунок 32В*). Таким образом, отсутствие катехоламин⁺ флуоресценции в препаратах ПП подтверждает отсутствие функционально-активных симпатических нервных волокон у крыс, подвергнутых химической симпатэктомии.

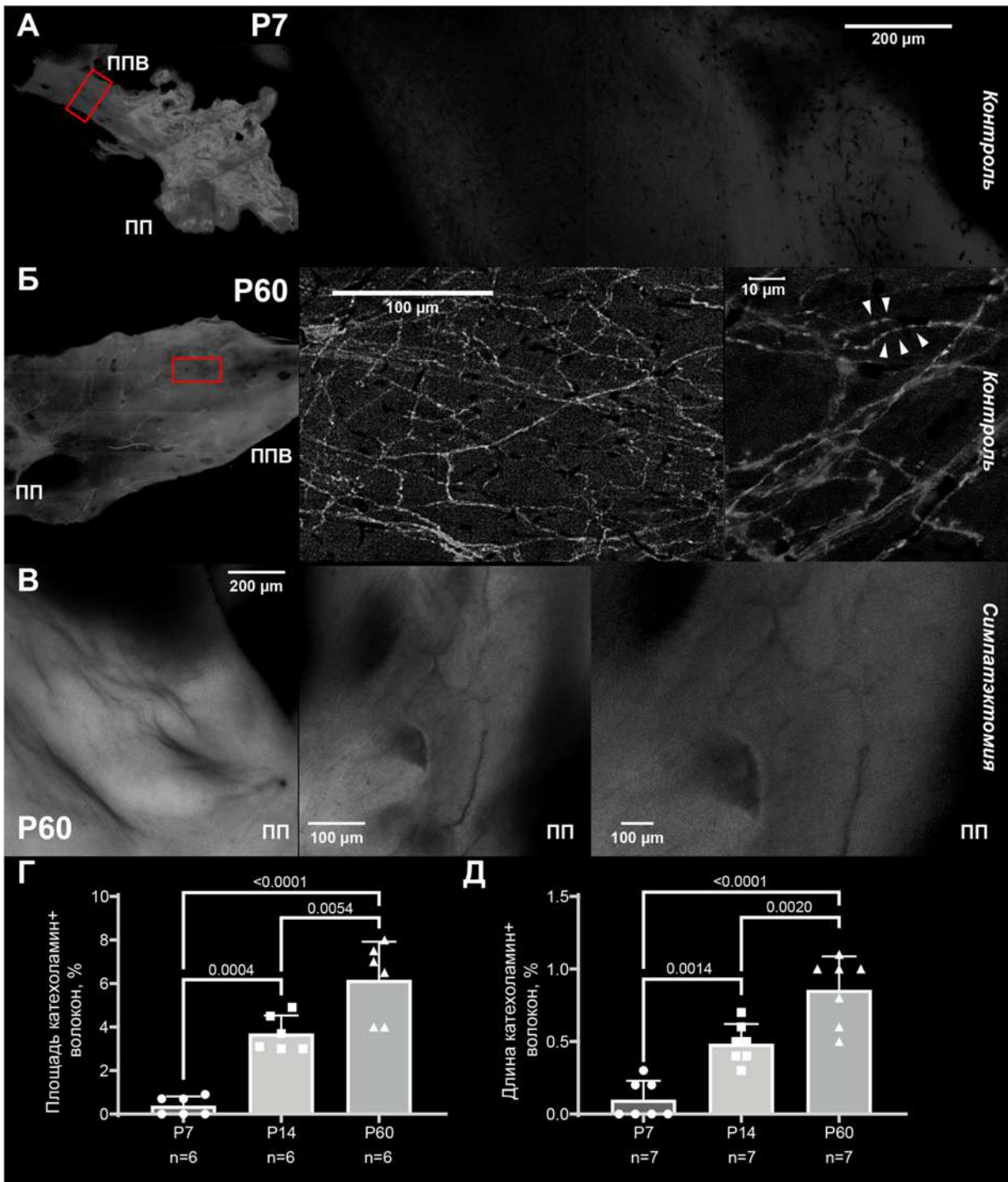


Рисунок 32. Развитие катехоламин-содержащих волокон в стенке ППВ крыс в ходе постнатального онтогенеза. А-Б – репрезентативные примеры конфокальных изображений, отображающих катехоламин-содержащие волокна в препаратах ППВ семидневных крыс (P7) и крыс зрелого возраста (P60). На панелях слева (А-Б) показаны изображения общего вида препаратов ПП-ППВ, на панелях справа (Б) показаны катехоламин-содержащие волокна при различном увеличении. В препаратах группы P7 не было обнаружено катехоламин-содержащих волокон (А, правая панель). Красными прямоугольниками на панелях слева обозначены участки препаратов, которые показаны при большем увеличении на панелях справа. Белые стрелки (Б, правая панель) указывают на пятна с высокой интенсивностью флуоресценции, вероятно, соответствующие варикозам симпатических нервов. В – препараты правого предсердия (ПП) симпатэктомизированных крыс зрелого возраста (P60) при различном увеличении. В препаратах отсутствует флуоресценция, соответствующая катехоламин-содержащим волокнам, в частности, в области сосудов в

стенке правого предсердия (В, справа). 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. Точные значения p указаны на рисунке (однофакторная ANOVA, апостериорный тест на множественные сравнения Тьюки).

IV.3.3 Высокопроводящие коннексины Сх43 в миокардиальной ткани ППВ контрольных крыс

Специфическая Сх43-флуоресценция была определена в поперечных срезах, полученных из препаратов ППВ семидневных (P7) и взрослых (P60) крыс (*Рисунок 33*). На срезах дистальной области ППВ уровень Сх43-флуоресценции был значительно выше в группе P60 по сравнению с группой P7: 0.011 ± 0.002 ($n=5$) против 0.023 ± 0.005 % ($n=6$) (площадь Сх43-флуоресцентных частиц/в группах P7 и P60, соответственно, $p = 0.0007$, *Рисунок 33*). И в группе P7 и P60 Сх43-специфичная флуоресценция была выявлена в областях интеркалирующих дисков в форме типичных полос между поперечными мембранами клеток. Также, в группе P7 мы наблюдали Сх43-специфичную флуоресценцию в латеральных мембранах кардиомиоцитов, в то время как в группе взрослых животных (P60) Сх43 преимущественно располагался в поперечных областях мембран.

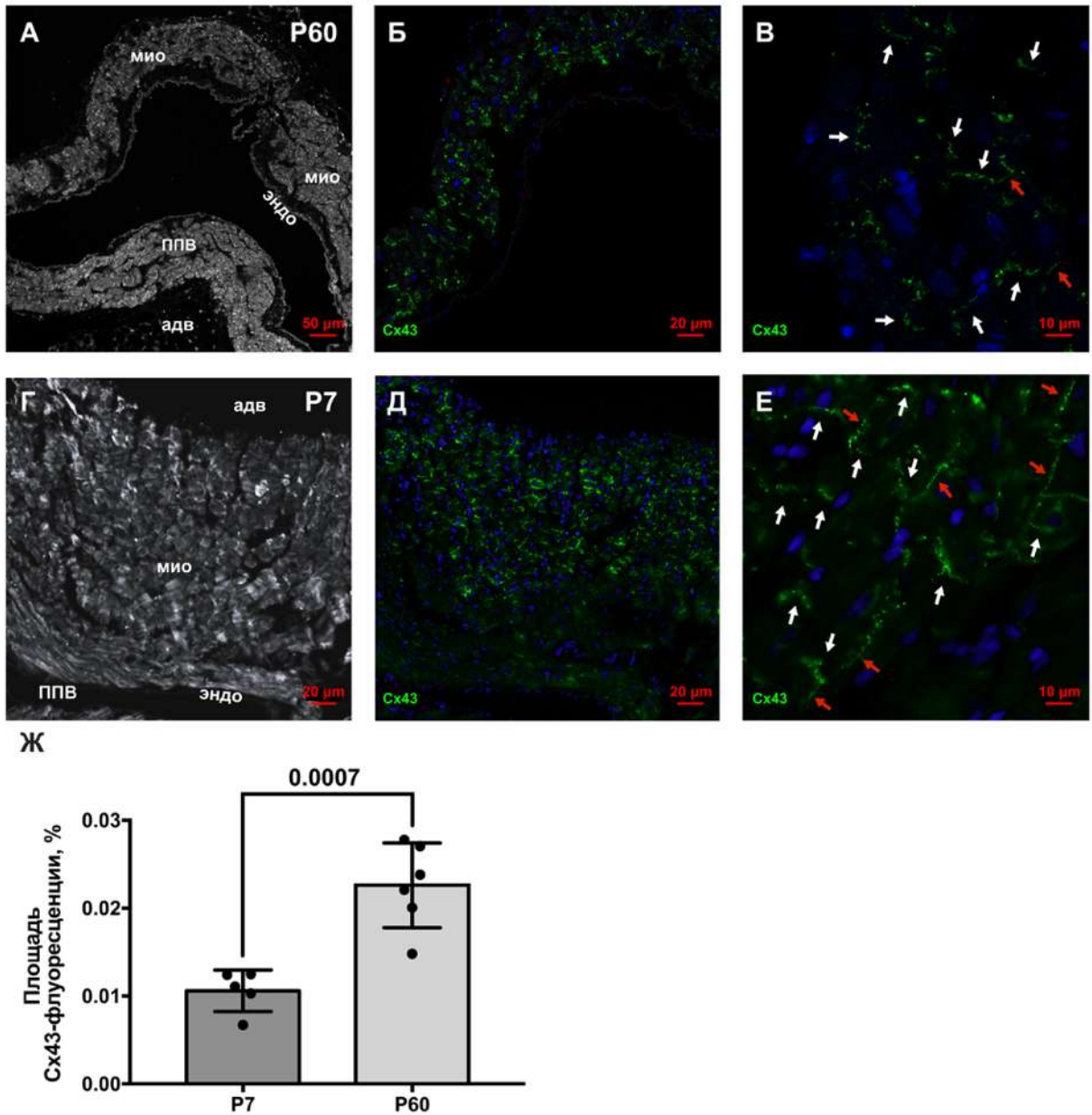


Рисунок 33. Sx43 в миокардиальной ткани ППВ взрослых (А-В) и семидневных (Г-Е) крыс. А, Г – общий вид поперечных срезов дистальной области ППВ. ППВ – передняя полая вена, мио – миокард, эндо – эндотелий, адв – адвентиция. Б, В, Д, Е – флуоресценция (синий – Hoechst – ядра кардиомиоцитов, зеленый – Alexa 488 – Sx43) отображающая скопления Sx43 в типичные кластеры, располагающиеся в интеркалирующих дисках между клетками (белые стрелки), а также и на латеральной мембране клеток (красные стрелки). Ж – площадь специфичной Sx43-флуоресценции относительно общей площади миокардиального слоя ППВ в группах P7 и P60 (непарный t-тест).

IV.3.4 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) (*Рисунок 34, Рисунок 35*). 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 (*Рисунок 34В,Е*). 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 (*Рисунок 35Б*). 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 Р7, Р14 и Р60; и 2.395 ± 0.8880 у симпатэктомированных животных группы Р60. 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.

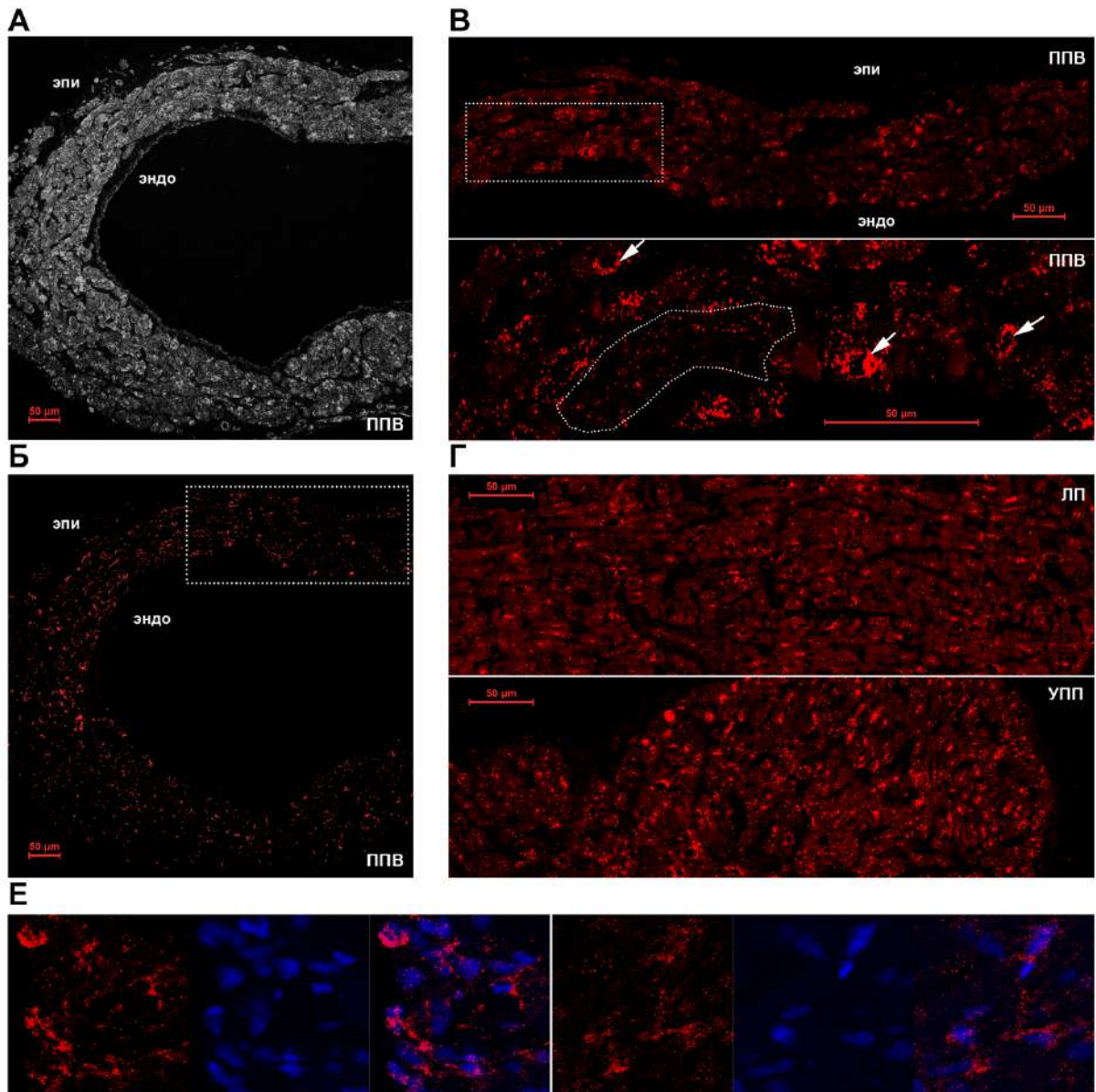
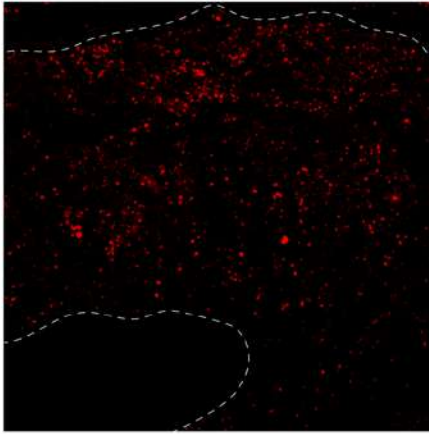


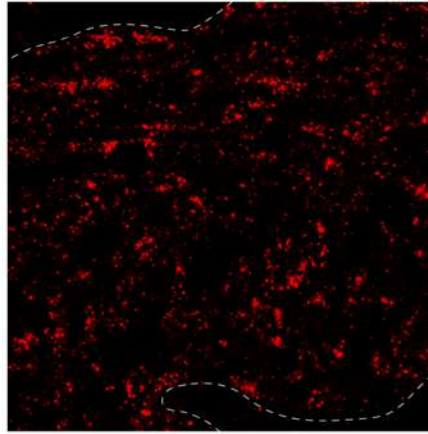
Рисунок 34. α_{1A} -адренорецепторы (α_{1A} -АР) в миокардиальной ткани ППВ, правого (ПП) и левого (ЛП) предсердий взрослых крыс. А-Б – фрагменты поперечных срезов ППВ. В – увеличенный участок поперечного среза ППВ, отмеченный пунктирным прямоугольником на секции рисунка Б. эпи – эпиваскулярная сторона, эндо – эндоваскулярная сторона. Стрелками указаны участки с перинуклеарной локализацией скоплений α_{1A} -АР. Пунктирная область в секции В рисунка указывает участок миокарда ППВ с преимущественной перинуклеарной (диффузной) локализацией α_{1A} -АР. Г – поперечные срезы ЛП и ПП, демонстрирующие распределение α_{1A} -АР в рабочем миокарде. Е – участки с перинуклеарной локализацией скоплений α_{1A} -АР, синий псевдоцвет – ядра кардиомиоцитов (DAPI), красный псевдоцвет – α_{1A} -АР.

А

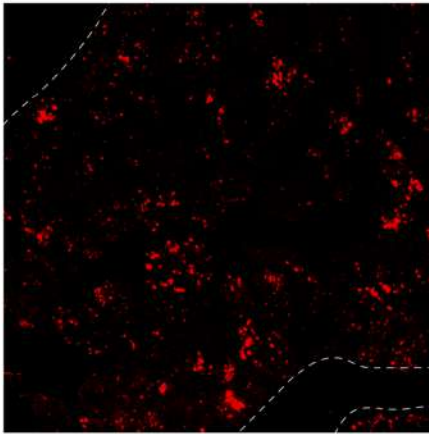
Контроль P7



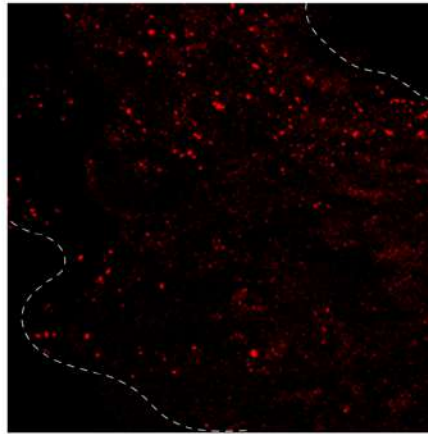
Контроль P14



Контроль P60



Симпатэктомия P60

20 μm

Б

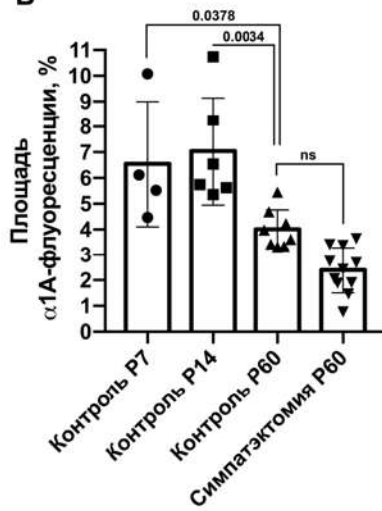


Рисунок 35. α_{1A} -адренорецепторы (α_{1A} -АР) в миокардиальной ткани ППВ на разных стадиях постнатального онтогенеза. А – репрезентативные примеры конфокальных изображений, отображающих α_{1A} -АР-флуоресценцию в миокарде ППВ контрольных и симпатэктомизированных крыс возраста 7, 14, 60 дней (P7, P14, P60). Пунктирными линиями обозначены границы миокардиального слоя стенки ППВ. Б – относительная площадь α_{1A} -АР-флуоресценции в ППВ контрольных и симпатэктомизированных крыс. Значения р указаны на графике (однофакторная ANOVA, апостериорный тест Тьюки).

IV.3.5 Cav3 и каналы HCN4 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) (*Рисунок 37 – Рисунок 46*). 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) (*Рисунок 36А*).

На сагиттальных срезах ППВ разных возрастных групп мы наблюдали перекрывание флуоресценции HCN4 и Cav3, что видно в виде желтых скоплений при наложении красного (Cav3) и зеленого (HCN4) каналов. Нами был проведен анализ колокализации при помощи программы Fiji (Image J) и плагина JACoP. С использованием метода Ли, корреляционного анализа интенсивности, рассчитывали параметр ICQ (Intensity Correlation Quotient), характеризующий долю колокализованных пикселей среди общего числа пикселей на анализируемой области изображения. ICQ составил 0.21 ± 0.11 , 0.27 ± 0.08 и 0.33 ± 0.10 в группах контрольных неонатальных и взрослых, и симпатэктомированных крыс, соответственно. Данные значения параметра ICQ означают частичную

колокализацию во всех препаратах, значение ICQ у взрослых симпатэктомированных крыс было значительно выше по сравнению с неонатальными ($p=0.009$), некоторые значения ICQ в этой группе животных были близки к максимальному значению параметра (0.5), что означает высокую колокализацию HCN4 и Cav3 (Рисунок 36Б).

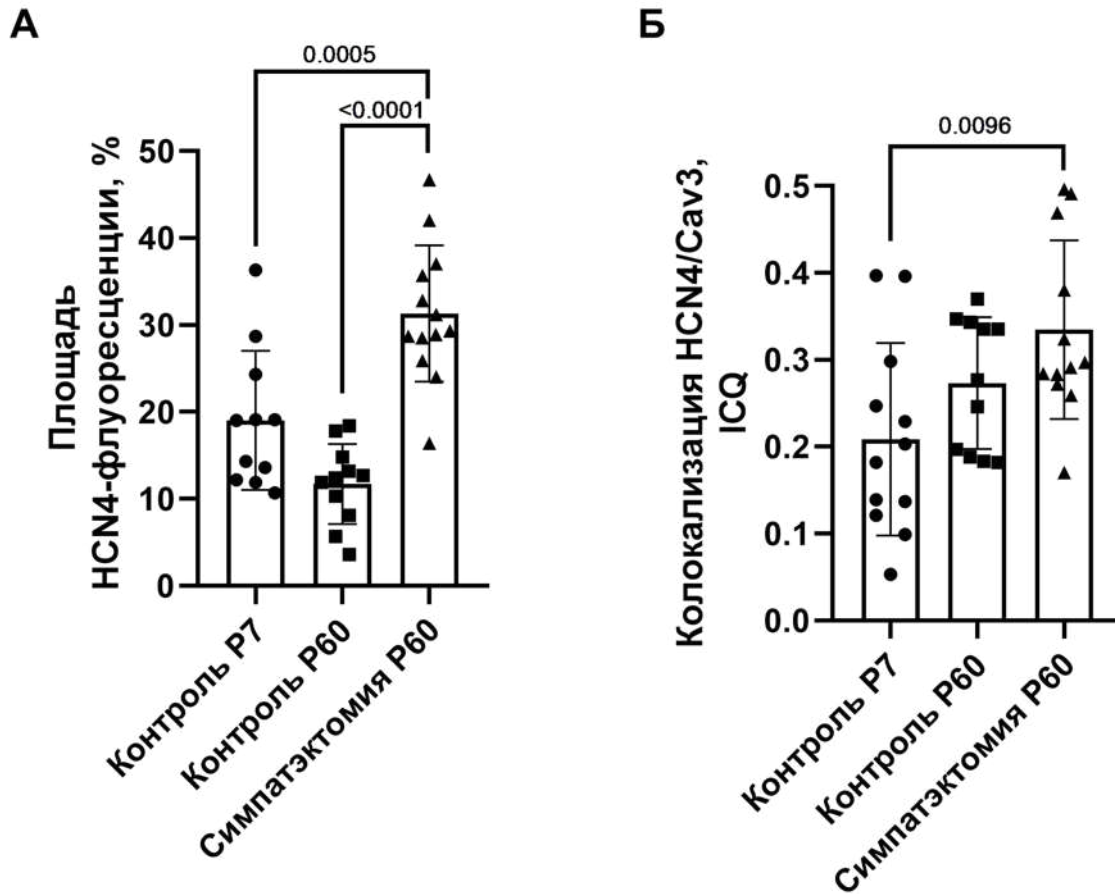


Рисунок 36. А – относительная площадь HCN4-флуоресценции в ППВ контрольных и симпатэктомированных крыс. Значения p указаны на графике (однофакторная ANOVA, апостериорный тест Тьюки). Б – уровень колокализации HCN4 и Cav3 – параметр ICQ (Intensity Correlation Quotient). Значения ICQ варьируют в диапазоне от 0.5 (колокализация) до -0.5 (взаимоисключение). В случае большого количества «шумов» или случайного совпадения интенсивностей значения ICQ близки к 0.

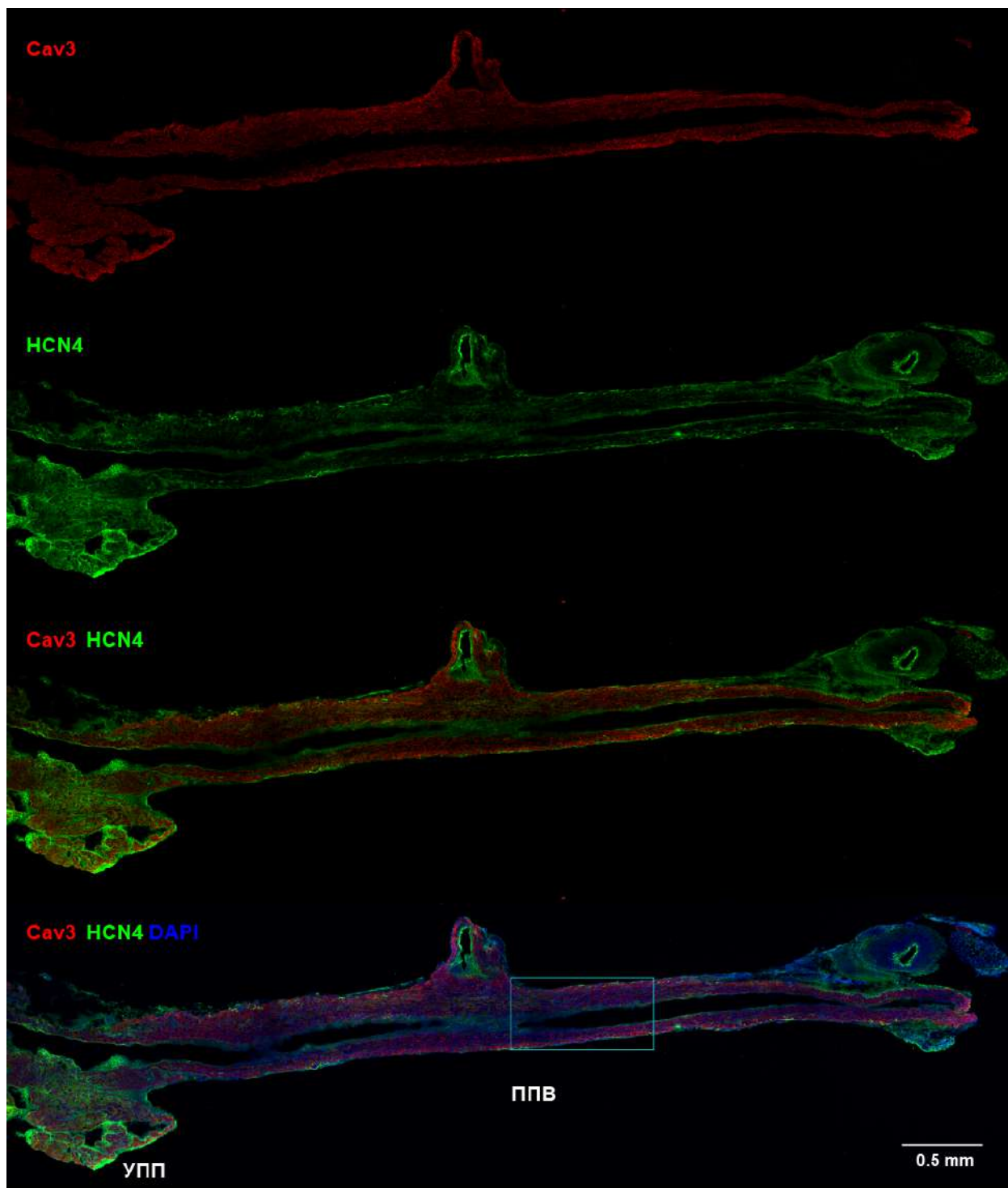


Рисунок 37. Сагиттальный срез препарата ППВ-ПП семидневной крысы (P7). Иммуногистохимическая окраска на Cav3 (красный псевдоцвет) и HCN4 (зеленый псевдоцвет). Синий псевдоцвет – DAPI – ядра клеток. УПП – ушко правого предсердия, ППВ – передняя полая вена. Прямоугольником отмечен сегмент, изображенный в большем увлечении на Рисунок 38.

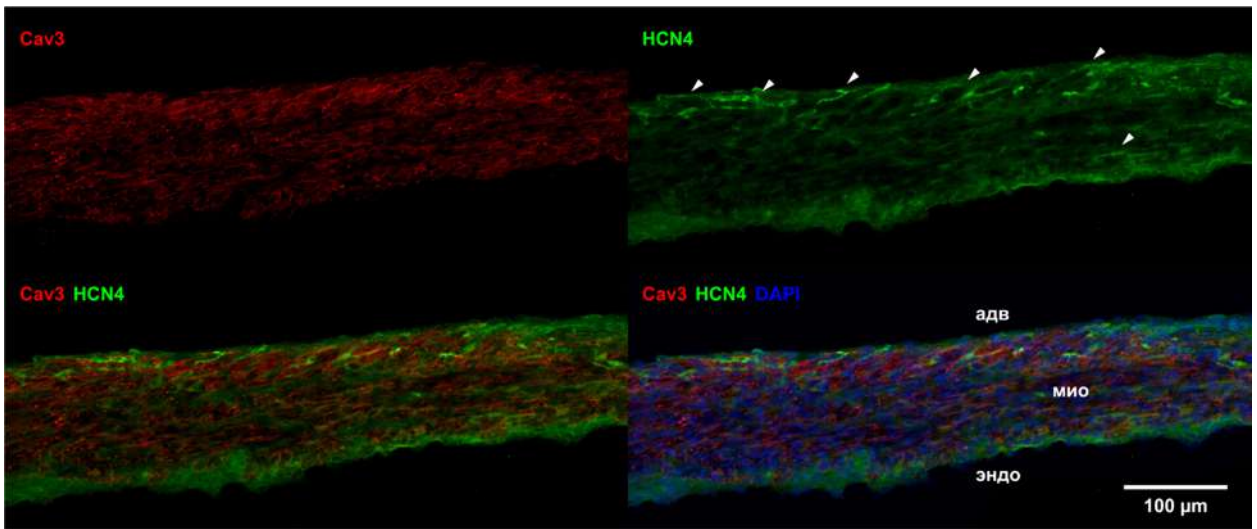


Рисунок 38. Увеличенный сегмент сагиттального среза препарата ППВ-ПП семидневной крысы (P7). Иммуногистохимическая окраска на Cav3 (красный псевдоцвет) и HCN4 (зеленый псевдоцвет). Синий псевдоцвет – DAPI – ядра клеток. Стрелками показаны скопления HCN4-специфичной флуоресценции.

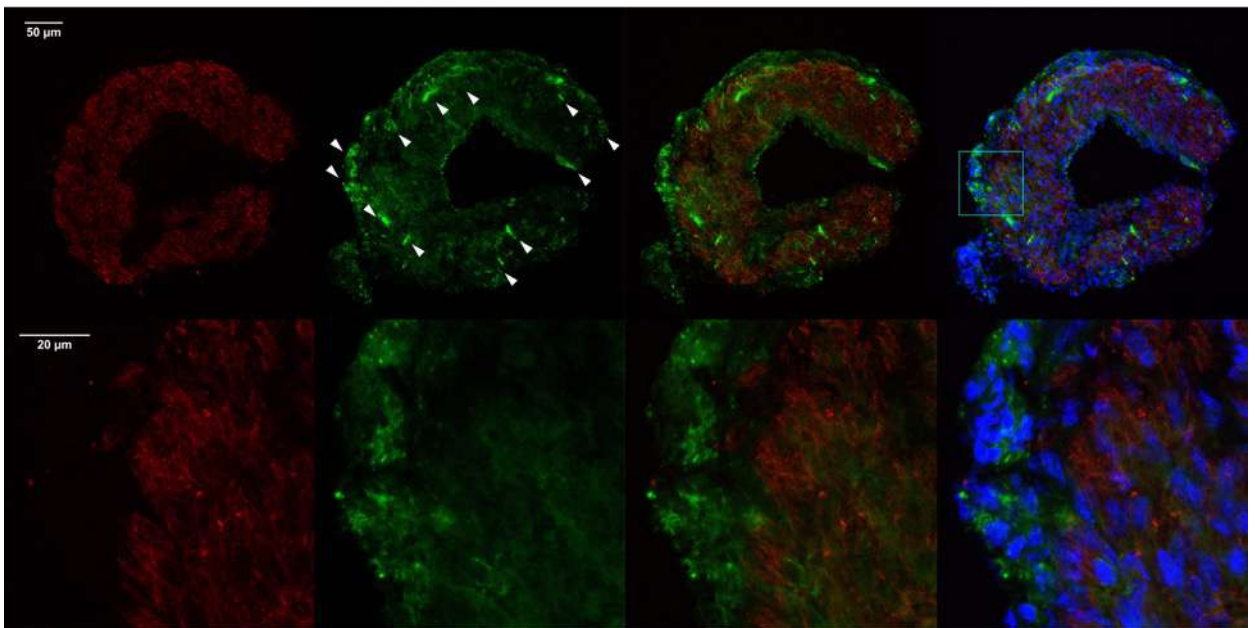


Рисунок 39. Поперечный срез препарата ППВ (дистальный участок) неонатальной крысы (P7). Иммуногистохимическая окраска на Cav3 (красный псевдоцвет) и HCN4 (зеленый псевдоцвет). Синий псевдоцвет – DAPI – ядра клеток. Стрелками показаны скопления HCN4-специфичной флуоресценции.

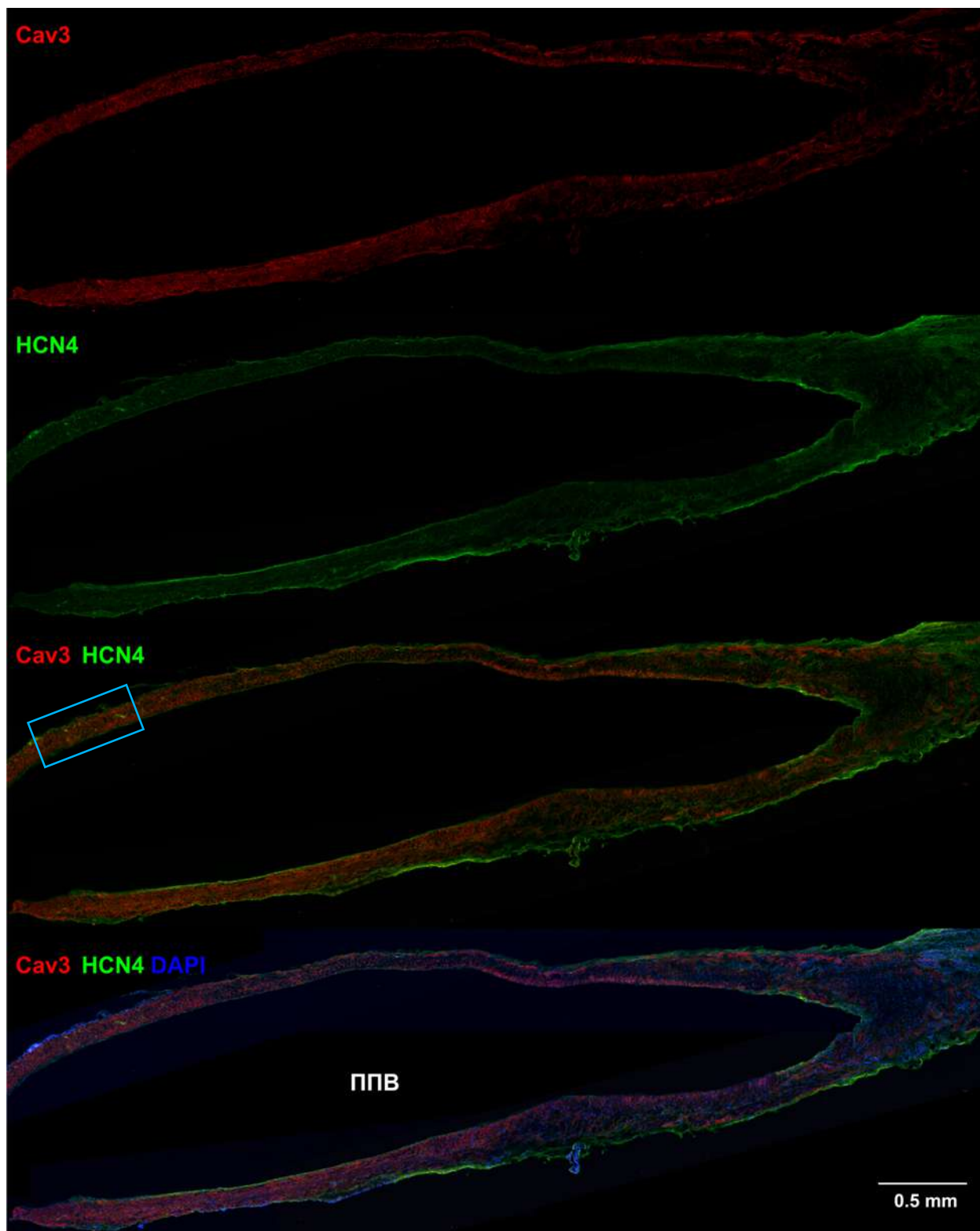


Рисунок 40. Сагиттальный срез препарата ППВ-ПП контрольной крысы (P60). Иммуногистохимическая окраска на Cav3 (красный псевдоцвет) и HCN4 (зеленый псевдоцвет). Синий псевдоцвет – DAPI – ядра клеток. ППВ – передняя полая вена. Прямоугольником отмечен сегмент, изображенный в большем увлечении на *Рисунок 41*.

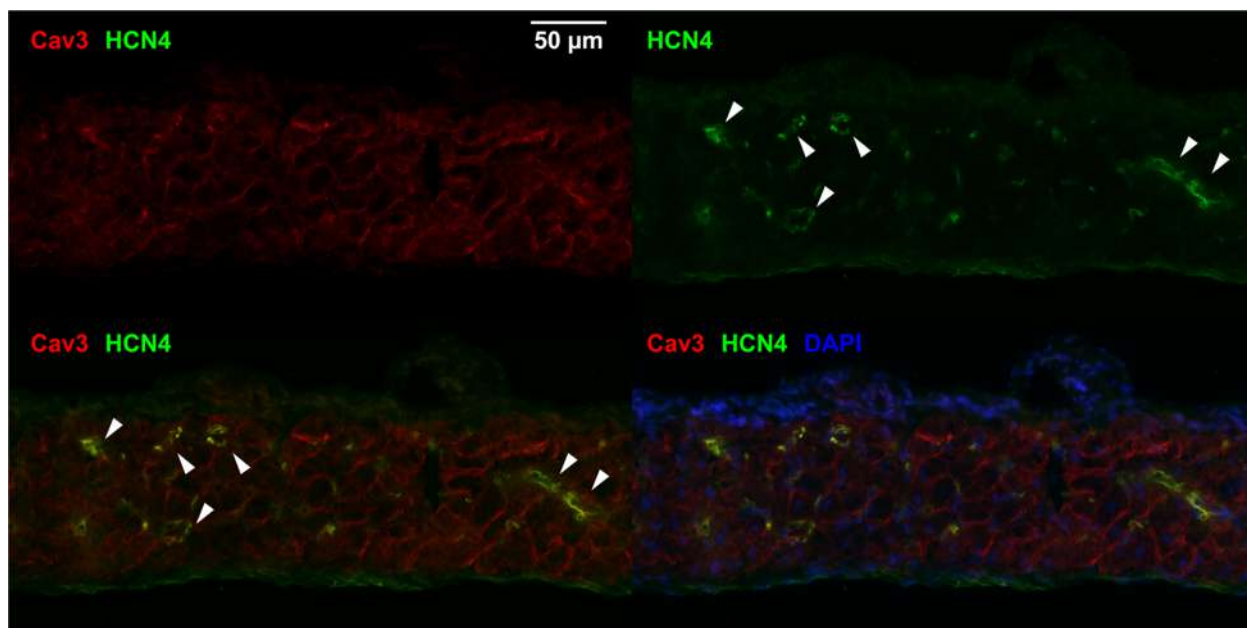


Рисунок 41. Увеличенный сегмент сагиттального среза препарата ППВ-ПП контрольной крысы (P60). Иммуногистохимическая окраска на Cav3 (красный псевдоцвет) и HCN4 (зеленый псевдоцвет). Синий псевдоцвет – DAPI – ядра клеток. Стрелками показаны скопления HCN4-специфичной флуоресценции. Желтый цвет указывает на перекрывание HCN4- и Cav3-флуоресценции.

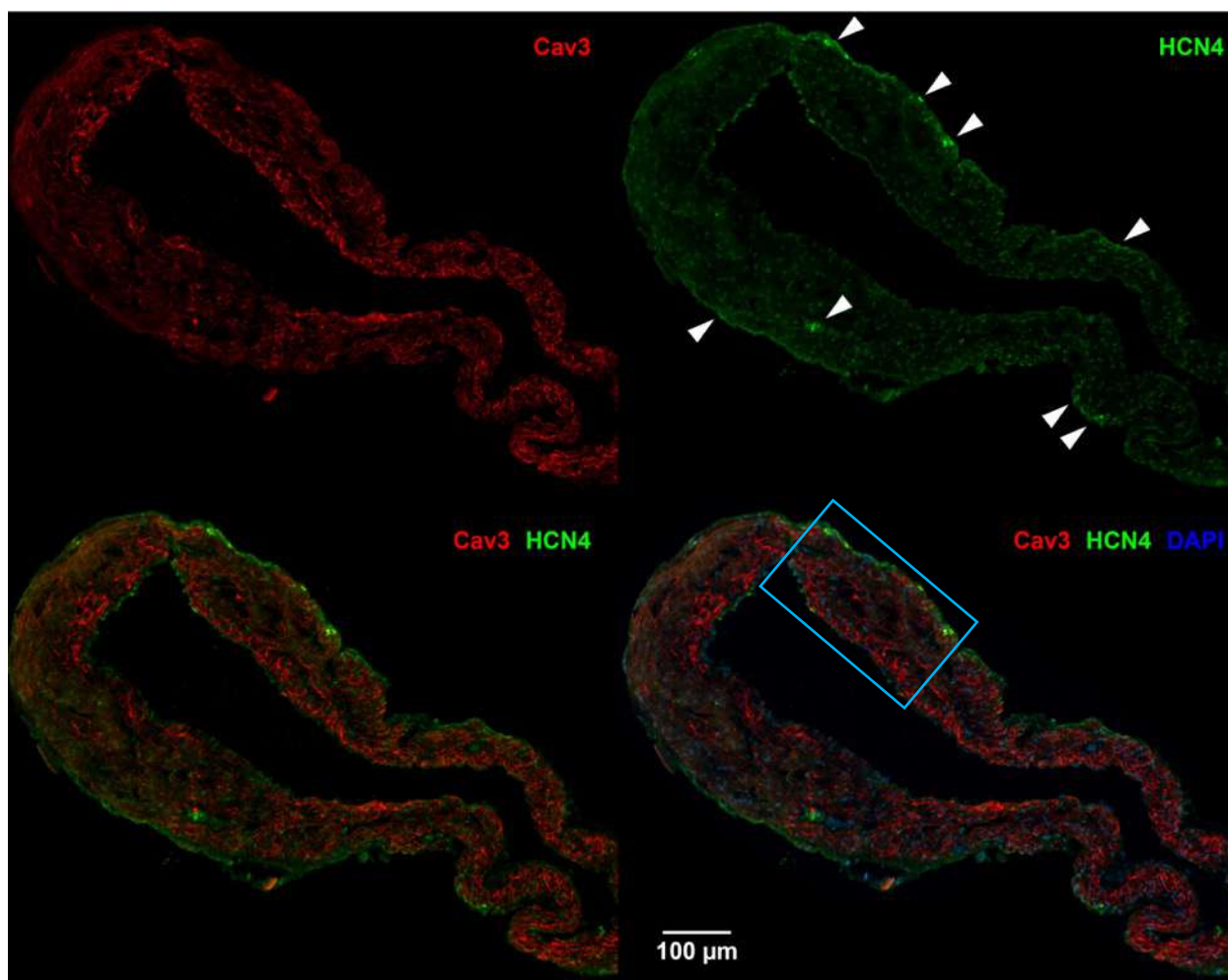


Рисунок 42. Поперечный срез препарата ППВ контрольной крысы (P60). Иммуногистохимическая окраска на Cav3 (красный псевдоцвет) и HCN4 (зеленый псевдоцвет). Синий псевдоцвет – DAPI – ядра клеток. Стрелками показаны скопления HCN4-специфичной флуоресценции. Прямоугольником отмечен сегмент, изображенный в большем увлечении на *Рисунок 43*.

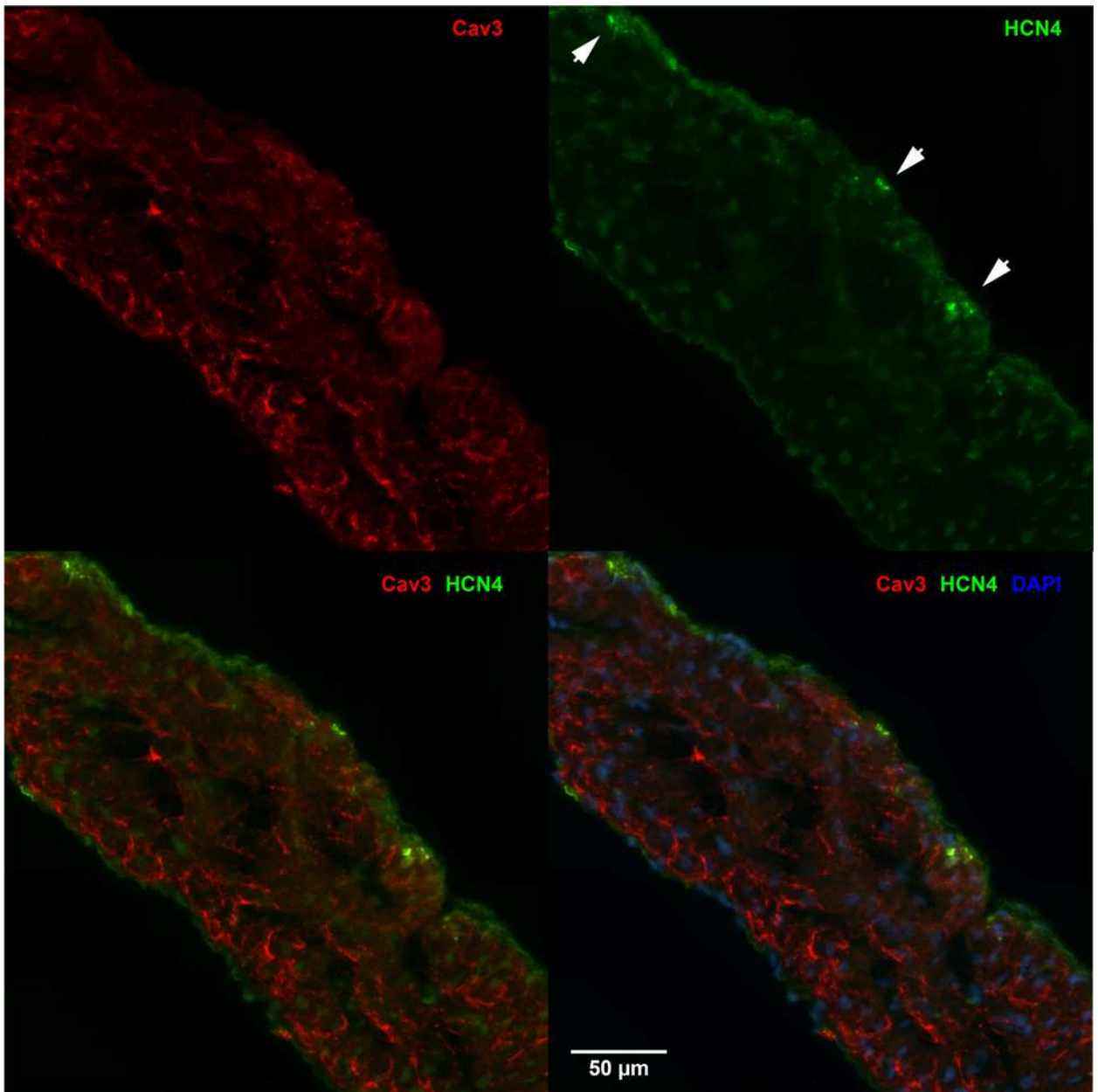


Рисунок 43. Увеличенный сегмент поперечного среза препарата ППВ контрольной крысы (P60). Иммуногистохимическая окраска на Cav3 (красный псевдоцвет) и HCN4 (зеленый псевдоцвет). Синий псевдоцвет – DAPI – ядра клеток. Стрелками показаны скопления HCN4-специфичной флуоресценции. Желтый цвет указывает на перекрывание HCN4- и Cav3-флуоресценции.

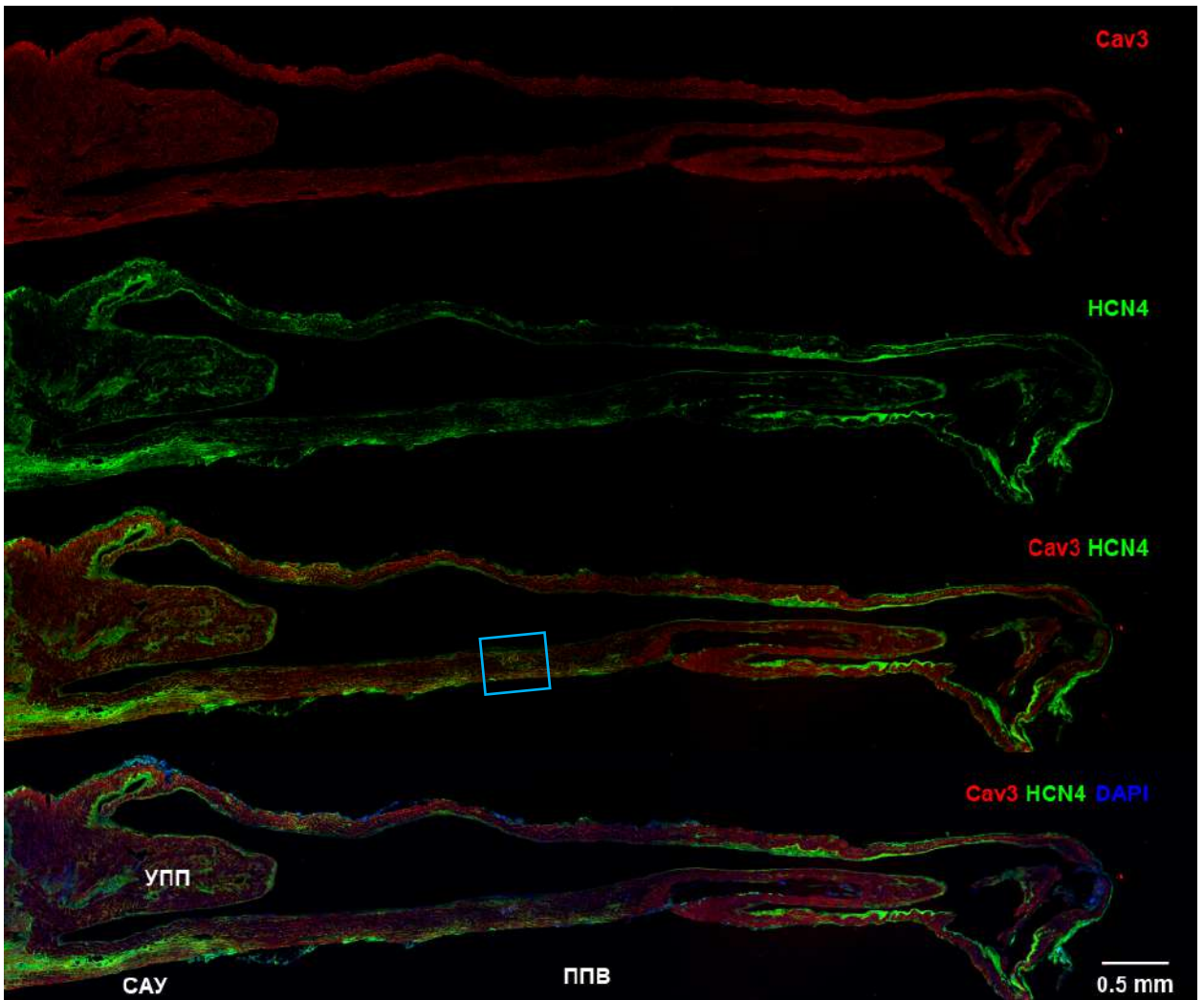


Рисунок 44. Сагиттальный срез препарата ППВ-ПП симпатэктомированной крысы (Р60). Иммуногистохимическая окраска на Cav3 (красный псевдоцвет) и HCN4 (зеленый псевдоцвет). Синий псевдоцвет – DAPI – ядра клеток. УПП – ушко правого предсердия, ППВ – передняя полая вена, САУ – синоатриальный узел. Прямоугольником отмечен сегмент, изображенный в большем увлечении на *Рисунок 45*.

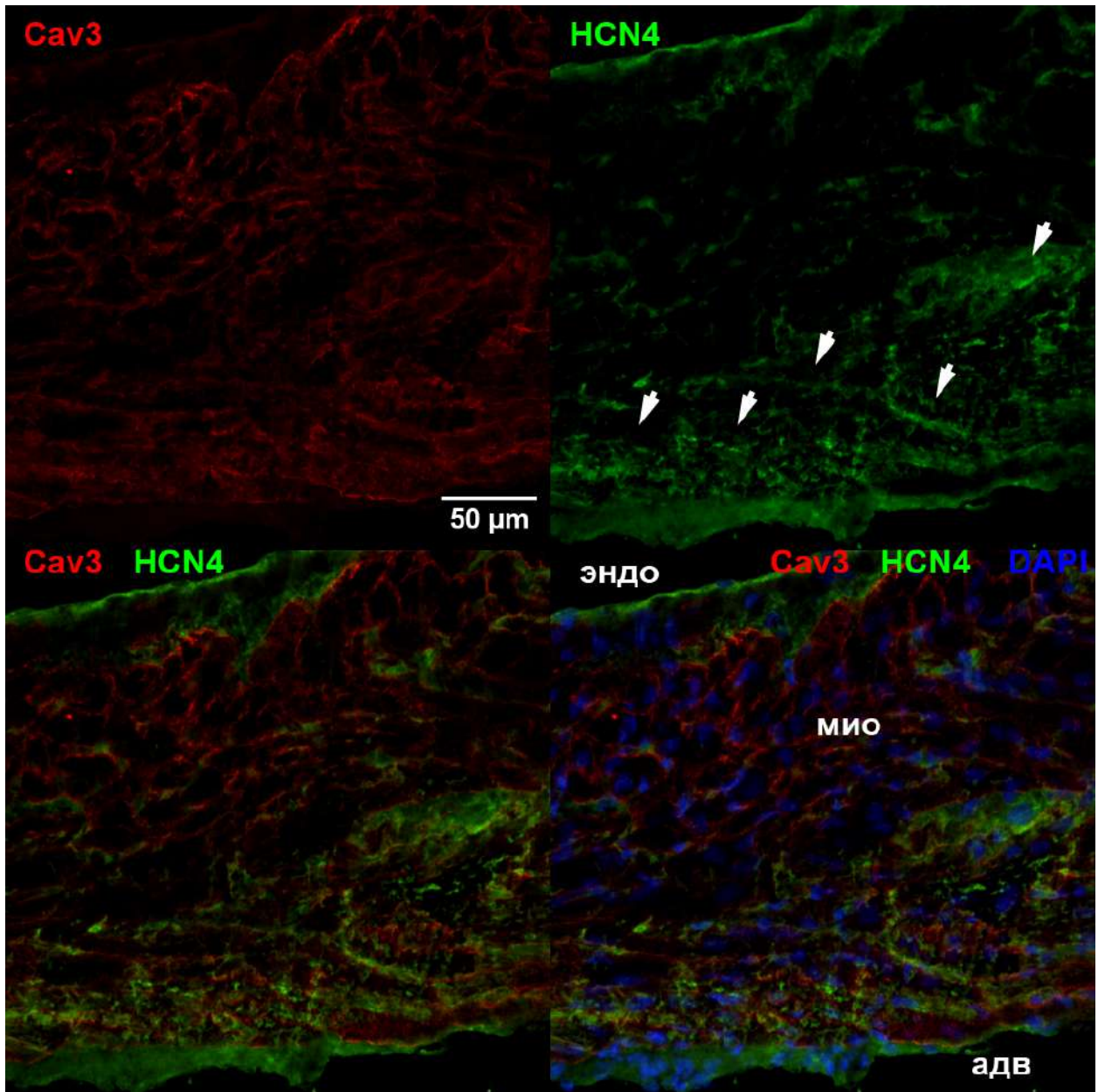


Рисунок 45. Увеличенный сегмент сагитального среза препарата ППВ-ПП симпатэктомированной крысы (Р60). Иммуногистохимическая окраска на Cav3 (красный псевдоцвет) и HCN4 (зеленый псевдоцвет). Синий псевдоцвет – DAPI – ядра клеток. Стрелками показаны скопления HCN4-специфичной флуоресценции.

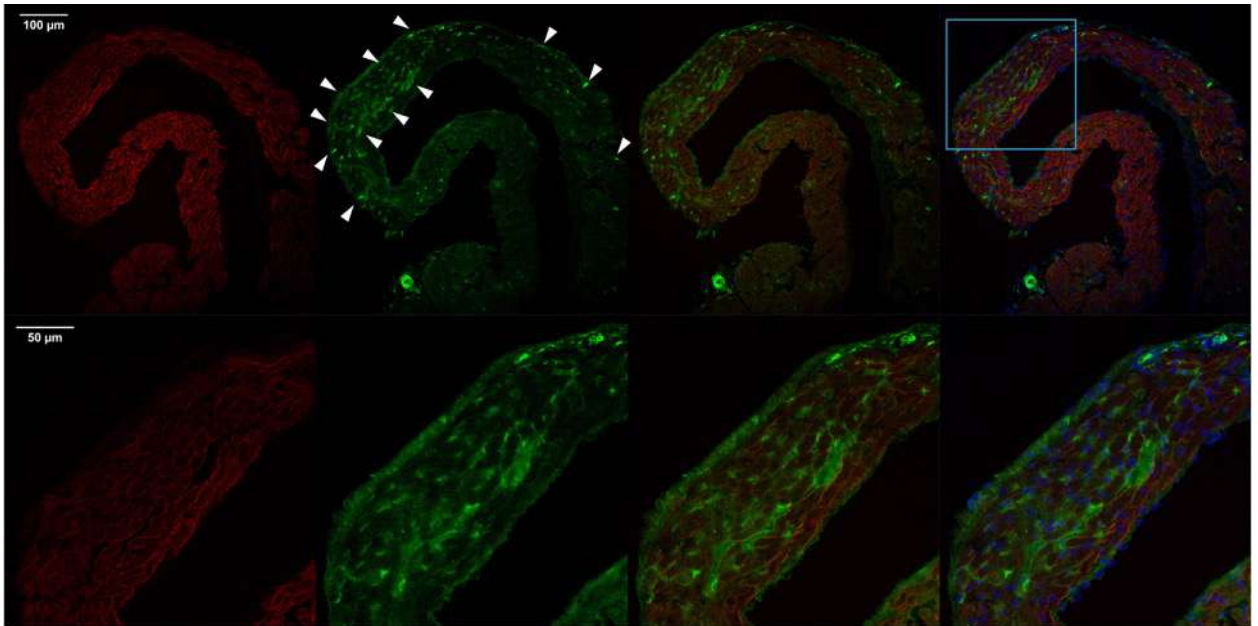


Рисунок 46. Поперечный срез препарата ППВ симпатэктомированной крысы (P60). Иммуногистохимическая окраска на Cav3 (красный псевдоцвет) и HCN4 (зеленый псевдоцвет). Синий псевдоцвет – DAPI – ядра клеток. Стрелками показаны скопления HCN4-специфичной флуоресценции.

IV.4 Определение уровня мРНК ключевых белков, определяющих пропейсмерные свойства 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 Р7), контрольных взрослых (Контроль Р60) и симпатэктомированных взрослых (Симпатэктомия Р60) животных.

IV.4.1 мРНК канала HCN4

Относительный уровень мРНК канала HCN4, переносящего пейсмерный 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 (Рисунок 47). 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.

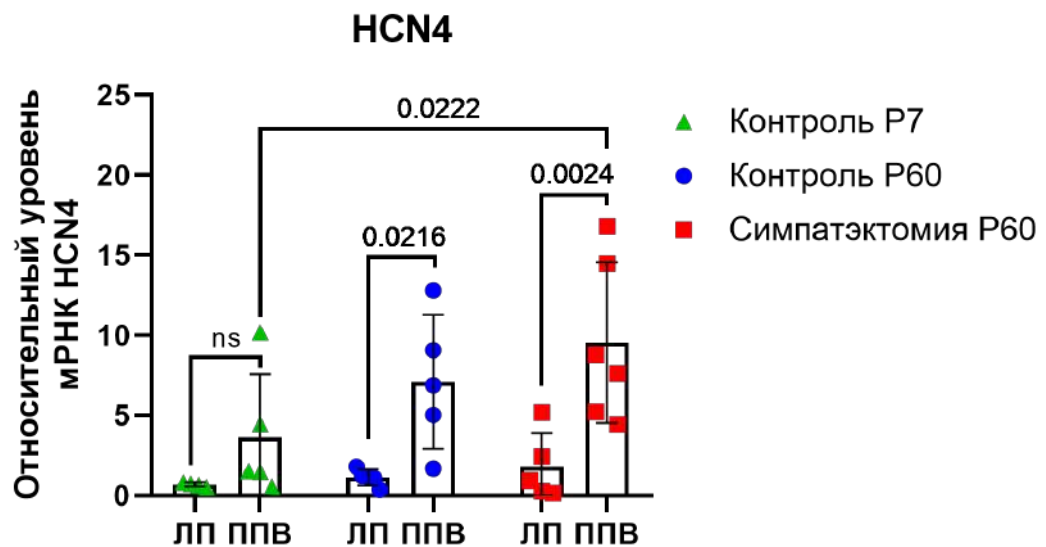


Рисунок 47. Относительный уровень мРНК канала HCN4 в миокардиальной ткани ППВ и ЛП контрольных неонатальных (Контроль Р7), контрольных взрослых (Контроль Р60) и симпатэктомированных взрослых (Симпатэктомия Р60) животных. Двухфакторная ANOVA, апостериорный тест Шидака.

IV.4.2 мРНК канала Kir2.2

В предварительных исследованиях нами было обнаружено, что в миокарде ППВ и рабочего миокарда ЛП контрольных крыс экспрессируются три изоформы Kir2 канала - Kir2.1/2/3, из которых уровень Kir2.2 был больше относительно других изоформ канала. Поэтому в экспериментах с использованием препаратов ППВ симпатэктомизированных крыс было принято решение исследовать уровень мРНК Kir2.2.

Относительный уровень мРНК канала Kir2.2 (*Kcnj12*), переносящего ток I_{K1} , значительно возрастал в рабочем миокарде предсердий как в контрольной группе, так и у симпатэктомизированных животных (Рисунок 48). Наоборот, в миокарде ППВ уровень мРНК Kir2.2 оставался низким и был значительно меньше такового в предсердном миокарде.

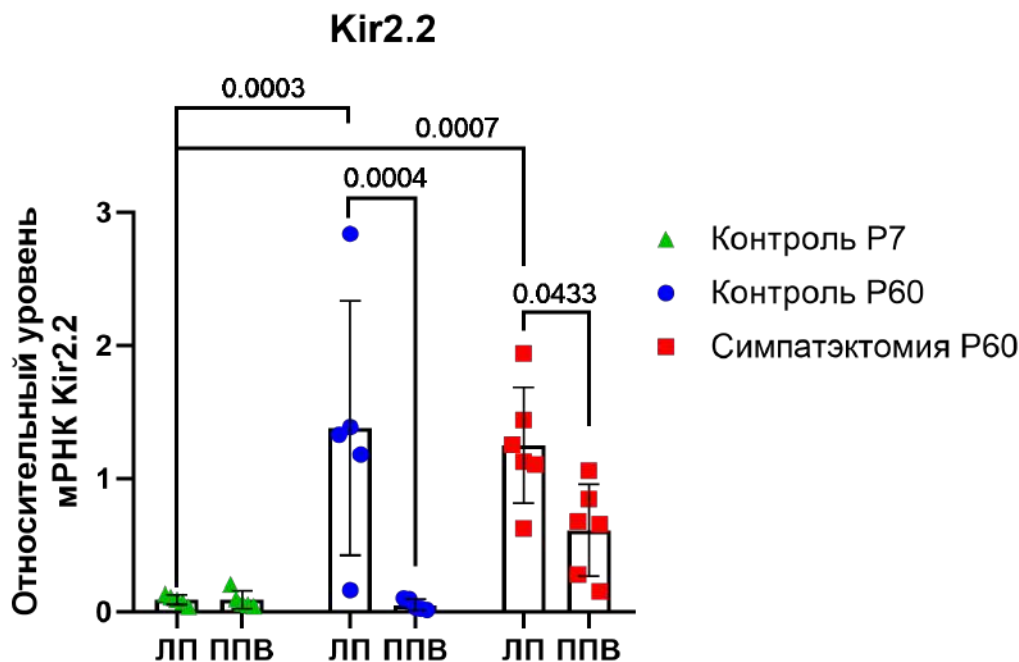


Рисунок 48. Относительный уровень мРНК канала Kir2.2 в миокардиальной ткани ППВ и ЛП контрольных неонатальных (Контроль P7), контрольных взрослых (Контроль P60) и симпатэктомизированных взрослых (Симпатэктомия P60) животных. Двухфакторная ANOVA, апостериорный тест Шидака.

IV.4.3 мРНК α_{1A} -адренорецепторов

Относительный уровень мРНК α_{1A} -АР возрастал в миокарде ППВ к зрелому возрасту как в контрольной, так и в группе симпатэктомизированных животных (Рисунок 49). Кроме того, уровень мРНК у взрослых симпатэктомизированных животных был выше и в рабочем миокарде ЛП по сравнению с ЛП неонатальных крыс, в отличие от контрольной группы. Различия в экспрессии α_{1A} -АР в миокарде ППВ у взрослых контрольных и симпатэктомизированных животных не обнаружили на уровне мРНК.

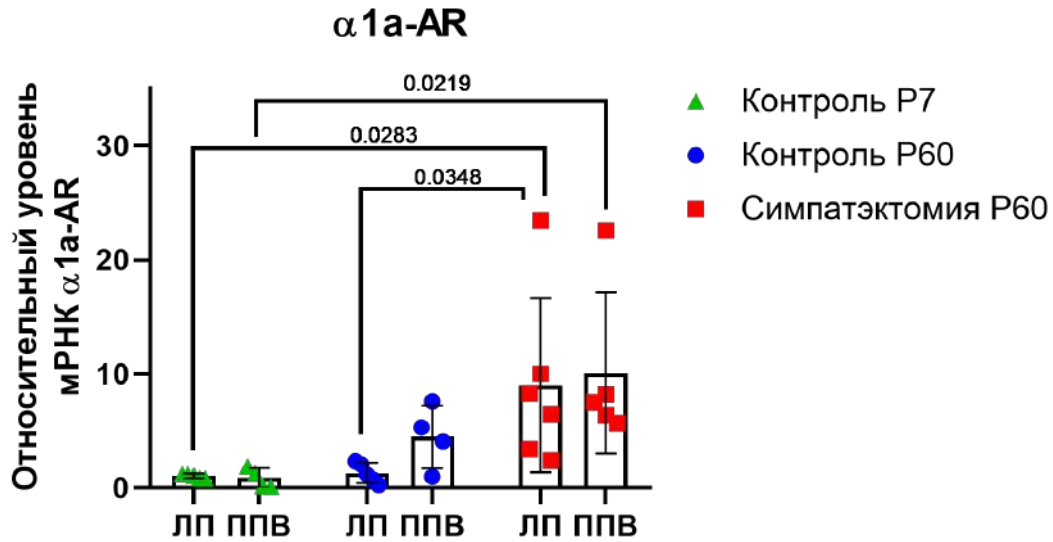


Рисунок 49. Относительный уровень мРНК $\alpha 1a$ -АР в миокардиальной ткани ППВ и ЛП контрольных неонатальных (Контроль P7), контрольных взрослых (Контроль P60) и симпатэктомированных взрослых (Симпатэктомия P60) животных. Двухфакторная ANOVA, апостериорный тест Шидака.

IV.4.3 мРНК транскрипционного фактора Nkx2-5

Относительный уровень мРНК транскрипционного фактора Nkx2-5, индуцирующий транскрипцию генов рабочего фенотипа в кардиомиоцитах, значительно возрастал в препаратах ЛП (Контроль P60, Симпатэктомия P60) по сравнению с уровнем у неонатальных животных (Контроль P7) (Рисунок 50). 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 P60).

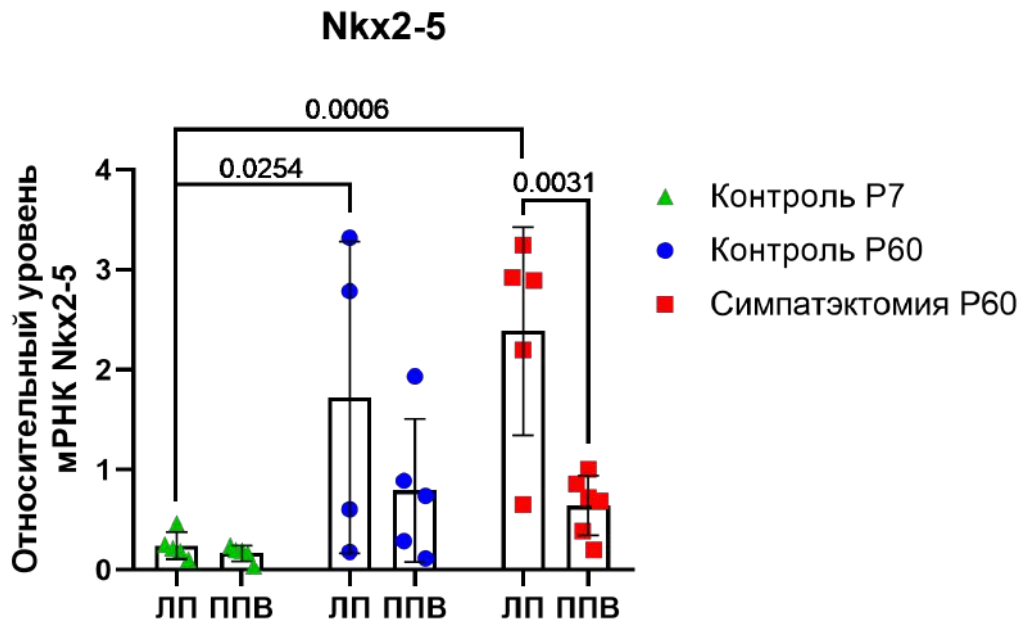


Рисунок 50. Относительный уровень мРНК транскрипционного фактора Nkx2-5 в миокардиальной ткани ППВ и ЛП контрольных неонатальных (Контроль P7), контрольных взрослых (Контроль P60) и симпатэктомированных взрослых (Симпатэктомия P60) животных. Двухфакторная ANOVA, апостериорный тест Шидака.

V ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе впервые были исследованы и прослежены изменения электрофизиологии миокарда полых вен в процессе постнатального онтогенеза. В работе показано, что как у неонатальных, так и у взрослых животных при электрической стимуляции миокардиальная ткань ППВ способна генерировать ПД с отсутствием фазы МДД и поддерживать стабильный уровень МПП, что характерно для рабочего предсердного миокарда. Однако, в отсутствие электрической стимуляции на разных стадиях постнатального онтогенеза миокард ППВ обладает различной способностью к поддержанию уровня МПП, генерации спонтанной биоэлектрической активности в базальных условиях и при адренергической стимуляции. Кроме того, нами продемонстрировано, что формирование и развитие симпатической иннервации влияет на способность миокардиальной ткани ППВ проявлять спонтанную активность в зрелом состоянии. Причины, которые могут способствовать наблюдаемым электрофизиологическим изменениям в миокарде ППВ в ходе постнатального развития, будут обсуждены ниже.

V.1 Преобразование электрически вызванных ПД в миокарде полых вен в ходе постнатального онтогенеза

В настоящей работе нами было показано, что в ходе постнатального развития длительность электрически вызванных ПД меняется в миокардиальной ткани ППВ. Изначально у неонатальных животных ДПД на уровне 50% реполяризации (фаза плато ПД) в полых венах значительно больше по сравнению с предсердными ПД. К 14-му дню постнатального развития ДПД₅₀ начинает уменьшаться, ПД в полых венах приобретают форму, характерную рабочему миокарду к достижению зрелого возраста. Однако, при химической симпатэктомии «сужение» ПД в миокарде ППВ происходит позже: у неонатальных симпатэктомированных крыс ПД значительно «длиннее» и на уровне ДПД₅₀ и ДПД₉₀, сохраняет такую форму и на 14-й день постнатального развития, а снижение длительности происходит только к 21-му дню развития.

Ранее в полых венах были зарегистрированы ПД, обладающие различающимися характеристиками: были зарегистрированы как «длинные», так и «короткие» ПД, с фазой МДД и без [Chen et al., 2002; Sicouri et al., 2012]. В данной работе мы впервые зарегистрировали ПД в миокарде ППВ на ранних и поздних стадиях постнатального онтогенеза у здоровых и симпатэктомированных крыс.

Хорошо известно, что длительность ПД в предсердном миокарде у грызунов снижается в течение первых недель постнатальной жизни [Zehendner et al., 2013].

Укорочение ПД является адаптивным процессом, который коррелирует с постнатальным увеличением сердечного ритма и обусловлен изменениями в экспрессии каналов, ответственных за реполярирующие токи I_{to} , I_{Kur} и I_{Kr} [Wang et al., 1996].

В наших экспериментах продемонстрировано, что длительность ПД в миокарде ППВ в ходе постнатального развития уменьшается, достигая длительности, характерной для рабочего предсердного миокарда. Возможно, поскольку миокард полых вен является производным эмбрионального венозного синуса и имеет общее происхождение с САУ, у неонатальных крыс в кардиомиоцитах ППВ может быть сохранена экспрессия некоторых каналов, характерных для пейсмекерных структур и обеспечивающих большую длительность ПД. У новорожденных крыс в кардиомиоцитах ППВ может быть сходный уровень экспрессии некоторых каналов ионных токов, формирующих фазу плато ПД. Например, известно, что в кардиомиоцитах САУ у крыс значительно повышена экспрессия каналов $Ca_v1.3$, проводящих ток I_{CaL} , а экспрессия каналов $K_v4.2$, проводящих ток I_{to} , значительно снижена по сравнению с рабочим миокардом предсердий [Dobrzynski et al., 2013]. Однако, в наших экспериментах у взрослых крыс конфигурация электрически вызванных ПД в полых венах становится неотличимой от ПД рабочего миокарда. Таким образом, в ходе постнатального развития миокардиальная ткань ППВ приобретает признаки рабочего миокарда, теряя некоторые характеристики, присущие предшественникам миокарда ППВ. Эти наблюдения поддерживают предположение об атриализации миокарда ППВ в ходе постнатального онтогенеза [Кузьмин, Каменский, 2021]. При этом, исходя из наших данных, развитие симпатической нервной системы (СНС) некоторым образом положительно влияет на этот процесс, а отсутствие развития симпатических нервных волокон замедляет процесс атриализации формы ПД в миокарде ППВ.

V.2 Изменение МПП и уровня мРНК канала Kir2.2 в миокарде ППВ в ходе постнатального онтогенеза

Ранее было показано, что у многих млекопитающих, включая крыс, МПП в миокардиальной ткани полых и легочных вен является нестабильным и деполяризованным по сравнению с рабочим предсердным миокардом [Ito et al., 1967; Ivanova et al., 2019; Tsuneoka et al., 2012]. В работах по исследованию миокарда ЛВ были предложены следующие механизмы, определяющие деполяризованный МПП: низкая плотность Kir2.X каналов тока аномального выпрямления I_{K1} [Chen et al., 2002, 2001; Tsuneoka et al., 2017], повышенная базальная Na^+ -проницаемость [Malécot et al., 2015] и увеличенная Cl^- проводимость [Okamoto et al., 2014]. Перечисленные механизмы, возможно, определяют

нестабильность МПП и в миокарде ППВ. В частности, существенную роль может играть сниженная плотность каналов Kir2.X, которые проводят ток аномального выпрямления I_{K1} – основной калиевый выходящий ток, обеспечивающий поддержание стабильного МПП на уровне ~ -80 мВ в рабочем миокарде предсердий и желудочков у всех млекопитающих животных [Hibino et al., 2010].

В наших экспериментах установлено, что уровень МПП в миокарде полых вен был менее электронегативный по сравнению с таковым в рабочем миокарде предсердий, как у неонатальных, так и у взрослых животных. Нами был определен уровень экспрессии мРНК каналов Kir2.2 в миокарде ППВ и левого предсердия неонатальных, контрольных взрослых и симпатэктомированных крыс. Известно, что у человека в предсердном миокарде экспрессируются 3 изоформы канала тока аномального выпрямления I_{K1} в отношении: Kir2.3 > Kir2.2 > Kir2.1 [Gaborit et al., 2007]. У крыс также обнаружена экспрессия Kir2.1/2/3 в предсердном и желудочковом миокарде. Однако, согласно некоторым исследованиям, у крыс Kir2.1 в большей степени экспрессируется в желудочковом миокарде, а в предсердном миокарде большую роль играет Kir2.2 [Karschin, Karschin, 1997]. Ранее, нами было показано, что в предсердном рабочем миокарде взрослых крыс наиболее экспрессируемой является изоформа Kir2.2 как на уровне мРНК, так и на уровне белка [Ivanova et al., 2020]. Согласно полученным результатам в данной работе, у неонатальных крыс уровень мРНК Kir2.2 является низким как в миокарде ППВ, так и в ЛП, а к достижению зрелого возраста уровень мРНК Kir2.2 значительно возрастает в рабочем предсердном миокарде, но не в миокарде ППВ. У симпатэктомированных крыс уровень экспрессии Kir2.2 в миокарде ППВ также был значительно ниже по сравнению с ЛП и не отличался от уровня экспрессии Kir2.2 у контрольных животных.

Полученные данные могут указывать на то, что в миокардиальных рукавах полых вен количество каналов Kir2.2, соответственно, и плотность тока I_{K1} , существенно снижена по сравнению с рабочим миокардом. Ранее, нами также было показано, что в миокарде ППВ плотность тока I_{K1} ниже по сравнению с рабочим миокардом [Ivanova et al., 2020].

Низкий уровень Kir2.2 в миокарде ППВ может быть следствием сниженной экспрессии транскрипционных факторов Nkx2-5, Tbx 5 и GATA4, которые поддерживают экспрессию генов «рабочего электрофизиологического фенотипа» (Cx40, Cx43, Nav1.5, Kir2.X). В данной работе нами был определен уровень ТФ Nkx2-5 в миокарде ППВ и рабочем предсердном миокарде. Уровень экспрессии Nkx2-5 был низким у неонатальных крыс как в полых венах, так и в предсердии, ко взрослому состоянию уровень Nkx2-5 значительно возрастал в рабочем миокарде предсердий, однако, в миокарде ППВ остался на низком уровне, как у контрольных, так и у симпатэктомированных крыс.

Причина, по которой в миокарде ППВ экспрессия каналов Kir2.2 и плотность тока I_{K1} низкая, может быть связана с происхождением этой ткани. Как уже было упомянуто, миокард полых вен является производным эмбрионального венозного синуса, который играет роль пейсмекера на ранних стадиях эмбриогенеза (Mommersteeg, Dominguez и др., 2010). Характерной чертой венозного синуса является высокий уровень экспрессии ТФ Tbx2/3/18, которые способствуют экспрессии генов «пейсмекерного электрофизиологического фенотипа» (коннексины низкой проводимости Cx30.2 и Cx45, каналы HCN1 и HCN4) и препятствуют экспрессии коннексинов высокой проводимости Cx40 и 43, а также каналов Nav1.5 и Kir2.X (Hoogaars, Engel и др., 2007). В ходе развития большая часть венозного синуса теряет пейсмекерные характеристики и преобразуется в рабочий предсердный миокард, а экспрессия ТФ Tbx2/3/18 сохраняется лишь в небольшом участке – САУ (Christoffels, Mommersteeg и др., 2006; Hoogaars, Tessari и др., 2004). В ходе преобразования в предсердном миокарде возрастает экспрессия ТФ Nkx2-5 и, соответственно, экспрессия генов «рабочего электрофизиологического фенотипа» – Cx40 и 43, Nav1.5 и Kir2.X. Таким образом, предполагается, что для компактизации САУ, в миокарде полых вен во взрослом состоянии должен проявляться «рабочий фенотип» – высокая экспрессия Kir2.X, предсердный ПД и стабильный высокий уровень МПП. Однако, наши эксперименты показывают, что в полых венах не происходит полноценного установления характеристик «рабочего фенотипа». Возможно, в зрелом миокарде полых вен соотношение экспрессии Nkx2-5 и Tbx2/3/18 остается низким, в отличие от рабочего предсердного миокарда. Таким образом, сниженный уровень экспрессии каналов Kir2.2 и плотности тока I_{K1} может быть объяснен как результат неполной атриализации.

V.3 Изменение скорости проведения возбуждения и количества коннексинов высокой проводимости Cx43 в миокарде ППВ в ходе постнатального онтогенеза

В данной работе были исследованы особенности распространения волны возбуждения в ППВ на разных стадиях постнатального онтогенеза. Нами показано, что миокардиальная ткань ППВ возбудима, при этом, проведение в миокарде полых вен – антероградное, без каких-либо существенных отклонений во всех возрастных группах (7-60 дней). Возбуждение распространялось в препаратах ППВ-ПП от области вено-предсердного соединения к дистальным участкам вены, что указывает на расположение источника возбуждения в САУ. Это показывает, что в конце первой недели жизни миокард правого предсердия и ППВ у крыс электрически сопряжен, а САУ выполняет роль основного пейсмекера. За исключением одного случая в группе неонатальных животных, нами показано, что миокард ППВ не способен выступить в качестве ведущего пейсмекера

в препаратах ППВ-ПП неонатальных, ювенильных и взрослых крыс (7, 14, 21 и 60 дней после рождения). В группе взрослых симпатэктомированных крыс нами не было обнаружено различий в проведении возбуждения. Скорость и направление распространения возбуждения в этой группе животных не отличалась от параметров проведения у взрослых контрольных крыс. Таким образом, нами было показано, что автоматия полых вен подавляется доминантным пейсмейкером, располагающимся в САУ на протяжении всего постнатального онтогенеза.

Хорошо известно, что во взрослом состоянии для кардиомиоцитов САУ характерен деполяризованный, нестабильный МПП, наличие медленной диастолической деполяризации, слабой электрической сопряженности и низкой скорости нарастания переднего фронта ПД, что обуславливает его «медленный» тип проведения. Напротив, рабочий миокард демонстрирует «быстрый» тип проведения и обладает высокой скоростью проведения возбуждения и нарастания переднего фронта ПД при наличии стабильного МПП. Наши эксперименты показывают, что в раннем постнатальном онтогенезе миокард ППВ демонстрирует свойства в большей степени характерные пейсмейкерному миокарду: низкая скорость проведения и нарастания переднего фронта ПД, однако при электрическом сопряжении с правым предсердием (и САУ) не способен проявлять автоматию. Таким образом, миокард ППВ неонатальных крыс сочетает в себе характеристики как пейсмейкерного, так и рабочего миокарда.

У взрослых крыс в миокарде ППВ скорость проведения возбуждения, зарегистрированная в наших экспериментах, была ниже по сравнению со скоростью проведения возбуждения в рабочем миокарде, согласно ранее опубликованным данным (0.6–0.8 м/с) [Jensen et al., 2019; Kuzmin et al., 2015; Olsen et al., 2013]. Несмотря на это, скорость проведения возбуждения в миокарде ППВ взрослых крыс была значительно выше по сравнению с миокардом ППВ крыс возраста 7-21 день (0.15–0.30 м/с). Таким образом, в ходе постнатального онтогенеза скорость проведения возбуждения возрастает, а тип ответа «переключается» с медленного на быстрый тип проведения.

Максимальная скорость нарастания переднего фронта ПД (dv/dt_{\max}) зависит от плотности каналов быстрого деполяризующего натриевого тока (I_{Na} , каналы $Na_v1.5$) [Cohen et al., 1984] и определяет тип проведения возбуждения в миокардиальной ткани [Maier et al., 2002]. В наших экспериментах значение dv/dt_{\max} в миокардиальной ткани ППВ неонатальных крыс было значительно выше по сравнению с таковым в пейсмейкерном миокарде (5–30 В/с), [Nakayama et al., 1984; Shinagawa et al., 2000], однако, в то же время было и значительно ниже по сравнению с dv/dt_{\max} в миокарде ППВ у взрослых крыс. Исходя из этих данных, свойства миокарда ППВ нельзя отнести ни к пейсмейкерному, ни к рабочему

фенотипу. Также, нами показано, что dv/dt_{\max} в миокарде ППВ возрастает в течение постнатального развития. Данное наблюдение, предположительно, может быть обусловлено увеличением уровня экспрессии Nav1.5 в ходе постнатального развития.

Кроме того, dv/dt_{\max} в значительной степени зависит и от уровня входящего тока аномального выпрямления I_{K1} . Хорошо известно, что, контролируя МПП и продолжительность ПД (ДПД) в конце реполяризации, I_{K1} регулирует доступность каналов Nav1.5 и, следовательно, возбудимость клеток. Было показано, что увеличение экспрессии Kir2.1 в желудочковых кардиомиоцитах, и соответственно, тока I_{K1} приводит к значительному увеличению плотности тока I_{Na} . Совместная повышенная экспрессия Nav1.5 и Kir2.1 приводит к гиперполяризации МПП, укорочению ДПД, и следовательно, к увеличению скорости проведения [Milstein et al., 2012]. Предполагается, что изменение в экспрессии каналов Nav1.5 может быть связано с взаимодействием на уровне белков с Kir2.1. Также, было показано, что между каналами Nav1.5 и Kir2.1 существует реципрокное регулирование: увеличение плотности I_{K1} приводит к увеличению плотности I_{Na} , и наоборот [Milstein et al., 2012]. Также, предполагается, что такая регуляция каналов Nav1.5 и Kir2.1 осуществляется за счет образования сложных белковых комплексов. При этом, в зрелом миокарде количество сайтов связывания между белками и самих Nav1.5/Kir2.1 комплексов может быть ограниченное количество, что обеспечивает некоторый предел функциональных каналов Nav1.5/Kir2.1 в мембране кардиомиоцитов [Abriel, 2007]. В предварительных экспериментах нами было показано, что у крыс в миокарде ППВ и предсердий преобладает Kir2.2 по сравнению с Kir2.1 [Ivanova et al., 2020], а в данной работе показано, что экспрессия каналов Kir2.2 в полых венах значительно ниже по сравнению с предсердным рабочим миокардом у взрослых контрольных и симпатэктомированных крыс. Сниженный уровень Kir2.2 и тока I_{K1} может обуславливать меньшую плотность тока I_{Na} и сниженную скорость проведения по сравнению с рабочим миокардом.

Скорость проведения возбуждения и нарастания переднего фронта ПД также определяется и типом коннексинов щелевых контактов, которые обеспечивают электрическое сопряжение кардиомиоцитов в миокарде [M., Yoram, 1997; Rohr et al., 1998]. В предыдущих исследованиях было показано, что в полых венах у человека [Kugler et al., 2018] и собак [Yeh et al., 2001] присутствует экспрессия Cx43. Считается, что экспрессия высокопроводящего коннексина Cx43 является одной из главных характеристик рабочего предсердного миокарда [Bukauskas et al., 1995; Kreuzberg et al., 2006; Kucera et al., 2002]. Наоборот, пейсмекерная миокардиальная ткань САУ определяется полным отсутствием Cx43 [Atkinson et al., 2013; Boyett et al., 2006; Chandler et al., 2009; Dobrzynski et al., 2013,

2007]. Таким образом, Sx43 является одним из основных маркеров *непейсмерного*, рабочего миокарда. В наших экспериментах Sx43-специфичная флуоресценция была обнаружена на срезах полых вен, полученных от семидневных животных, а по мере взросления животных мы наблюдали увеличение количества Sx43 в препаратах. Это означает, что миокард ППВ неонатальных животных уже обладает некоторыми характеристиками рабочего миокарда и его невозможно отнести к исключительно пейсмерному типу.

Кроме того, нами было обнаружено, что в ходе онтогенеза происходит перераспределение локализации Sx43: в неонатальном миокарде ППВ Sx43 был обнаружен в латеральных мембранах кардиомиоцитов, в то время как в зрелом миокарде полых вен Sx43 наблюдали преимущественно в интеркалирующих дисках, располагающихся в полярных участках вытянутых миокардиальных клеток. Такое перераспределение и увеличение плотности Sx43 в интеркалирующих дисках на торцах клеток способствует увеличению проведения возбуждения. Известно, что характер расположения щелевых контактов (и, соответственно, Sx43) зависит от стадии развития сердца и может быть изменен при патологии [Kléber, Rudy, 2004]. У незрелых кардиомиоцитов (фетальных или ранних неонатальных) различные мембранные белки, в том числе ионные каналы и коннексины, расположены диффузно по всей поверхности мембраны. Так, показано, что в неонатальных желудочковых кардиомиоцитах как в культуре, так и *in vivo* [Fast, Kléber, 1994; Gourdie et al., 1992], либо при ремоделировании миокарда при инфаркте [Peters, 1995; Peters, Wit, 2000], щелевые контакты распределяются равномерно по всему периметру клетки. В незрелых щелевых контактах плотность Sx43 низкая, что создает большое сопротивление и, соответственно, сниженную скорость распространения возбуждения в продольном направлении. При этом, за счет наличия боковых щелевых контактов происходит пассивная утечка тока в поперечном направлении, что деполяризует соседние клетки. Такой механизм проведения возбуждения в незрелом миокарде необходим для снижения анизотропии и обеспечения распространения возбуждения по площади миокардиальной ткани, когда проводящая система сердца еще не развита. В ходе развития и дифференцировки, кардиомиоциты приобретают более сложную систему организации мембранных белков – происходит колокализация различных ионных каналов в кавеолах, а также в зрелых щелевых контактах. В норме в зрелом миокарде желудочков расположение щелевых контактов находится на торцевых концах клеток, а на боковых границах клетки – в меньшем количестве [Hoyt et al., 1989; Saffitz et al., 1994]. При этом, в зрелых кардиомиоцитах желудочков в щелевых контактах плотность Sx43, намного выше по сравнению с неонатальными, а также Na⁺- и K⁺- каналы располагаются вблизи щелевых

контактов [Cohen, 1996; Mays et al., 1995], что снижает сопротивление и увеличивает скорость продольного распространения возбуждения в клетках [Kléber, Rudy, 2004]. В зрелом рабочем миокарде за распространение возбуждения к разным участкам миокарда отвечает проводящая система, а в рабочих кардиомиоцитах необходимо быстрое направленное проведение, что достигается увеличением плотности щелевых контактов в торцевых участках клеток.

Таким образом, наблюдаемое нами перераспределение Sx43 в миокарде полых вен в ходе развития соответствует таковому в рабочем миокарде. Важно отметить, что миокардиальная ткань полых вен не имеет собственной проводящей системы, и при этом имеет сложную организацию слоев кардиомиоцитов – кардиомиоциты в рукавах полых вен имеют различную ориентацию, располагаясь коаксиально, либо радиально в стенке вены. Во взрослом состоянии в кардиомиоцитах полых вен щелевые контакты располагаются на торцевых участках, что обеспечивает быстрое распространение возбуждения в продольном направлении. Однако, в случае гетерогенной ориентации слоев кардиомиоцитов, либо при ремоделировании клеток при патологии, может произойти разобщение электрического проведения от предсердия, либо могут возникнуть блоки проведения. В таком случае, это будет способствовать возникновению эктопических очагов возбуждения или reentry.

V.4 Изменение способности к автоматии в базальных условиях в миокарде ППВ и уровень мРНК HCN4 в ходе постнатального онтогенеза

В наших экспериментах показано, что миокардиальная ткань полых вен у неонатальных животных способна генерировать спонтанные ПД, однако постепенно теряет эту способность в ходе постнатального развития, у взрослых животных в базальных условиях (в отсутствие электрической или фармакологической стимуляции) в миокардиальной ткани полых вен спонтанная активность отсутствует. Как уже было указано выше, предшественник миокардиальной ткани полых вен и САУ, эмбриональный венозный синус, обладает пейсмекерными характеристиками благодаря высокой экспрессии ТФ Tbx2/3/18. Способность генерировать спонтанные ПД на ранних этапах постнатального развития может быть обусловлена тем, что экспрессия ТФ Tbx2/3/18, и, соответственно, генов пейсмекерного электрофизиологического фенотипа (Sx30.2 и Sx45, HCN1 и HCN4), сохраняется на некотором уровне в полых венах. Постепенно, в ходе компактизации доминантного пейсмекера в САУ, в окружающих миокардиальных тканях необходимо снижение «пейсмекерных» ТФ Tbx2/3/18 и увеличение ТФ рабочего миокарда – Nkx2-5, Tbx 5 и GATA4.

Однако, нами было выявлено, что экспрессия канала HCN4 пейсмекерного тока I_f в миокардиальной ткани полых вен не снижается в ходе постнатального онтогенеза, а сохраняется на высоком уровне: уровень мРНК канала HCN4 пейсмекерного тока I_f не отличался между препаратами полых вен и предсердия в возрасте 7 дней, однако в зрелом возрасте экспрессия HCN4 была значительно выше в миокарде полых вен. Низкий уровень экспрессии Kir2.2 и высокий HCN4 способствует проявлению спонтанных ПД, однако в наших экспериментах во взрослом состоянии миокард полых вен не проявлял способности к спонтанной активности. По-видимому, для возникновения спонтанного ПД в миокарде полых вен одного лишь тока I_f и сниженного МПП недостаточно. Зарегистрированные нами ПД в препаратах полых вен животных возраста 7-60 дней показывают, что в полых венах длительность ПД снижается на уровне реполяризации 50%, что может быть обусловлено снижением I_{CaL} и увеличением I_{to} , I_{Kur} и I_{Kr} [Wang et al., 1996]. Усиление выходящих K^+ -токов препятствуют деполяризации мембраны, а также, возможно, в полых венах оказывается недостаточно плотности токов I_{NCX} , I_{CaL} и I_{CaT} , необходимых для формирования МДД и спонтанного ПД. Таким образом, с одной стороны, снижение способности к спонтанной активности указывает на то, что в миокарде полых вен в некоторой степени происходит процесс атриализации, при котором миокард теряет пейсмекерные свойства. С другой стороны, высокий уровень экспрессии каналов HCN4 и низкий уровень экспрессии Kir2.2 указывают на то, что этот процесс осуществляется неполноценно, или, по крайней мере, отличным от предсердного миокарда путем.

В группе симпатэктомированных крыс, однако, спонтанная активность сохранялась на всем протяжении постнатального онтогенеза, и у взрослых симпатэктомированных крыс наблюдали спонтанную активность в 67% случаев в экспериментах. Кроме того, у взрослых симпатэктомированных крыс в полых венах экспрессия HCN4 значительно возросла по сравнению с неонатальными животными. Экспрессия Kir2.2 и Nkx2-5 в полых венах симпатэктомированных животных была значительно ниже по сравнению с предсердным миокардом. Эти данные показывают, что развитие СНС влияет на характеристики миокардиальной ткани полых вен и процесс атриализации кардиомиоцитов. Исходя из наших результатов, мы предполагаем, что одним из механизмов этого влияния может быть подавление экспрессии HCN4. Таким образом, отсутствие развития симпатических нервных окончаний, позволяет сохранить в миокарде полых вен высокую экспрессию HCN4, и возможно, другие признаки пейсмекерного электрофизиологического фенотипа.

V.5 Изменение способности к автоматии при адренергической стимуляции и экспрессия α_{1A} -АР в миокарде ППВ в ходе постнатального онтогенеза

Существует лишь несколько исследований, в которых исследована способность миокардиальной ткани полых вен к генерации спонтанной активности вен при адренергической стимуляции [Arita et al., 1967; Chen et al., 2002; Ivanova, Kuzmin, 2017]. Под термином «способность к спонтанной активности» здесь и далее подразумевается генерация спонтанных ПД в участке миокарда, изолированном от естественного ритмоводителя сердца (САУ), а также в отсутствие электрической стимуляции. В наших экспериментах у неонатальных животных норадреналин (агонист α - и β -АР) и фенилэфрин (агонист α_1 -АР), вызывали возникновение спонтанных ПД во всех препаратах ППВ, а изопротеренол (агонист β -АР) индуцировал спонтанную активность в 43% экспериментов. Способность к генерации спонтанной активности при действии НА и ФЭ снижалась в ходе онтогенеза, в то время как при действии ИЗО – ко взрослому состоянию осталась на исходном уровне. Однако, в отсутствие развития СНС способность генерировать спонтанные ПД была выше в зрелом состоянии (по сравнению с животными с нормально развивающейся НС) как при селективной активации α_{1A} -АР, так и β -АР фенилэфрином и изопротеренолом, соответственно.

Снижение способности миокарда ППВ генерировать спонтанные ПД при действии НА и ФЭ может быть обусловлено изменением количества или перераспределением α_{1A} -АР в миокардиальном слое ППВ. В наших экспериментах были получены неоднозначные результаты относительно экспрессии α_{1A} -АР: при иммуногистохимической окраске α_{1A} -АР в полых венах наблюдали снижение количества флуоресцентных α_{1A} -частиц на срезах, в то время как методом ПЦР в реальном времени было обнаружено, что мРНК α_{1A} -АР увеличивается в миокарде полых вен в постнатальном онтогенезе. При этом, в наших экспериментах значимое увеличение уровня мРНК α_{1A} -АР наблюдали только в группе симпатэктомированных животных. Вероятное объяснение данных результатов – особенности биосинтеза белка. В ходе процессов трансляции и дальнейшей модификации белков возможно, что количество зрелого функционального белка существенно отличается от количества мРНК α_{1A} -АР.

В нескольких исследованиях было показано, что количество α -АР возрастает в сердце у крыс в течение раннего постнатального периода, однако у взрослых животных происходит снижение их экспрессии [Hew, Keller, 2003; Metz et al., 1996; Noguchi, Whitsett, 1982; Noguchi et al., 1981]. Также, было показано, что α_{1A} -АР могут располагаться как в на внешней мембране сарколеммы, так на ядерной мембране. Существует множество свидетельств того, что в зрелых кардиомиоцитах α_{1A} -АР, а также α_{1B} -АР, не

обнаруживаются в плазматической мембране, но колокализуются совместно с $G_{\alpha q}$ белком и PLC $\beta 1$ на ядерной мембране [Wright et al., 2008, 2009; Wu et al., 2014].

В наших экспериментах в препаратах ППВ и предсердия взрослых крыс α_{1A} -флуоресцентные частицы преимущественно располагались сгруппированными кластерами вокруг ядер кардиомиоцитов. Это показывает, что локализация α_{1A} -АР меняется в ходе постнатального онтогенеза в миокарде ППВ. Таким образом, снижение чувствительности к НА и ФЭ можно объяснить перераспределением α_1 -АР: в кардиомиоцитах ППВ на ранних этапах онтогенеза НА/ФЭ может действовать на рецепторы, находящиеся на плазматической мембране, запуская каскад $G_{\alpha q}$ -PLC, в то время как у взрослых животных α_1 -АР локализуется преимущественно на ядерной мембране и могут активировать иные внутриклеточные механизмы. Активация ядерных α_1 -АР может индуцировать внутриядерные сигналы физиологической гипертрофии, а также внеядерные сигналы, включающие активацию киназы ERK в кавеолах и передачу сигналов «выживания», либо к фосфорилированию сердечного тропонина I в саркомерах и регуляции сократительной активности [O'Connell et al., 2014; Zhang et al., 2013].

Таким образом, у животных с нормально развивающейся СНС в полых венах происходит снижение чувствительности к агонистам α_1 -АР, по-видимому, за счет изменения паттерна локализации рецепторов с наружной мембраны на ядерную, при этом уровень мРНК α_1 -АР с возрастом увеличился незначительно. В отсутствие развития СНС в миокарде полых вен сохраняется способность к генерации спонтанной активности при действии агонистов α_1 -АР, и кроме того, с увеличением возраста уровень мРНК α_1 -АР значительно повышается. Однако существенных различий в уровне экспрессии α_1 -АР между контрольными и симпатэктомированными животными мы не обнаружили.

Установление иннервации сердца в раннем постнатальном периоде совпадает с моментом завершения синтеза ДНК в кардиомиоцитах и их дифференциации. В этот период кардиомиоциты теряют способность пролиферировать, поэтому дальнейшее увеличение камер сердца осуществляется за счет механизмов физиологической гипертрофии и увеличения размеров кардиомиоцитов [Li et al., 1996]. Предполагается, что в период окончания грудного вскармливания увеличение симпатической стимуляции, увеличение высвобождения норадреналина и последующая активация α_{1A} -АР играют важную роль в физиологической гипертрофии кардиомиоцитов в нормальном постнатальном онтогенезе [O'Connell et al., 2003].

Ключевыми молекулами α_{1A} -опосредованной гипертрофической передачи сигнала являются фосфолипаза C (PLC), протеинкиназа C и D (PKC и PKD), ERK (extracellular signal-regulated kinase), а также гистон дэацетилаза 2 класса [O'Connell et al., 2014].

Активация этих молекул осуществляется за счет действия катехоламинов на ядерные α_{1A} -АР, которых становится больше на ядерной мембране в ходе постнатального онтогенеза [Wright et al., 2013]. Предполагают, что активация ядерных α_{1A} -АР приводит к трансдукции сигнала от ядерной мембраны к ERK в кавеолах плазматической мембраны [Wright et al., 2008]. Механизм, передачи сигнала от ядерных α_{1A} -АР к плазматической мембране, неизвестен, но может включать РКС, которая транслоцируется в кавеолы после активации и фосфорилирует ERK [Rybin et al., 1999]. Активацию ERK связывают с регуляцией гипертрофии кардиомиоцитов и с антиапоптотическими механизмами «выживания» [Bueno et al., 2000].

Одной из мишеней фосфорилирования ERK является ТФ GATA4, который в кардиомиоцитах способствует транскрипции ряда генов, в том числе и способствующих росту кардиомиоцитов [Liang et al., 2001]. Также, показано, что GATA4 действует совместно с Nkx2-5 [Charron, Nemer, 1999; Durocher et al., 1997] благодаря физическому взаимодействию с этим ТФ, а также совместно с Tbx5 [Stennard et al., 2003], стимулирует транскрипцию генов рабочего электрофизиологического фенотипа в кардиомиоцитах. В наших экспериментах показано, что уровень ТФ Nkx2-5 существенно ниже в миокарде полых вен симпатэктомизированных крыс по сравнению с предсердным миокардом. Это может являться одним из признаков ослабленной передачи сигнала α_{1A} -АР-ERK-GATA4/Nkx2-5/Tbx5. Таким образом, можно предположить, что увеличение симпатического влияния в постнатальном онтогенезе приводит к α_{1A} -опосредованной регуляции морфологии и электрофизиологии миокардиальной ткани, которая способствует увеличению размеров кардиомиоцитов и увеличению экспрессии мембранных белков рабочего электрофизиологического фенотипа.

V.6 Cav3 и каналы HCN4 пейсмекерного тока I_f в миокардиальной ткани ПШВ в ходе постнатально развития

Нами было проведено исследование распределения кавеолина 3 (Cav3) и каналов HCN4, опосредующих пейсмекерный ток I_f . Cav3 – структурный белок сарколеммы, является биомаркером миокардиальной ткани. Cav3 локализуется в кавеолах — подтип морфологически оформленных мембранных липидных рафтов, где он взаимодействует с мембранными белками, в том числе и с ионными каналами [Balijepalli, Kamp, 2008]. Известно, что взаимодействие ионных каналов с Cav3 влияет на чувствительность ионных каналов к различной регуляции и на биофизические свойства ионных токов [Balijepalli, Kamp, 2008]. Одной из таких ассоциаций Cav3 с ионными каналами является взаимодействие Cav3 с каналом HCN4 пейсмекерного тока I_f : было показано, что HCN4

колокализуется с Cav3 в САУ у кроликов и мышей [Barbuti et al., 2004; Brioschi et al., 2009]. При этом, происходит изменение характеристик активации пейсмекерного тока и его чувствительности к адренергической модуляции [Barbuti et al., 2007]. Также показано, что HCN4 колокализуется с Cav3 в мембране зрелых предсердных и желудочковых кардиомиоцитах человека, но не в мембране кардиомиоцитов эмбриональных животных [Bosman et al., 2013]. Разница в паттернах локализации HCN4 и Cav3 в эмбриональных и зрелых кардиомиоцитах указывает на то, что организация ионных каналов в сарколемме происходит постепенно в ходе развития. Существует мнение, что перераспределение мембранных белков и ионных каналов в кавеолах является одним из ключевых событий для созревания миокарда [Bosman et al., 2013].

В наших экспериментах было обнаружено, что на срезах ППВ неонатальных, взрослых и симпатэктомированных взрослых крыс присутствуют островки кардиомиоцитов, содержащие HCN4 каналы. Наименьшее количество HCN4-положительных кардиомиоцитов было обнаружено в миокарде ППВ взрослых контрольных крыс, а наибольшее количество – у взрослых симпатэктомированных. У контрольных неонатальных животных в стенке ППВ количество HCN4-флуоресценции было сопоставимо с контрольными взрослыми.

При помощи корреляционного анализа интенсивности, нами был определен уровень колокализации каналов HCN4 и Cav3. Анализ на колокализацию показал, что во всех препаратах, как у контрольных, так и у симпатэктомированных крыс HCN4 колокализуется с Cav3 частично. Степень колокализации у взрослых крыс была выше по сравнению с неонатальными. При этом, только у симпатэктомированных крыс наблюдали значительно большую степень колокализации по сравнению с неонатальными контрольными крысами.

Результаты работы показывают, что при нормальном развитии, на ранних этапах постнатального онтогенеза в ППВ сохраняются экспрессирующие HCN4 клетки в виде скоплений на внешней стороне и небольших вкраплений в толще миокардиального слоя вены на всей ее протяженности до самых дистальных участков. На раннем этапе развития лишь небольшая часть HCN4 каналов связана с белком Cav3, что является маркером незрелых кардиомиоцитов. В ходе развития, в ППВ количество клеток, экспрессирующих HCN4, становится меньше, однако небольшие островки таких кардиомиоцитов сохраняются.

Нами было продемонстрировано, что в отсутствие развития симпатической иннервации, миокард ППВ сохраняет свою мозаичность, то есть, в толщине миокардиальных рукавов полых вен присутствуют разные типы кардиомиоцитов: и клетки с признаками пейсмекерного фенотипа, и клетки с признаками рабочего фенотипа. В

миокардиальных рукавах ППВ взрослых симпатэктомированных крыс сохраняется и даже увеличивается количество кардиомиоцитов, экспрессирующих HCN4, при этом они распределены диффузно в толщине миокардиальной ткани ППВ. Также, у взрослых симпатэктомированных крыс уровень колокализации HCN4 и Cav3 высокий, что указывает на зрелость кардиомиоцитов, составляющих стенку ППВ. Более высокий уровень колокализации HCN4 и Cav3 у взрослых симпатэктомированных животных по сравнению с контрольными, возможно, обеспечен большим количеством самих каналов HCN4 в стенке ППВ.

Таким образом, согласно результатам с использованием иммуногистохимических методов, нами показано, что в ходе постнатального онтогенеза в миокарде полых вен количество HCN4 каналов остается на уровне, сопоставимом с неонатальной стадией, однако, в отсутствие развития симпатических нервных окончаний количество HCN4 каналов увеличивается по сравнению с неонатальным миокардом ППВ. При этом, у взрослых симпатэктомированных животных HCN4-содержащие кардиомиоциты демонстрируют зрелый фенотип.

Методом ПЦР в реальном времени нами было установлено, что в миокарде полых вен у взрослых контрольных и симпатэктомированных крыс уровень мРНК канала HCN4 значительно больше по сравнению с рабочим миокардом предсердий. Кроме того, у симпатэктомированных крыс мРНК канала HCN4 оказалось значительно больше по сравнению с уровнем в ППВ неонатальных крыс. Сохранение и увеличение экспрессии HCN4 в кардиомиоцитах полых вен у симпатэктомированных крыс, вероятно, облегчает начальные этапы формирования МДД, необходимой для генерации спонтанного потенциала действия.

Данные полученные методами иммуногистохимии и ПЦР в реальном времени показывают, что в отсутствие развития симпатической иннервации в миокарде полых вен не происходит угнетение экспрессии каналов HCN4 пейсмекерного тока I_f . Это показывает, что развитие СНС выполняет регуляторную функцию в контроле преобразования миокарда ППВ в постнатальном онтогенезе, влияя на экспрессию HCN4.

VI 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 Cx43 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 α_{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 симпатэктомированных 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 α_{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.

VII 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 α_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 симпатэктомированных животных экспрессируют α_{1A} -адренорецепторы (α_{1A} -АР) на всех этапах постнатальной жизни, однако, клеточная локализация α_{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 Nkx2-5, 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 Nkx2-5. 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.

VIII СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Christoffels V. M., Mommersteeg M. T. M., Trowe M. O., Prall O. W. J., Gier-De Vries C. De, Soufan A. T., Bussen M., Schuster-Gossler K., Harvey R. P., Moorman A. F. M., Kispert A. Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18 // *Circulation Research*. – 2006. – V. 98. – № 12. – P. 1555–1563.
2. Hocini M., Ho S. Y., Kawara T., Linnenbank A. C., Potse M., Shah D., Jaïs P., Janse M. J., Haïssaguerre M., Se Bakker J. M. T. Electrical conduction in canine pulmonary veins: Electrophysiological and anatomic correlation // *Circulation*. – 2002. – V. 105. – № 20. – P. 2442–2448.
3. Karschin C., Karschin a Ontogeny of gene expression of Kir channel subunits in the rat. // *Molecular and cellular neurosciences*. – 1997. – V. 10. – № 3–4. – P. 131–148.
4. Abriel H. Roles and regulation of the cardiac sodium channel Nav1.5: Recent insights from experimental studies // *Cardiovascular Research*. – 2007. – V. 76. – № 3. – P. 381–389.
5. Ahles A., Engelhardt S. Polymorphic Variants of Adrenoceptors: Pharmacology, Physiology, and Role in Disease // *Pharmacological Reviews*. – 2014. – V. 66. – № 3. – P. 598–637.
6. Aminu A. J., Petkova M., Atkinson A. J., Yanni J., Morris A. D., Simms R. T., Chen W., Yin Z., Kuniewicz M., Holda M. K., Kuzmin V. S., Perde F., Molenaar P., Dobrzynski H. Further insights into the molecular complexity of the human sinus node – The role of ‘novel’ transcription factors and microRNAs // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. – 2021. – V. 166. – P. 86–104.
7. Anderson R. H., Brown N. A., Moorman A. F. M. Development and structures of the venous pole of the heart // *Developmental Dynamics*. – 2006. – V. 235. – № 1. – P. 2–9.
8. Anumonwo J., Lopatin a. N. Cardiac Strong inward rectifier potassium channels // *Journal of molecular and cellular cardiology*. – 2010. – V. 48. – № 1. – P. 45–54.
9. Arentz T., Haegeli L., Sanders P., Weber R., Neumann F. J., Kalusche D., Haïssaguerre M. High-density mapping of spontaneous pulmonary vein activity initiating atrial fibrillation in humans // *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. – 2007. – V. 18. – № 1. – P. 31–38.
10. Arita M., Saeki K., Tanoue M., Fukushima I., Ito M., Yanaga T., Mashiba H. Effects of catecholamines, propranolol, acetylcholine and oubain on thr transmembrane action potentials and contractility of the isolated venae cavae proximal to the heart of the rabbit // *The Japanese Journal of Physiology*. – 1967. – V. 17. – P. 158–173.
11. Arita M., Saeki K., Tanoue M., Ito M., Yanaga T., Mashiba H. Studies on transmembrane action potentials and mechanical responses of the venae cavae and atria of the rabbit // *The Japanese Journal of Physiology*. – 1966. – V. 16. – P. 462–480.
12. Armour J. A., Murphy D. A., Yuan B., MacDonald S., Hopkins D. A. Gross and microscopic

- anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system // *The Anatomical Record*. – 1997. – V. 247. – № 2. – P. 289–298.
13. Armstrong C. M. Sodium channels and gating currents. // *Physiological reviews*. – 1981. – V. 61. – № 3. – P. 644–683.
14. Arora R., Verheule S., Scott L., Navarrete A., Katari V., Wilson E., Vaz D., Olgin J. E. Arrhythmogenic substrate of the pulmonary veins assessed by high-resolution optical mapping // *Circulation*. – 2003. – V. 107. – № 13. – P. 1816–1821.
15. Atkinson A. J., Logantha S. J. R. J., Hao G., Yanni J., Fedorenko O., Sinha A., Gilbert S. H., Benson A. P., Buckley D. L., Anderson R. H., Boyett M. R., Dobrzynski H. Functional, Anatomical, and Molecular Investigation of the Cardiac Conduction System and Arrhythmogenic Atrioventricular Ring Tissue in the Rat Heart // *Journal of the American Heart Association*. – 2013. – V. 2. – № 6. – P. e000246–e000246.
16. Auer J., Scheibner P., Mische T., Langsteger W., Eber O., Eber B. Subclinical hyperthyroidism as a risk factor for atrial fibrillation // *American Heart Journal*. – 2001. – V. 142. – № 5. – P. 838–842.
17. Axelsson S., Bjorklund 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. 435–444.
18. Balijepalli R. C., Kamp T. J. Caveolae, ion channels and cardiac arrhythmias // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. – 2008. – V. 98. – № 2–3. – P. 149–160.
19. Baptista C. A., Kirby M. L. The cardiac ganglia: cellular and molecular aspects. // *The Kaohsiung journal of medical sciences*. – 1997. – V. 13. – № 1. – P. 42–54.
20. Barbuti A., Gravante B., Riolfo M., Milanesi R., Terragni B., DiFrancesco D. Localization of Pacemaker Channels in Lipid Rafts Regulates Channel Kinetics // *Circulation Research*. – 2004. – V. 94. – № 10. – P. 1325–1331.
21. Barbuti A., Terragni B., Brioschi C., DiFrancesco D. Localization of f-channels to caveolae mediates specific β_2 -adrenergic receptor modulation of rate in sinoatrial myocytes // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2007. – V. 42. – № 1. – P. 71–78.
22. Barbuti A., Terragni B., Brioschi C., DiFrancesco D. Localization of f-channels to caveolae mediates specific β_2 -adrenergic receptor modulation of rate in sinoatrial myocytes // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2007. – V. 42. – № 1. – P. 71–78.
23. Benfey B. G. Function of myocardial α -adrenoceptors // *Life Sciences*. – 1982. – V. 31. – № 2. – P. 101–112.
24. Benjamin E. J., Muntner P., Alonso A., Bittencourt M. S., Callaway C. W., Carson A. P.,

- Chamberlain A. M., Chang A. R., Cheng S., Das S. R., Delling F. N., Djousse L., Elkind M. S. V., Ferguson J. F., Fornage M., Jordan L. C., Khan S. S., Kissela B. M., Knutson K. L., Kwan T. W., Lackland D. T., Lewis T. T., Lichtman J. H., Longenecker C. T., Loop M. S., Lutsey P. L., Martin S. S., Matsushita K., Moran A. E., Mussolino M. E., O'Flaherty M., Pandey A., Perak A. M., Rosamond W. D., Roth G. A., Sampson U. K. A., Satou G. M., Schroeder E. B., Shah S. H., Spartano N. L., Stokes A., Tirschwell D. L., Tsao C. W., Turakhia M. P., VanWagner L. B., Wilkins J. T., Wong S. S., Virani S. S. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association Benjamin et al., 2019. 56–528 c.
25. Berenfeld O., Zaitsev A. V., Mironov S. F., Pertsov A. M., Jalife J. Frequency-Dependent Breakdown of Wave Propagation Into Fibrillatory Conduction Across the Pectinate Muscle Network in the Isolated Sheep Right Atrium // *Circulation Research*. – 2002. – V. 90. – № 11. – P. 1173–1180.
26. Berkowitz D. E., Price D. T., Bello E. A., Page S. O., Schwinn D. A. Localization of messenger RNA for three distinct alpha 2-adrenergic receptor subtypes in human tissues. Evidence for species heterogeneity and implications for human pharmacology. // *Anesthesiology*. – 1994. – V. 81. – № 5. – P. 1235–1244.
27. Bers D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. // *Nature*. – 2002. – V. 415. – № 6868. – P. 198–205.
28. Biel M., Schneider A., Wahl C. Cardiac HCN channels: Structure, function, and modulation // *Trends in Cardiovascular Medicine*. – 2002. – V. 12. – № 5. – P. 206–213.
29. Biel M., Wahl-Schott C., Michalakis S., Zong X. Hyperpolarization-activated cation channels: From genes to function // *Physiological Reviews*. – 2009. – V. 89. – № 3. – P. 847–885.
30. Bkaily G., Avedanian L., Jacques D. Nuclear membrane receptors and channels as targets for drug development in cardiovascular diseases // *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2009. – V. 87. – № 2. – P. 108–119.
31. Bogdanov K. Y., Maltsev V. A., Vinogradova T. M., Lyashkov A. E., Spurgeon H. A., Stern M. D., Lakatta E. G. Membrane potential fluctuations resulting from submembrane Ca²⁺ releases in rabbit sinoatrial nodal cells impart an exponential phase to the late diastolic depolarization that controls their chronotropic state // *Circulation Research*. – 2006. – V. 99. – № 9. – P. 979–987.
32. Bogdanov K. Y., Vinogradova T. M., Lakatta E. G. Sinoatrial Nodal Cell Ryanodine Receptor and Na⁺-Ca²⁺ Exchanger // *Circulation Research*. – 2001. – V. 88. – № 12. – P. 1254–1258.
33. Bolte S., Cordelières F. P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light

- microscopy // *Journal of Microscopy*. – 2006. – V. 224. – № 3. – P. 213–232.
34. Bosman A., Sartiani L., Spinelli V., Lungo M. Del, Stillitano F., Nosi D., Mugelli A., Cerbai E., Jaconi M. Molecular and functional evidence of HCN4 and caveolin-3 interaction during cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells // *Stem Cells and Development*. – 2013. – V. 22. – № 11. – P. 1717–1727.
35. Bowsher B. Y. D. A comparative study of the azygos venous system in man, monkey, dog, cat, rat and rabbit // *Journal of Anatomy*. – 1954. – V. 88. – № 3. – P. 400–406.
36. Boyett M. R., Fedida D. Changes in the electrical activity of dog cardiac Purkinje fibres at high heart rates. // *The Journal of Physiology*. – 1984. – V. 350. – № 1. – P. 361–391.
37. Boyett M. R., Hart G., Levi A. J., Roberts A. Effects of repetitive activity on developed force and intracellular sodium in isolated sheep and dog Purkinje fibres. // *The Journal of physiology*. – 1987. – V. 388. – № 1. – P. 295–322.
38. Boyett M. R., Inada S., Yoo S., Li J., Liu J., Tellez J., Greener I. D., Honjo H., Billeter R., Lei M., Zhang H., Efimov I. R., Dobrzynski H. Connexins in the Sinoatrial and Atrioventricular Nodes // *Adv Cardiol*. – 2006. – V. 42. – P. 175–197.
39. Braun A. P., Fedida D., Giles W. R. Activation of $\alpha 1$ -adrenoceptors modulates the inwardly rectifying potassium currents of mammalian atrial myocytes // *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. – 1992. – V. 421. – № 5. – P. 431–439.
40. Brioschi C., Micheloni S., Tellez J. O., Pisoni G., Longhi R., Moroni P., Billeter R., Barbuti A., Dobrzynski H., Boyett M. R., DiFrancesco D., Baruscotti M. Distribution of the pacemaker HCN4 channel mRNA and protein in the rabbit sinoatrial node // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2009. – V. 47. – № 2. – P. 221–227.
41. Brodde O.-E., Bruck H., Leineweber K. Cardiac Adrenoceptors: Physiological and Pathophysiological Relevance // *Journal of Pharmacological Sciences*. – 2006. – V. 100. – № 5. – P. 323–337.
42. Brodde O. E., Michel M. C. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart // *Pharmacol Rev*. – 1999. – V. 51. – № 4. – P. 651–690.
43. Brunton T., Fayrer J. Note on independent pulsation of the pulmonary veins and vena cava // *Proceedings of the Royal Society of London*. – 1876. – V. 25. – P. 174–176.
44. Buckingham M., Meilhac S., Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells // *Nature Reviews Genetics*. – 2005. – V. 6. – № 11. – P. 826–835.
45. Bueno O. F., Windt L. J. De, Tymitz K. M., Witt S. A., Kimball T. R., Klevitsky R., Hewett T. E., Jones S. P., Lefter D. J., Peng C. F., Kitsis R. N., Molkentin J. D. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice // *EMBO*

Journal. – 2000. – V. 19. – № 23. – P. 6341–6350.

46. Bukauskas F. F., Elfgang C., Willecke K., Weingart R. Biophysical properties of gap junction channels formed by mouse connexin40 in induced pairs of transfected human HeLa cells // *Biophysical Journal*. – 1995. – V. 68. – № 6. – P. 2289–2298.
47. Burstein B., Nattel S. Atrial Fibrosis: Mechanisms and Clinical Relevance in Atrial Fibrillation // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2008. – V. 51. – № 8. – P. 802–809.
48. Buu N. T., Hui R., Falardeau P. Norepinephrine in Neonatal Rat Ventricular Myocytes: Association with the Cell Nucleus and Binding to Nuclear α 1- and β -Adrenergic Receptors // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 1993. – V. 25. – № 9. – P. 1037–1046.
49. Bylund D. B., Eikenberg D. C., Hieble J. P., Langer S. Z., Lefkowitz R. J., Minneman K. P., Molinoff P. B., Ruffolo R. R., Trendelenburg U. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. // *Pharmacological reviews*. – 1994. – V. 46. – № 2. – P. 121–136.
50. Bylund D. B., Ray-Prenger C., Murphy T. J. Alpha-2A and alpha-2B adrenergic receptor subtypes: antagonist binding in tissues and cell lines containing only one subtype. // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 1988. – V. 245. – № 2. – P. 600 LP – 607.
51. Chalothorn D., McCune D. F., Edelmann S. E., Tobita K., Keller B. B., Lasley R. D., Perez D. M., Tanoue A., Tsujimoto G., Post G. R., Piascik M. T. Differential Cardiovascular Regulatory Activities of the α 1B - and α 1D -Adrenoceptor Subtypes // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2003. – V. 305. – № 3. – P. 1045–1053.
52. Chandler N. J., Greener I. D., Tellez J. O., Inada S., Musa H., Molenaar P., DiFrancesco D., Baruscotti M., Longhi R., Anderson R. H., Billeter R., Sharma V., Sigg D. C., Boyett M. R., Dobrzynski H. Molecular architecture of the human sinus node insights into the function of the cardiac pacemaker // *Circulation*. – 2009. – V. 119. – № 12. – P. 1562–1575.
53. Charron F., Nemer M. GATA transcription factors and cardiac development // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 1999. – V. 10. – № 1. – P. 85–91.
54. Chen F.-C. M., Yamamura H. I., Roeske W. R. Ontogeny of mammalian myocardial β -adrenergic receptors // *European Journal of Pharmacology*. – 1979. – V. 58. – № 3. – P. 255–264.
55. Chen S.-A., Haïssaguerre M., Zipes D. P. Thoracic vein arrhythmias : mechanisms and treatment Chen et al., Blackwell Publishing, 2004. 370 c.
56. Chen S.-A., Hsieh M.-H., Tai C.-T., Tsai C.-F., Prakash V. S., Yu W.-C., Hsu T.-L., Ding Y.-A., Chang M.-S. Initiation of Atrial Fibrillation by Ectopic Beats Originating From the Pulmonary Veins // *Circulation*. – 1999. – V. 100. – № 18. – P. 1879–1886.

57. Chen Y. J., Chen S. A., Chen Y. C., Yeh H. I., Chang M. S., Lin C. I. Electrophysiology of single cardiomyocytes isolated from rabbit pulmonary veins: Implication in initiation of focal atrial fibrillation // *Basic Research in Cardiology*. – 2002. – V. 97. – № 1. – P. 26–34.
58. Chen Y. J., Chen S. a, Chen Y. C., Yeh H. I., Chan P., Chang M. S., Lin C. I. Effects of rapid atrial pacing on the arrhythmogenic activity of single cardiomyocytes from pulmonary veins: implication in initiation of atrial fibrillation // *Circulation*. – 2001. – V. 104. – № 23. – P. 2849–2854.
59. Chen Y. J., Chen Y. C., Yeh H. I., Lin C. I., Chen S. A. Electrophysiology and arrhythmogenic activity of single cardiomyocytes from canine superior vena cava // *Circulation*. – 2002. – V. 105. – № 22. – P. 2679–2685.
60. Chou C.-C., Chen P.-S. New Concepts in Atrial Fibrillation: Neural Mechanisms and Calcium Dynamics // *Cardiology Clinics*. – 2009. – V. 27. – № 1. – P. 35–43.
61. Christoffels V. M., Hoogaars W. M. H., Tessari A., Clout D. E. W., Moorman A. F. M., Campione M. T-Box Transcription Factor Tbx2 Represses Differentiation and Formation of the Cardiac Chambers // *Developmental Dynamics*. – 2004. – V. 229. – № 4. – P. 763–770.
62. Christoffels V. M., Mommersteeg M. T. M., Trowe M.-O., Prall O. W. J., Gier-de Vries C. de, Soufan A. T., Bussen M., Schuster-Gossler K., Harvey R. P., Moorman A. F. M., Kispert A. Formation of the Venous Pole of the Heart From an Nkx2–5 –Negative Precursor Population Requires Tbx18 // *Circulation Research*. – 2006. – V. 98. – № 12. – P. 1555–1563.
63. Cohen C. J., Bean B. P., Tsien R. W. Maximal Upstroke Velocity as an Index of Available Sodium Conductance Comparison of Maximal Upstroke Velocity and Voltage Clamp Measurements of Sodium Current in Rabbit Purkinje Fibers // *Circulation research*. – 1984. – V. 54. – P. 636–651.
64. Cohen S. A. Immunocytochemical Localization of rH1 Sodium Channel in Adult Rat Heart Atria and Ventricle // *Circulation*. – 1996. – V. 94. – № 12. – P. 3083–3086.
65. Colucci W. S., Wright R. F., Braunwald E. New positive inotropic agents in the treatment of congestive heart failure // *New England Journal of Medicine*. – 1986. – V. 314. – № 5. – P. 290–299.
66. Darbar D. The Role of Pharmacogenetics in Atrial Fibrillation Therapeutics // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. – 2016. – V. 67. – № 1. – P. 9–18.
67. Denyer J. C., Brown H. F. Pacemaking in rabbit isolated sino-atrial node cells during Cs⁺ block of the hyperpolarization-activated current if. // *The Journal of Physiology*. – 1990. – V. 429. – № 1. – P. 401–409.
68. Desimone C. V., Noheria A., Lachman N., Edwards W. D., Gami A. S., Maleszewski J. J., Friedman P. A., Munger T. M., Hammill S. C., Packer D. L., Asirvatham S. J. Myocardium of

- the superior vena cava, coronary sinus, vein of marshall, and the pulmonary vein ostia: Gross anatomic studies in 620 hearts // *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. – 2012. – V. 23. – № 12. – P. 1304–1309.
69. DiFrancesco D. A new interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres // *The Journal of Physiology*. – 1981. – V. 314. – № 1. – P. 359–376.
70. DiFrancesco D. A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. // *The Journal of Physiology*. – 1981. – V. 314. – № 1. – P. 377–393.
71. DiFrancesco D. Block and activation of the pace-maker channel in calf Purkinje fibres: effects of potassium, caesium and rubidium // *The Journal of Physiology*. – 1982. – V. 329. – № 1. – P. 485–507.
72. DiFrancesco D. Block and activation of the pace-maker channel in calf Purkinje fibres: effects of potassium, caesium and rubidium // *The Journal of Physiology*. – 1982. – V. 329. – № 1. – P. 485–507.
73. DiFrancesco D. The Role of the Funny Current in Pacemaker Activity // *Circulation Research*. – 2010. – V. 106. – № 3. – P. 434–446.
74. Dobrzynski H., Anderson R. H., Atkinson A., Borbas Z., D'Souza A., Fraser J. F., Inada S., Logantha S. J. R. J., Monfredi O., Morris G. M., Moorman A. F. M., Nikolaidou T., Schneider H., Szuts V., Temple I. P., Gianni J., Boyett M. R. Structure, function and clinical relevance of the cardiac conduction system, including the atrioventricular ring and outflow tract tissues // *Pharmacology and Therapeutics*. – 2013. – V. 139. – № 2. – P. 260–288.
75. Dobrzynski H., Boyett M. R., Anderson R. H. New insights into pacemaker activity: Promoting understanding of sick sinus syndrome // *Circulation*. – 2007. – V. 115. – № 14. – P. 1921–1932.
76. Dougherty R. Extensions of DAMAS and Benefits and Limitations of Deconvolution in Beamforming Reston, Virginia: American Institute of Aeronautics and Astronautics, 2005.
77. Douglas Y. L., Jongbloed M. R. M., DeRuiter M. C., Gittenberger-de Groot A. C. Normal and abnormal development of pulmonary veins: State of the art and correlation with clinical entities // *International Journal of Cardiology*. – 2011. – V. 147. – № 1. – P. 13–24.
78. Durocher D., Charron F., Warren R., Schwartz R. J., Nemer M. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors // *The EMBO Journal*. – 1997. – V. 16. – № 18. – P. 5687–5696.
79. Ebert S. N., Rong Q., Boe S., Thompson R. P., Grinberg A., Pfeifer K. Targeted insertion of the Cre-recombinase gene at the phenylethanolamine n-methyltransferase locus: A new model for studying the developmental distribution of adrenergic cells // *Developmental Dynamics*. – 2004. – V. 231. – № 4. – P. 849–858.

80. Ebert S. N., Taylor D. G. Catecholamines and development of cardiac pacemaking: An intrinsically intimate relationship // *Cardiovascular Research*. – 2006. – V. 72. – № 3. – P. 364–374.
81. Ebert S. N., Thompson R. P. Embryonic Epinephrine Synthesis in the Rat Heart Before Innervation // *Circulation Research*. – 2001. – V. 88. – P. 117–124.
82. Eckel L., Gristwood R. W., Nawrath H., Owen D. A. A., Satter P. Inotropic and electrophysiological effects of histamine on human ventricular heart muscle // *Journal of Physiology*. – 1982. – V. 330. – P. 111–123.
83. Enriquez A., Liang J. J., Santangeli P., Marchlinski F. E., Riley M. P. Focal atrial fibrillation from the superior vena cava // *Journal of Atrial Fibrillation*. – 2017. – V. 9. – № 6. – P. 1–3.
84. Fast V. G., Kléber A. G. Anisotropic conduction in monolayers of neonatal rat heart cells cultured on collagen substrate. // *Circulation Research*. – 1994. – V. 75. – № 3. – P. 591–595.
85. Fedida D., Braun A. P., Giles W. R. Alpha 1-adrenoceptors reduce background K⁺ current in rabbit ventricular myocytes. // *The Journal of Physiology*. – 1991. – V. 441. – № 1. – P. 673–684.
86. Fenske S., Krause S. C., Hassan S. I. H., Becirovic E., Auer F., Bernard R., Kupatt C., Lange P., Ziegler T., Wotjak C. T., Zhang H., Hammelmann V., Pappas C., Biel M., Wahl-Schott C. A. Sick sinus syndrome in HCN1-Deficient mice // *Circulation*. – 2013. – V. 128. – № 24. – P. 2585–2594.
87. Forouhar A. S., Liebling M., Hickerson A., Nasiraei-Moghaddam A., Tsai H.-J., Hove J. R., Fraser S. E., Dickinson M. E., Gharib M. The Embryonic Vertebrate Heart Tube Is a Dynamic Suction Pump // *Science*. – 2006. – V. 312. – № 5774. – P. 751–753.
88. Friedman W. F., Pool P. E., Jacobowitz D., Seagren S. C., Braunwald E. Sympathetic innervation of the developing rabbit heart // *Circ Res*. – 1968. – V. 23. – № 4. – P. 25–32.
89. FRIEDMAN W. F., POOL P. E., JACOBOWITZ D., SEAGREN S. C., BRAUNWALD E. Sympathetic Innervation of the Developing Rabbit Heart // *Circulation Research*. – 1968. – V. 23. – № 1. – P. 25–32.
90. Gaborit N., Bouter S. Le, Szuts V., Varro A., Escande D., Nattel S., Demolombe S. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart // *The Journal of physiology*. – 2007. – V. 582. – № Pt 2. – P. 675–693.
91. Galli D., Domínguez J. N., Zaffran S., Munk A., Brown N. A., Buckingham M. E. Atrial myocardium derives from the posterior region of the second heart field, which acquires left-right identity as Pitx2c is expressed // *Development*. – 2008. – V. 135. – № 6. – P. 1157–1167.
92. Garcia-Frigola C., Shi Y., Evans S. M. Expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel HCN4 during mouse heart development // *Gene Expr Patterns*. –

2003. – V. 3. – № 6. – P. 777–783.

93. Garcia-Frigola C., Shi Y., Evans S. M. Expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel HCN4 during mouse heart development // *Gene Expression Patterns*. – 2003. – V. 3. – № 6. – P. 777–783.

94. Gauthier C., Tavernier G., Charpentier F., Langin D., Marec H. Le Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. // *The Journal of clinical investigation*. – 1996. – V. 98. – № 2. – P. 556–562.

95. Gittenberger-de Groot A. C., Bartelings M. M., Poelmann R. E., Haak M. C., Jongbloed M. R. M. Embryology of the heart and its impact on understanding fetal and neonatal heart disease // *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. – 2013. – V. 18. – № 5. – P. 237–244.

96. Gourdie R. G., Green C. R., Severs N. J., Thompson R. P. Immunolabelling patterns of gap junction connexins in the developing and mature rat heart // *Anatomy and Embryology*. – 1992. – V. 185. – № 4. – P. 363–378.

97. Groot N. M. S. de, Houben R. P. M., Smeets J. L., Boersma E., Schotten U., Schalij M. J., Crijns H., Allessie M. A. Electropathological Substrate of Longstanding Persistent Atrial Fibrillation in Patients With Structural Heart Disease // *Circulation*. – 2010. – V. 122. – № 17. – P. 1674–1682.

98. Haissaguerre M., Gencel L., Fischer B., Metayer P. L. E., Poquet F., Marcus F. I., D J. C. M. Successful Catheter Ablation of Atrial Fibrillation // *Journal of cardiovascular electrophysiology*. – 1994. – V. 5. – P. 1045–1052.

99. Haissaguerre M., Jais P., Shah D. C., Takahashi A., Hocini M., Quiniou G., Garrigue S., Mouroux A. Le, Metayer P. Le, Clementy J. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins // *The New England Journal of Medicine*. – 1998. – V. 339. – P. 659–666.

100. Halpern M. H. Extracoronary cardiac veins in the rat // *American Journal of Anatomy*. – 1953. – V. 92. – № 2. – P. 307–327.

101. Halpern M. H. The azygos vein system in the rat // *The Anatomical Record*. – 1953. – V. 116. – № 1. – P. 83–93.

102. Hasan W. Autonomic cardiac innervation // *Organogenesis*. – 2013. – V. 9. – № 3. – P. 176–193.

103. Hasan W. Autonomic cardiac innervation // *Organogenesis*. – 2013. – V. 9. – № 3. – P. 176–193.

104. Hashizume H., Ushiki T., Abe K. A histological study of the cardiac muscle of the human superior and inferior vena cavae // *Arch Histol Cytol*. – 1995. – V. 58. – № 4. – P. 457–464.

105. Hew K. W., Keller K. A. Postnatal Anatomical and Functional Development of the Heart :

- A Species Comparison // Birth Defects Research (Part B). – 2003. – V. 68. – P. 309–320.
106. Hibino H., Inanobe A., Furutani K., Murakami S., Findlay I., Kurachi Y. Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles // Physiology Reviews. – 2010. – V. 90. – P. 291–366.
107. Higuchi K., Yamauchi Y., Hirao K., Sasaki T., Hachiya H., Sekiguchi Y., Nitta J., Isobe M. Superior vena cava as initiator of atrial fibrillation: Factors related to its arrhythmogenicity // Heart Rhythm. – 2010. – V. 7. – № 9. – P. 1186–1191.
108. Hildreth V., Anderson R. H., Henderson D. J. Autonomic innervation of the developing heart: Origins and function // Clinical Anatomy. – 2009. – V. 22. – № 1. – P. 36–46.
109. Hildreth V., Anderson R. H., Henderson D. J. Autonomic innervation of the developing heart: Origins and function // Clinical Anatomy. – 2009. – V. 22. – № 1. – P. 36–46.
110. Hoogaars W. M. ., Tessari A., Moorman A. F. ., Boer P. A. . de, Hagoort J., Soufan A. T., Campione M., Christoffels V. M. The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart // Cardiovascular Research. – 2004. – V. 62. – № 3. – P. 489–499.
111. Hoogaars W. M. H., Engel A., Brons J. F., Verkerk A. O., Lange F. J. De, Wong L. Y. E., Bakker M. L., Clout D. E., Wakker V., Barnett P., Ravesloot J. H., Moorman A. F. M., Verheijck E. E., Christoffels V. M. Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria // Genes and Development. – 2007. – V. 21. – № 9. – P. 1098–1112.
112. Hoyt R. H., Cohen M. L., Corr P. B., Saffitz J. E. Alterations of intercellular junctions induced by hypoxia in canine myocardium // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. – 1990. – V. 258. – № 5. – P. H1439–H1448.
113. Hoyt R. H., Cohen M. L., Saffitz J. E. Distribution and three-dimensional structure of intercellular junctions in canine myocardium. // Circulation Research. – 1989. – V. 64. – № 3. – P. 563–574.
114. Huang M.-H., Bahl J. J., Wu Y., Hu F., Larson D. F., Roeske W. R., Ewy G. A. Neuroendocrine properties of intrinsic cardiac adrenergic cells in fetal rat heart // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. – 2005. – V. 288. – № 2. – P. H497–H503.
115. Ignarro L. J., Shideman F. E. Appearance and concentrations of catecholamines and their biosynthesis in the embryonic and developing chick // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 1968. – V. 159. – № 1. – P. 38 LP – 48.
116. Ino T., Miyamoto S., Ohno T., Tadera T. Exit block of focal repetitive activity in the superior vena cava masquerading as a high right atrial tachycardia // Journal of cardiovascular

electrophysiology. – 2000. – V. 11. – № 4. – P. 480–3.

117. Irisawa H., Brown H. F., Giles W. Cardiac pacemaking in the sinoatrial node // *Physiological Reviews*. – 1993. – V. 73. – № 1. – P. 197–227.

118. Ito M., Arita M., Saeki K., Tanoue M. Functional properties of sinocaval conduction // *The Japanese Journal of Physiology*. – 1967. – V. 17. – P. 174–189.

119. Ito M., Arita M., Saeki K., Tanoue M. Functional properties of sinocaval conduction // *The Japanese Journal of Physiology*. – 1967. – V. 17. – P. 174–189.

120. Ito M., Yanaga T., Saeki K., Arita M., Ishihara M., Mashiba H. Studies on sino-caval conduction of the rabbit with microelectrodes // *The Japanese Journal of Physiology*. – 1964. – V. 14. – P. 439–449.

121. 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 α 1-adrenergic receptor-induced proarrhythmicity in the caval vein myocardium // *Acta Physiologica*. – 2020. – № March. – P. 1–17.

122. 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.

123. Ivanova A. D., Samoiloova 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. – P. 1493–1503.

124. Iwasaki Y. K., Nishida K., Kato T., Nattel S. Atrial fibrillation pathophysiology: Implications for management // *Circulation*. – 2011. – V. 124. – № 20. – P. 2264–2274.

125. Janes R. D., Brandys J. C., Hopkins D. A., Johnstone D. E., Murphy D. A., Armour J. A. Anatomy of Human Extrinsic Cardiac Nerves and Ganglia // *American Journal of Cardiology*. – 1986. – V. 57. – P. 299–309.

126. Jensen B. C., Swigart P. M., Laden M.-E., DeMarco T., Hoopes C., Simpson P. C. The Alpha-1D Is the Predominant Alpha-1-Adrenergic Receptor Subtype in Human Epicardial Coronary Arteries // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2009. – V. 54. – № 13. – P. 1137–1145.

127. Jensen C. F., Bartels E. D., Braunstein T. H., Nielsen L. B., Holstein-Rathlou N. H., Axelsen L. N., Nielsen M. S. Acute intramyocardial lipid accumulation in rats does not slow cardiac conduction per se // *Physiological reports*. – 2019. – V. 7. – № 7. – P. e14049.

128. Jimenez-Lopez J., Vallès E., Benito B., Martí-Almor J. Insights of the superior vena cava conduction properties: A 3-D high resolution mapping case of typical flutter // *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. – 2017. – № September. – P. 2–3.

129. Johnson E. M., O'Brien F., Werbit R. Modification and characterization of the permanent sympathectomy produced by the administration of guanethidine to newborn rats // *European Journal of Pharmacology*. – 1976. – V. 37. – № 1. – P. 45–54.
130. Kannel W. B., Abbott R. D., Savage D. D., McNamara P. M. Epidemiologic features of chronic atrial fibrillation: the Framingham study // *New England Journal of Medicine*. – 1982. – V. 306. – № 17. – P. 1018–1022.
131. Kass R. S., Wiegers S. E. The ionic basis of concentration-related effects of noradrenaline on the action potential of calf cardiac purkinje fibres. // *The Journal of Physiology*. – 1982. – V. 322. – № 1. – P. 541–558.
132. Kato R., Lickfett L., Meininger G., Dickfeld T., Wu R., Juang G., Angkeow P., LaCorte J., Bluemke D., Berger R., Halperin H. R., Calkins H. Pulmonary vein anatomy in patients undergoing catheter ablation of atrial fibrillation: Lessons learned by use of magnetic resonance imaging // *Circulation*. – 2003. – V. 107. – № 15. – P. 2004–2010.
133. Kawashima T. The autonomic nervous system of the human heart with special reference to its origin, course, and peripheral distribution // *Anatomy and embryology*. – 2005. – V. 209. – № 6. – P. 425–438.
134. Kawashima T. The autonomic nervous system of the human heart with special reference to its origin, course, and peripheral distribution // *Anatomy and Embryology*. – 2005. – V. 209. – № 6. – P. 425–438.
135. Kelly R. G., Brown N. A., Buckingham M. E. The Arterial Pole of the Mouse Heart Forms from Fgf10-Expressing Cells in Pharyngeal Mesoderm // *Developmental Cell*. – 2001. – V. 1. – № 3. – P. 435–440.
136. Kléber A. G., Rudy Y. Basic Mechanisms of Cardiac Impulse Propagation and Associated Arrhythmias // *Physiological Reviews*. – 2004. – V. 84. – № 2. – P. 431–488.
137. Koumi S., Backer I. I. C. L., Arentzen C. E., Sato R. β -Adrenergic Modulation of the Inwardly Rectifying Potassium Channel in Isolated Human Ventricular Myocytes. Alteration in Channel Response to β -Adrenergic Stimulation in Failing Human Hearts // *Journal of Clinical Investigation*. – 1995. – V. 96. – P. 2870–2881.
138. Koumi S., Wasserstrom J. A., Eick R. E. Ten Beta-adrenergic and cholinergic modulation of inward rectifier K⁺ channel function and phosphorylation in guinea-pig ventricle. // *The Journal of Physiology*. – 1995. – V. 486. – № 3. – P. 661–678.
139. Kreuzberg M. M., Willecke K., Bukauskas F. F. Connexin-Mediated Cardiac Impulse Propagation: Connexin 30.2 Slows Atrioventricular Conduction in Mouse Heart // *Trends Cardiovasc Med*. – 2006. – V. 16. – № 8. – P. 266–272.
140. Kucera J. P., Rohr S., Rudy Y. Localization of Sodium Channels in Intercalated Disks

- Modulates Cardiac Conduction // *Circ Res.* – 2002. – V. 91. – № 12. – P. 1176–1182.
141. Kugler S., Nagy N., Rácz G., Tőkés A. M., Dorogi B., Nemeskéri Á. Presence of cardiomyocytes exhibiting Purkinje-type morphology and prominent connexin45 immunoreactivity in the myocardial sleeves of cardiac veins // *Heart Rhythm.* – 2018. – V. 15. – № 2. – P. 258–264.
142. Kuzmin V. S., Egorov Y. V., Karimova V. M., Rosenshtraukh A. L. V Evaluation of the Length Constant in the Atrial Myocardium and Pulmonary Vein Myocardium in Mammals // *Doklady Biological Sciences.* – 2015. – V. 460. – P. 8–11.
143. Kwong K. F., Schuessler R. B., Green K. G., Laing J. G., Beyer E. C., Boineau J. P., Saffitz J. E. Differential Expression of Gap Junction Proteins in the Canine Sinus Node // *Circulation Research.* – 1998. – V. 82. – № 5. – P. 604–612.
144. Lacomis J., Goitein O., Deible C., MD P., Schwartzman D. CT of the Pulmonary Veins. // *J Thorac Imaging.* – 2007. – V. 22. – № 1. – P. 63–76.
145. Lakatta E. G., DiFrancesco D. What keeps us ticking, a funny current, a Calcium clock, or both? // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* – 2009. – V. 47. – № 2. – P. 157–170.
146. Lakatta E. G., Maltsev V. A., Vinogradova T. M. A coupled SYSTEM of intracellular Ca²⁺ clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker // *Circulation Research.* – 2010. – V. 106. – № 4. – P. 659–673.
147. Lakatta E. G., Maltsev V. A., Vinogradova T. M. A Coupled SYSTEM of Intracellular Ca²⁺ Clocks and Surface Membrane Voltage Clocks Controls the Timekeeping Mechanism of the Heart's Pacemaker // *Circulation Research.* – 2010. – V. 106. – № 4. – P. 659–673.
148. Latek D., Modzelewska A., Trzaskowski B., Palczewski K., Filipek, Sławomir G protein-coupled receptors — recent advances // *Acta biochimica Polonica.* – 2012. – V. 59. – № 4. – P. 515–529.
149. Lebowitz E. a, Novick J. S., Rudolph A. M. Development of myocardial sympathetic innervation in the fetal lamb. // *Pediatric research.* – 1972. – V. 6. – № 12. – P. 887–93.
150. Li F., Wang X., Capasso J. M., Gerdes A. M. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* – 1996. – V. 28. – № 8. – P. 1737–1746.
151. Li K., He H., Li C., Sirois P., Rouleau J. L. Myocardial α 1-adrenoceptor: Inotropic effect and physiologic and pathologic implications // *Life Sciences.* – 1997. – V. 60. – № 16. – P. 1305–1318.
152. Li Q., Lau A., Morris T. J., Guo L., Fordyce C. B., Stanley E. F. A Syntaxin 1, G_o, and N-Type Calcium Channel Complex at a Presynaptic Nerve Terminal: Analysis by Quantitative Immunocolocalization // *Journal of Neuroscience.* – 2004. – V. 24. – № 16. – P. 4070–4081.

153. Liang Q., Wiese R. J., Bueno O. F., Dai Y.-S., Markham B. E., Molkenin J. D. The Transcription Factor GATA4 Is Activated by Extracellular Signal-Regulated Kinase 1- and 2-Mediated Phosphorylation of Serine 105 in Cardiomyocytes // *Molecular and Cellular Biology*. – 2001. – V. 21. – № 21. – P. 7460–7469.
154. Liang X., Wang G., Lin L., Lowe J., Zhang Q., Bu L., Chen Y., Chen J., Sun Y., Evans S. M. HCN4 Dynamically Marks the First Heart Field and Conduction System Precursors // *Circulation Research*. – 2013. – V. 113. – № 4. – P. 399–407.
155. Lim Y. M., Uhm J. S., Pak H. N. Focal Atrial Tachycardia Arising from the Inferior Vena Cava. // *Yonsei medical journal*. 2017. T. 58. № 4. C. 884–887.
156. Lin W. S., Tai C. T., Hsieh M. H., Tsai C. F., Lin Y. K., Tsao H. M., Huang J. L., Yu W. C., Yang S. P., Ding Y. A., Chang M. S., Chen S. A. Catheter ablation of paroxysmal atrial fibrillation initiated by non-pulmonary vein ectopy // *Circulation*. – 2003. – V. 107. – № 25. – P. 3176–3183.
157. Lindvall O., Björklund A. The glyoxylic acid fluorescence histochemical method: a detailed account of the methodology for the visualization of central catecholamine neurons // *Histochemistry*. – 1974. – V. 39. – № 2. – P. 97–127.
158. Linkert M., Rueden C. T., Allan C., Burel J.-M., Moore W., Patterson A., Loranger B., Moore J., Neves C., MacDonald D., Tarkowska A., Sticco C., Hill E., Rossner M., Eliceiri K. W., Swedlow J. R. Metadata matters: access to image data in the real world // *Journal of Cell Biology*. – 2010. – V. 189. – № 5. – P. 777–782.
159. 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 // *International Journal of Cardiology*. – 2019. – V. 287. – P. 181–188.
160. Lipp J. A. M., Rudolph A. M. Sympathetic Nerve Development in the Rat and Guinea-Pig Heart // *Biol. Neonate*. – 1972. – V. 21. – P. 76–82.
161. Liu J., Dobrzynski H., Yanni J., Boyett M. R., Lei M. Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels // *Cardiovascular Research*. – 2007. – V. 73. – № 4. – P. 729–738.
162. Lopatin A. N., Nichols C. G. Inward rectifiers in the heart: an update on IK1 // *Journal of molecular and cellular cardiology*. – 2001. – V. 33. – № 4. – P. 625–638.
163. Lopez I., Mak E. C., Ding J., Hamm H. E., Lomasney J. W. A Novel Bifunctional Phospholipase C That Is Regulated by Gα12 and Stimulates the Ras/Mitogen-activated Protein Kinase Pathway // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – V. 276. – № 4. – P. 2758–2765.
164. Lou Q., Belevych A. E., Radwański P. B., Liu B., Kalyanasundaram A., Knollmann B. C., Fedorov V. V., Györke S. Alternating membrane potential/calcium interplay underlies repetitive

- focal activity in a genetic model of calcium-dependent atrial arrhythmias // *The Journal of Physiology*. – 2015. – V. 593. – № 6. – P. 1443–1458.
165. Lu T.-M., Tai C.-T., Hsieh M.-H., Tsai C.-F., Lin Y.-K., Yu W.-C., Tsao H.-M., Lee S.-H., Ding Y.-A., Chang M.-S., Chen S.-A. Electrophysiologic characteristics in initiation of paroxysmal atrial fibrillation from a focal area // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2001. – V. 37. – № 6. – P. 1658–1664.
166. Ludatscher R. M. Fine structure of the muscular wall of rat pulmonary veins // *Journal of anatomy*. – 1968. – V. 103. – № 2. – P. 345–357.
167. M. S. R., Yoram R. Ionic Mechanisms of Propagation in Cardiac Tissue // *Circulation Research*. – 1997. – V. 81. – № 5. – P. 727–741.
168. Ma Q., Zhou B., Pu W. T. Reassessment of Isl1 and Nkx2-5 cardiac fate maps using a Gata4-based reporter of Cre activity // *Developmental Biology*. – 2008. – V. 323. – № 1. – P. 98–104.
169. MacLennan D. H., Chen S. R. W. Store overload-induced Ca²⁺ release as a triggering mechanism for CPVT and MH episodes caused by mutations in RYR and CASQ genes // *The Journal of Physiology*. – 2009. – V. 587. – № 13. – P. 3113–3115.
170. MacLeod D. P., Hunter E. G. The pharmacology of the cardiac muscle of the great veins of the rat // *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. – 1967. – V. 45. – P. 463–473.
171. Mahida S. Transcription factors and atrial fibrillation // *Cardiovascular Research*. – 2014. – V. 101. – № 2. – P. 194–202.
172. Maier S. K. G., Westenbroek R. E., Schenkman K. A., Feigl E. O., Scheuer T., Catterall W. A. An unexpected role for brain-type sodium channels in coupling of cell surface depolarization to contraction in the heart // *PNAS*. – 2002. – V. 99. – № 6. – P. 4073–4078.
173. 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 // *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. – 2015. – V. 26. – № 3. – P. 311–319.
174. Maltsev V. A., Vinogradova T. M., Bogdanov K. Y., Lakatta E. G., Stern M. D. Diastolic Calcium Release Controls the Beating Rate of Rabbit Sinoatrial Node Cells: Numerical Modeling of the Coupling Process // *Biophysical Journal*. – 2004. – V. 86. – № 4. – P. 2596–2605.
175. Mansour M., Ruskin J., Keane D. Initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating from the ostium of the inferior vena cava // *Journal of cardiovascular electrophysiology*. – 2002. – V. 13. – № 12. – P. 1292–1295.
176. Maruyama M., Ino T., Miyamoto S., Tadera T., Atarashi H., Kishida H. Characteristics of the electrical activity within the persistent left superior vena cava: Comparative view with

reference to the ligament of Marshall // *Journal of Electrocardiology*. – 2003. – V. 36. – № 1. – P. 53–57.

177. Marvin W., Hermsmeyer K., McDonald R., Roskoski L., Roskoski R. Ontogenesis of Cholinergic Innervation in the Rat Heart // *Circulation Research*. – 1980. – V. 46. – P. 690–695.

178. Marx S. O., Reiken S., Hisamatsu Y., Jayaraman T., Burkhoff D., Rosemblyt N., Marks A. R. PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12.6 from the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) // *Cell*. – 2000. – V. 101. – № 4. – P. 365–376.

179. Mays D. J., Foose J. M., Philipson L. H., Tamkun M. M. Localization of the Kv1.5 K⁺ channel protein in explanted cardiac tissue. // *Journal of Clinical Investigation*. – 1995. – V. 96. – № 1. – P. 282–292.

180. Metz L. D., Seidler F. J., McCook E. C., Slotkin T. A. Cardiac α -adrenergic receptor expression is regulated by thyroid hormone during a critical developmental period // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 1996. – V. 28. – № 5. – P. 1033–1044.

181. Milstein M. L., Musa H., Balbuena D. P., Anumonwo J. M. B., Auerbach D. S., Furspan P. B., Hou L., Hu B., Schumacher S. M., Vaidyanathan R., Martens J. R., Jalife J. Dynamic reciprocity of sodium and potassium channel expression in a macromolecular complex controls cardiac excitability and arrhythmia // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – V. 109. – № 31.

182. Minatoguchi S., Ito H., Ishimura K., Watanabe H., Imai Y., Koshiji M., Asano K., Hirakawa S., Fujiwara H. Modulation of noradrenaline release through presynaptic α_2 -adrenoceptors in congestive heart failure // *American heart journal*. – 1995. – V. 130. – № 3. – P. 516–521.

183. Miyagishima Y. Catecholamine in the myocardium; a fluorescence histochemical study. // *Japanese circulation journal*. – 1975. – V. 39. – № 3. – P. 357–375.

184. Miyazaki S., Takigawa M., Kusa S., Kuwahara T., Taniguchi H., Okubo K., Nakamura H., Hachiya H., Hirao K., Takahashi A., Iesaka Y. Role of arrhythmogenic superior vena cava on atrial fibrillation // *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. – 2014. – V. 25. – № 4. – P. 380–386.

185. Mommersteeg M. T. M., Hoogaars W. M. H., Prall O. W. J., Gier-De Vries C. De, Wiese C., Clout D. E. W., Papaioannou V. E., Brown N. A., Harvey R. P., Moorman A. F. M., Christoffels V. M. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node // *Circulation Research*. – 2007. – V. 100. – № 3. – P. 354–362.

186. Monfredi O., Dobrzynski H., Mondal T., Boyett M. R., Morris G. M. The anatomy and physiology of the sinoatrial node-A contemporary review // *PACE - Pacing and Clinical*

- Electrophysiology. – 2010. – V. 33. – № 11. – P. 1392–1406.
187. Moorman A. F. M., Anderson R. H. Development of the pulmonary vein // *International Journal of Cardiology*. – 2011. – V. 147. – № 1. – P. 182.
188. Moorman A. F. M., Christoffels V. M. Cardiac Chamber Formation: Development, Genes, and Evolution // *Physiological Reviews*. – 2003. – V. 83. – № 4. – P. 1223–1267.
189. Mueller-Hoecker J., Beitinger F., Fernandez B., Bahlmann O., Assmann G., Troidl C., Dimomeletis I., Kaab S., Deindl E. Of rodents and humans: A light microscopic and ultrastructural study on cardiomyocytes in pulmonary veins // *International Journal of Medical Sciences*. – 2008. – V. 5. – № 3. – P. 152–158.
190. Mueller G. C., Lu J. C., Mahani M. G., Dorfman A. L., Agarwal P. P. MR Imaging of Thoracic Veins // *Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America*. – 2015. – V. 23. – № 2. – P. 293–307.
191. Mukamal K. J., Tolstrup J. S., Friberg J., Jensen G., Grønbaek M. Alcohol Consumption and Risk of Atrial Fibrillation in Men and Women // *Circulation*. – 2005. – V. 112. – № 12. – P. 1736–1742.
192. Nakayama T., Kurachi Y., Noma A., Irisawa H. Action potential and membrane currents of single pacemaker cells of the rabbit heart // *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. – 1984. – V. 402. – № 3. – P. 248–257.
193. Natarajan A. R., Rong Q., Katchman A. N., Ebert S. N. Intrinsic Cardiac Catecholamines Help Maintain Beating Activity in Neonatal Rat Cardiomyocyte Cultures // *Pediatric Research*. – 2004. – V. 56. – № 3. – P. 411–417.
194. Nathan H., Eliakim M. The Junction Between the Left Atrium and the Pulmonary Veins. An Anatomic Study of Human Hearts // *Circulation*. – 1966. – V. 34. – № September. – P. 412–422.
195. Nathan H., Gloobe H. Myocardial atrio-venous junctions and extensions (sleeves) over the pulmonary and caval veins. Anatomical observations in various mammals. // *Thorax*. – 1970. – V. 25. – № 3. – P. 317–324.
196. Nathan H., Gloobe H. Myocardial atrio-venous junctions and extensions (sleeves) over the pulmonary and caval veins Anatomical observations in various mammals // *Thorax*. – 1970. – V. 25. – № 3. – P. 317–324.
197. Nattel S. From Guidelines to Bench: Implications of Unresolved Clinical Issues for Basic Investigations of Atrial Fibrillation Mechanisms // *Canadian Journal of Cardiology*. – 2011. – V. 27. – № 1. – P. 19–26.
198. Nattel S., Burstein B., Dobrev D. Atrial Remodeling and Atrial Fibrillation // *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. – 2008. – V. 1. – № 1. – P. 62–73.

199. Nattel S., Dobrev D. The multidimensional role of calcium in atrial fibrillation pathophysiology: mechanistic insights and therapeutic opportunities // *European Heart Journal*. – 2012. – V. 33. – № 15. – P. 1870–1877.
200. Nielsen M. S., Nygaard Axelsen L., Sorgen P. L., Verma V., Delmar M., Holstein-Rathlou N. Gap Junctions Wiley, 2012.C. 1981–2035.
201. Noble D. The surprising heart: a review of recent progress in cardiac electrophysiology. // *The Journal of Physiology*. – 1984. – V. 353. – № 1. – P. 1–50.
202. Noguchi A., Whitsett J. A. Ontogeny of α 1-adrenergic receptors in the rat myocardium: Effects of hypothyroidism // *European Journal of Pharmacology*. – 1982. – V. 86. – № 1. – P. 43–50.
203. Noguchi A., Whitsett J. A., Dickmann L. Ontogeny of myocardial α 1-adrenergic receptor in the rat // *Developmental Pharmacology and Therapeutics*. – 1981. – V. 3. – № 3. – P. 179–188.
204. Noma A., Nakayama T., Kurachi Y., Irisawa H. Resting K conductances in pacemaker and non-pacemaker heart cells of the rabbit // *The Japanese journal of physiology*. – 1984. – V. 34. – № 2. – P. 245–254.
205. O’Connell T. D., Ishizaka S., Nakamura A., Swigart P. M., Rodrigo M. C., Simpson G. L., Cotecchia S., Rokosh D. G., Grossman W., Foster E., Simpson P. C. The α 1A/C- and α 1B-adrenergic receptors are required for physiological cardiac hypertrophy in the double-knockout mouse // *Journal of Clinical Investigation*. – 2003. – V. 111. – № 11. – P. 1783–1791.
206. O’Connell T. D., Jensen B. C., Baker A. J., Simpson P. C. Cardiac Alpha1-Adrenergic Receptors: Novel Aspects of Expression, Signaling Mechanisms, Physiologic Function, and Clinical Importance // *Pharmacological Reviews*. – 2014. – V. 66. – № 1. – P. 308–333.
207. 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 // *Pharmacological Reviews*. – 2014. – V. 66. – № 1. – P. 308–333.
208. Okamoto Y., Kawamura K., Nakamura Y., Ono K. Pathological impact of hyperpolarization-activated chloride current peculiar to rat pulmonary vein cardiomyocytes // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2014. – V. 66. – P. 53–62.
209. Olsen K. B., Axelsen L. N., Braunstein T. H., Sørensen C. M., Andersen C. B., Ploug T., Holstein-Rathlou N. H., Nielsen M. S. Myocardial impulse propagation is impaired in right ventricular tissue of Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats // *Cardiovascular Diabetology*. – 2013. – V. 12. – № 1. – P. 1–11.
210. Ooie T., Tsuchiya T., Ashikaga K., Takahashi N. Electrical connection between the right atrium and the superior vena cava, and the extent of myocardial sleeve in a patient with atrial

- fibrillation originating from the superior vena cava // *J Cardiovasc Electrophysiol.* – 2002. – V. 13. – № 5. – P. 482–485.
211. Pappano A. J. Development of Cholinergic Neuroeffector Transmission in the Avian Heart Implications for Regulatory Mechanisms // *Ann N Y Acad Sci.* – 1990. – V. 588. – P. 131–6.
212. Parker J. D., Newton G. E., Landzberg J. S., Floras J. S., Colucci W. S. Functional significance of presynaptic α -adrenergic receptors in failing and nonfailing human left ventricle // *Circulation.* – 1995. – V. 92. – № 7. – P. 1793–1800.
213. Patten B. M. Initiation and early changes in the character of the heart beat in vertebrate embryos // *Physiological Reviews.* – 1949. – V. 29. – № 1. – P. 31–47.
214. Patterson E., Po S. S., Scherlag B. J., Lazzara R. Triggered firing in pulmonary veins initiated by in vitro autonomic nerve stimulation // *Heart Rhythm.* – 2005. – V. 2. – № 6. – P. 624–631.
215. Pauza D. H., Skripka V., Pauziene N., Stropus R. Morphology, distribution, and variability of the epicardiac neural ganglionated subplexuses in the human heart // *The Anatomical Record.* – 2000. – V. 259. – № 4. – P. 353–382.
216. Peters N. S. Myocardial gap junction organization in ischemia and infarction // *Microscopy Research and Technique.* – 1995. – V. 31. – № 5. – P. 375–386.
217. Peters N. S., Wit A. L. Gap Junction Remodeling in Infarction: Does It Play a Role in Arrhythmogenesis? // *Journal of Cardiovascular Electrophysiology.* – 2000. – V. 11. – № 4. – P. 488–490.
218. Philpott S. Atrial Fibrillation // *Journal of Arrhythmia.* – 2019. – V. 35. – № S1. – P. 76–327.
219. Pierpont G. L., DeMaster E. G., Reynolds S., Pederson J., Cohn J. N. Ventricular myocardial catecholamines in primates // *Translational Research.* – 1985. – V. 106. – № 2. – P. 205–210.
220. Pucéat M., Vassort G. Signalling by protein kinase C isoforms in the heart // *Molecular and cellular biochemistry.* – 1996. – V. 157. – № 1–2. – P. 65–72.
221. Riemann B., Schäfers M., Law M. P., Wichter T., Schober O. Radioligands for imaging myocardial α - and β -adrenoceptors // *Nuklearmedizin.* – 2003. – V. 42. – № 01. – P. 4–9.
222. Robinson R. B., LIU Q., Rosen M. R. Ionic basis for action potential prolongation by phenylephrine in canine epicardial myocytes // *Journal of cardiovascular electrophysiology.* – 2000. – V. 11. – № 1. – P. 70–76.
223. Rodefeld M. D., Beau S. L., Schuessler R. B., Boineau J. P., Saffitz J. E. Beta-adrenergic and muscarinic cholinergic receptor densities in the human sinoatrial node: identification of a high beta 2-adrenergic receptor density // *Journal of Cardiovascular Electrophysiology.* – 1996.

– V. 7. – № 11. – P. 1039–1049.

224. Rodríguez-Sinovas A., Sánchez J. A., Valls-Lacalle L., Consegal M., Ferreira-González I. Connexins in the heart: Regulation, function and involvement in cardiac disease // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – V. 22. – № 9.

225. Rohr S., Kucera J. P., Kléber A. G., Rohr S., Kucera J. P., Kle G. Slow Conduction in Cardiac Tissue, I: Effects of a Reduction of Excitability Versus a Reduction of Electrical Coupling on Microconduction // *Circulation Research*. – 1998. – V. 83. – P. 781–794.

226. Rokosh D. G., Simpson P. C. Knockout of the $\alpha 1A/C$ -adrenergic receptor subtype: The $\alpha 1A/C$ is expressed in resistance arteries and is required to maintain arterial blood pressure // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – V. 99. – № 14. – P. 9474–9479.

227. Rump L. C., Bohmann C., Schaible U., Schöllhorn J., Limberger N. $\alpha 2c$ -Adrenoceptor-modulated release of noradrenaline in human right atrium // *British journal of pharmacology*. – 1995. – V. 116. – № 6. – P. 2617–2624.

228. Rump L. C., Riera-Knorrenschild G., Schwertfeger E., Bohmann C., Spillner G., Schollmeyer P. Dopaminergic and alpha-adrenergic control of neurotransmission in human right atrium. // *Journal of cardiovascular pharmacology*. – 1995. – V. 26. – № 3. – P. 462–470.

229. Rybin V. O., Xu X., Lisanti M. P., Steinberg S. F. Differential Targeting of β -Adrenergic Receptor Subtypes and Adenylyl Cyclase to Cardiomyocyte Caveolae // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – V. 275. – № 52. – P. 41447–41457.

230. Rybin V. O., Xu X., Steinberg S. F. Activated Protein Kinase C Isoforms Target to Cardiomyocyte Caveolae // *Circulation Research*. – 1999. – V. 84. – № 9. – P. 980–988.

231. Saffitz J. E., Kanter H. L., Green K. G., Tolley T. K., Beyer E. C. Tissue-specific determinants of anisotropic conduction velocity in canine atrial and ventricular myocardium. // *Circulation Research*. – 1994. – V. 74. – № 6. – P. 1065–1070.

232. Saito T., Waki K., Becker a E. Left atrial myocardial extension onto pulmonary veins in humans: anatomic observations relevant for atrial arrhythmias // *Journal of cardiovascular electrophysiology*. – 2000. – V. 11. – № 8. – P. 888–894.

233. Sánchez-Chapula J. A., Salinas-Stefanon E., Torres-Jácome J., Benavides-Haro D. E., Navarro-Polanco R. A. Blockade of currents by the antimalarial drug chloroquine in feline ventricular myocytes // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2001. – V. 297. – № 1. – P. 437–445.

234. Sathyanesan A., Ogura T., Lin W. Automated measurement of nerve fiber density using line intensity scan analysis // *Journal of Neuroscience Methods*. – 2012. – V. 206. – № 2. – P. 165–175.

235. Satoh H. Effects of ATP-sensitive K^+ channel openers on pacemaker activity in isolated

- single rabbit sino-atrial node cells. // *Journal of cardiovascular pharmacology*. – 1993. – V. 22. – № 6. – P. 863–868.
236. Satoh H. Role of T-type Ca²⁺ channel inhibitors in the pacemaker depolarization in rabbit sino-atrial nodal cells // *General Pharmacology: The Vascular System*. – 1995. – V. 26. – № 3. – P. 581–587.
237. Satoh H. Sino-atrial nodal cells of mammalian hearts: ionic currents and gene expression of pacemaker ionic channels. // *Journal of smooth muscle research*. – 2003. – V. 39. – № 5. – P. 175–193.
238. SATOH T., ZIPES D. P. Cesium-Induced Atrial Tachycardia Degenerating into Atrial Fibrillation in Dogs: Atrial Torsades de Pointes? // *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. – 1998. – V. 9. – № 9. – P. 970–975.
239. Schaffer W., Williams R. S. Age-dependent changes in expression of alpha1-adrenergic receptors in rat myocardium // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1986. – V. 138. – № 1. – P. 387–391.
240. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.-Y., White D. J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis // *Nature Methods*. – 2012. – V. 9. – № 7. – P. 676–682.
241. Schlüter K.-D., Piper H. M. Regulation of growth in the adult cardiomyocytes // *The FASEB journal*. – 1999. – V. 13. – № 9001. – P. S17–S22.
242. Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // *Nature Methods*. – 2012. – V. 9. – № 7. – P. 671–675.
243. Schoonderwoerd B. A., Smit M. D., Pen L., Gelder I. C. Van New risk factors for atrial fibrillation: causes of “not-so-lone atrial fibrillation” // *Europace*. – 2008. – V. 10. – № 6. – P. 668–673.
244. Shah D. C., Haissaguerre M., Jais P., Clementy J. High-resolution mapping of tachycardia originating from the superior vena cava: evidence of electrical heterogeneity, slow conduction, and possible circus movement reentry. // *Journal of cardiovascular electrophysiology*. – 2002. – V. 13. – № 4. – P. 388–392.
245. Sharma S. P., Sangha R. S., Dahal K., Krishnamoorthy P. The role of empiric superior vena cava isolation in atrial fibrillation: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology*. – 2017. – V. 48. – № 1. – P. 61–67.
246. Shen H., Peri K. G., Deng X. F., Chemtob S., Varma D. R. Distribution of α 1-adrenoceptor subtype proteins in different tissues of neonatal and adult rats // *Canadian Journal of Physiology*

- and Pharmacology. – 2000. – V. 78. – № 3. – P. 237–243.
247. Shinagawa Y., Satoh H., Noma A. The sustained inward current and inward rectifier K⁺ current in pacemaker cells dissociated from rat sinoatrial node // *The Journal of Physiology*. – 2000. – V. 523. – № 3. – P. 593–605.
248. Sicouri S., Blazek J., Belardinelli L., Antzelevitch C. Electrophysiological characteristics of canine superior vena cava sleeve preparations. Effect of ranolazine // *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. – 2012. – V. 5. – № 2. – P. 371–379.
249. Simpson P. Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response. // *The Journal of clinical investigation*. – 1983. – V. 72. – № 2. – P. 732–738.
250. Singh R., Hoogaars W. M., Barnett P., Grieskamp T., Rana M. S., Buermans H., Farin H. F., Petry M., Heallen T., Martin J. F., Moorman A. F. M., 't Hoen P. A. C., Kispert A., Christoffels V. M. Tbx2 and Tbx3 induce atrioventricular myocardial development and endocardial cushion formation // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2012. – V. 69. – № 8. – P. 1377–1389.
251. Sissman N. J. Developmental landmarks in cardiac morphogenesis: Comparative chronology // *American Journal of Cardiology*. – 1970. – V. 25. – № 2. – P. 141–148.
252. Sizarov A., Anderson R. H., Christoffels V. M., Moorman A. F. M. Three-dimensional and molecular analysis of the venous pole of the developing human heart // *Circulation*. – 2010. – V. 122. – № 8. – P. 798–807.
253. Skeberdis V. A., Gendviliene V., Zablockaitene D., Treinys R., Macjianskiene R., Bogdelis A., Jurevicjus J., Fischmeister R. β_3 -adrenergic receptor activation increases human atrial tissue contractility and stimulates the L-type Ca²⁺ current // *Journal of Clinical Investigation*. – 2008.
254. Snabaitis A. K., Muntendorf A., Wieland T., Avkiran M. Regulation of the extracellular signal-regulated kinase pathway in adult myocardium: differential roles of G_{q/11}, G_i and G_{12/13} proteins in signalling by α_1 -adrenergic, endothelin-1 and thrombin-sensitive protease-activated receptors B // *Cellular signalling*. – 2005. – V. 17. – P. 655–664.
255. 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 // *Circulation Research*. – 2007. – V. 101. – № 10. – P. 971–974.
256. Spach M. S., Barr R. C., Jewett P. H. Spread of excitation from the atrium into thoracic veins in human beings and dogs // *The American Journal of Cardiology*. – 1972. – V. 30. – № 8. – P. 844–854.

257. Spach M. S., Dolber P. C., Heidlage J. F. Influence of the passive anisotropic properties on directional differences in propagation following modification of the sodium conductance in human atrial muscle. A model of reentry based on anisotropic discontinuous propagation // *Circulation research*. – 1988. – V. 62. – № 4. – P. 811–832.
258. Später D., Abramczuk M. K., Buac K., Zangi L., Stachel M. W., Clarke J., Sahara M., Ludwig A., Chien K. R. A HCN4⁺ cardiomyogenic progenitor derived from the first heart field and human pluripotent stem cells // *Nature Cell Biology*. – 2013. – V. 15. – № 9. – P. 1098–1106.
259. Stalsberg H., DeHaan R. L. The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo // *Developmental Biology*. – 1969. – V. 19. – № 2. – P. 128–159.
260. Steinberg S. F. Cardiac actions of protein kinase C isoforms // *Physiology*. – 2012. – V. 27. – № 3. – P. 130–139.
261. Stengl M., Ramakers C., Donker D. W., Nabar A., Rybin A. V., Spätjens R. L. H. M. G., Nagel T. van der, Wodzig W. K. W. H., 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 // *Cardiovascular Research*. – 2006. – V. 72. – № 1. – P. 90–100.
262. Stennard F. A., Costa M. W., Elliott D. A., Rankin S., Haast S. J. P., Lai D., McDonald L. P. A., Niederreither K., Dolle P., Bruneau B. G., Zorn A. M., Harvey R. P. Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2-5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart // *Developmental Biology*. – 2003. – V. 262. – № 2. – P. 206–224.
263. Stieda L. Ueber quergestreifte Muskelfasern in der Wand der Lungenvenen // *Archiv für mikroskopische Anatomie*. – 1877. – V. 14. – № 1. – P. 243–248.
264. Strosberg A. D. Structure and function of the β_3 -adrenergic receptor // *Annual review of pharmacology and toxicology*. – 1997. – V. 37. – № 1. – P. 421–450.
265. Sun C., Yu D., Ye W., Liu C., Gu S., Sinsheimer N. R., Song Z., Li X., Chen C., Song Y., Wang S., Schrader L., Chen Y. P. The short stature homeobox 2 (Shox2)-bone morphogenetic protein (BMP) pathway regulates dorsal mesenchymal protrusion development and its temporary function as a pacemaker during cardiogenesis // *Journal of Biological Chemistry*. – 2015. – V. 290. – № 4. – P. 2007–2023.
266. Tamargo J., Caballero R., Gómez R., Valenzuela C., Delpón E. Pharmacology of cardiac potassium channels // *Cardiovascular research*. – 2004. – V. 62. – № 1. – P. 9–33.
267. Tavernier G., Toumaniantz G., Erfanian M., Heymann M., Laurent K., Langin D., Gauthier C. β_3 -Adrenergic stimulation produces a decrease of cardiac contractility ex vivo in mice overexpressing the human β_3 -adrenergic receptor // *Cardiovascular Research*. – 2003. – V. 59.

– № 2. – P. 288–296.

268. Terzic A., Pucéat M., Vassort G., Vogel S. M. Cardiac alpha 1-adrenoceptors: an overview. // *Pharmacological Reviews*. – 1993. – V. 45. – № 2. – P. 147 LP – 175.

269. Thomas S. A., Matsumoto A. M., Palmiter R. D. Noradrenaline is essential for mouse fetal development // *Nature*. – 1995. – V. 374. – P. 643.

270. Tsai C.-F., Tai C.-T., Hsieh M.-H., Lin W.-S., Yu W.-C., Ueng K.-C., Ding Y.-A., Chang M.-S., Chen S.-A. Initiation of Atrial Fibrillation by Ectopic Beats Originating From the Superior Vena Cava Electrophysiological Characteristics and Results of Radiofrequency Ablation // *Circulation*. – 2000. – № 12. – P. 102:67–74.

271. Tsuneoka Y., Irie M., Tanaka Y., Sugimoto T. Permissive role of reduced inwardly-rectifying potassium current density in the automaticity of the guinea pig pulmonary vein myocardium // *Journal of Pharmacological Science*. – 2017. – V. 133. – № 4. – P. 195–202.

272. 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. 287–292.

273. Tucker D. C. Components of functional sympathetic control of heart rate in neonatal rats. // *The American journal of physiology*. – 1985. – V. 248. – № 5 Pt 2. – P. R601-10.

274. Tucker N. R., Ellinor P. T. Emerging Directions in the Genetics of Atrial Fibrillation // *Circulation Research*. – 2014. – V. 114. – № 9. – P. 1469–1482.

275. Vassalle M. Electrogenic suppression of automaticity in sheep and dog Purkinje fibers // *Circulation Research*. – 1970. – V. 27. – № 3. – P. 361–377.

276. 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 // *Cardiovascular Research*. – 2002. – V. 55. – № 4. – P. 727–738.

277. Vinogradova T. M., Lyashkov A. E., Zhu W., Ruknudin A. M., Sirenko S., Yang D., Deo S., Barlow M., Johnson S., Caffrey J. L., Zhou Y. Y., Xiao R. P., Cheng H., Stern M. D., Maltsev V. A., Lakatta E. G. High basal protein kinase A-dependent phosphorylation drives rhythmic internal Ca²⁺ store oscillations and spontaneous beating of cardiac pacemaker cells // *Circulation Research*. – 2006. – V. 98. – № 4. – P. 505–514.

278. Vinogradova T. M., Zhou Y. Y., Maltsev V., Lyashkov A., Stern M., Lakatta E. G. Rhythmic Ryanodine Receptor Ca²⁺ Releases during Diastolic Depolarization of Sinoatrial Pacemaker Cells Do Not Require Membrane Depolarization // *Circulation Research*. – 2004. – V. 94. – № 6. – P. 802–809.

279. Vogel S. M., Terzic A. α -Adrenergic regulation of action potentials in isolated rat cardiomyocytes // *European journal of pharmacology*. – 1989. – V. 164. – № 2. – P. 231–239.

280. Volders P. G. A. Probing the Contribution of IKs to Canine Ventricular Repolarization: Key Role for β -Adrenergic Receptor Stimulation // *Circulation*. – 2003. – V. 107. – P. 2753–2760.
281. Wahl-Schott C., Biel M. HCN channels: Structure, cellular regulation and physiological function // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2009. – V. 66. – № 3. – P. 470–494.
282. Wang L., Feng Z. P., Kondo C. S., Sheldon R. S., Duff H. J. Developmental changes in the delayed rectifier K⁺ channels in mouse heart // *Circulation Research*. 1996. T. 79. № 1. C. 79–85.
283. Wessels A., Sedmera D. Developmental anatomy of the heart: A tale of mice and man // *Physiological Genomics*. – 2004. – V. 15. – P. 165–176.
284. Wiese C., Grieskamp T., Airik R., Mommersteeg M. T. M., Gardiwal A., Gier-De Vries C. De, Schuster-Gossler K., Moorman A. F. M., Kispert A., Christoffels V. M. Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3 // *Circulation Research*. – 2009. – V. 104. – № 3. – P. 388–397.
285. Wischmeyer E., Do F., Karschin A. Acute Suppression of Inwardly Rectifying Kir2.1 Channels by Direct Tyrosine Kinase Phosphorylation // *Biochemistry*. – 1998. – V. 273. – № 51. – P. 34063–34068.
286. Wright C. D., Chen Q., Baye N. L., Huang Y., Healy C. L., Kasinathan S., O’Connell T. D. Nuclear α 1-adrenergic receptors signal activated ERK localization to caveolae in adult cardiac myocytes // *Circulation Research*. – 2008. – V. 103. – № 9. – P. 992–1000.
287. Wright C. D., Chen Q., Baye N. L., Huang Y., Healy C. L., Kasinathan S., O’Connell T. D. Nuclear α 1-Adrenergic Receptors Signal Activated ERK Localization to Caveolae in Adult Cardiac Myocytes // *Circulation Research*. – 2008. – V. 103. – № 9. – P. 992–1000.
288. Wright C. D., Chen Q., Baye N. L., Huang Y., Healy C. L., O’Connell T. D. Localization to Caveolae in Adult Cardiac Myocytes // *Circulation Research*. – 2009. – V. 103. – № 9. – P. 992–1000.
289. Wright C. D., Wy S. C., Dahl E. F., Sazama A. J., O’Connell T. D. Nuclear Localization Drives α 1-AR Oligomerization and Signaling in Cardiac Myocytes // *Circulation Research*. – 2013. – V. 24. – № 3. – P. 794–802.
290. Wu S. C., Dahl E. F., Wright C. D., Cypher A. L., Healy C. L., O’Connell T. D. Nuclear localization of α 1A-adrenergic receptors is required for signaling in cardiac myocytes: an “inside-out” α 1-AR signaling pathway. // *Journal of the American Heart Association*. – 2014. – V. 3. – № 2. – P. 1–16.
291. Yamada S., Yamamura H. I., Roeske W. S. Ontogeny of mammalian cardiac α 1-adrenergic receptors // *European Journal of Pharmacology*. – 1980. – V. 68. – № 2. – P. 217–221.
292. Yanaga T., Ito M., Saeki K., Arita M., Tanoue M., Mashiba H. The ectopic pacemaker

- formation in the left superior vena cava proximal to the heart and the genesis of cardiac arrhythmias // *Japanese Heart Journal*. – 1966. – V. 7. – № 5. – P. 505–511.
293. Yeh H.-I., Lai Y.-J., Lee Y.-N., Chen Y.-J., Chen Y.-C., Chen C.-C., Chen S.-A., Lin C.-I., Tsai C.-H. Differential expression of connexin43 gap junctions in cardiomyocytes isolated from canine thoracic veins // *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. – 2003. – V. 51. – № 2. – P. 259–66.
294. Yeh H. I., Lai Y. J., Lee S. H., Lee Y. N., Ko Y. S., Chen S. A., Severs N. J., Tsai C. H. Heterogeneity of myocardial sleeve morphology and gap junctions in canine superior vena cava // *Circulation*. – 2001. – V. 104. – № 25. – P. 3152–3157.
295. Yeh H., Lai Y., Lee S., Lee Y. Heterogeneity of Myocardial Sleeve Morphology and Gap Junctions in Canine Superior Vena Cava // *Circulation*. – 2001. – V. 104. – P. 3152–3157.
296. Yiallourou S. R., Sands S. A., Walker A. M., Horne R. S. C. Maturation of heart rate and blood pressure variability during sleep in term-born infants. // *Sleep*. – 2012. – V. 35. – № 2. – P. 177–86.
297. 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 // *PLoS ONE*. – 2013. – V. 8. – № 5. – P. e62628.
298. Zhang L., Malik S., Pang J., Wang H., Park K. M., Yule D. I., Blaxall B. C., Smrcka A. V. Phospholipase C ϵ Hydrolyzes Perinuclear Phosphatidylinositol 4-Phosphate to Regulate Cardiac Hypertrophy // *Cell*. – 2013. – V. 153. – № 1. – P. 216–227.
299. Zhou S., Paz O., Cao J.-M., Asotra K., Chai N.-N., Wang C., Chen L. S., Fishbein M. C., Sharifi B., Chen P.-S. Differential β -adrenoceptor expression induced by nerve growth factor infusion into the canine right and left stellate ganglia // *Heart Rhythm*. – 2018. – V. 2. – № 12. – P. 1347–1355.
300. Zipes D., Jalife J., Stevenson W. *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside* Zipes et al., 2017. 1424 с.
301. Zipes D. P., Knope R. F. Electrical properties of the thoracic veins // *The American Journal of Cardiology*. – 1972. – V. 29. – № 3. – P. 372–376.
302. 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 // *Molecular and Cellular Biology*. – 2001. – V. 21. – № 13. – P. 4188–4196.
303. Кузьмин В. С., Алексеева Н. В., Розенштраух Л. . Миокардиальная ткань торакальных вен позвоночных животных: происхождение и контроль // *Успехи физиологических наук*. – 2017. – V. 48. – № 3. – P. 3–28.
304. Кузьмин В. С., Каменский А. А. Молекулярные механизмы онтогенеза

ритмоводителя сердца у позвоночных животных // Вестник Московского университета.
Серия 16: Биология. – 2021. – V. 76. – № 4. – P. 183–201.