

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.Ломоносова**

На правах рукописи



Кузьмин Владислав Стефанович

**ТКАНЕВЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОАРИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИОКАРДА
ЛЕГОЧНЫХ ВЕН**

Специальность – 1.5.5 – физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Москва – 2022

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

**Научный
консультант**

Камкин Андрей Глебович – доктор медицинских наук

**Официальные
оппоненты**

Кошелев Владимир Борисович – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», факультет фундаментальной медицины, кафедра физиологии и общей патологии, заведующий кафедрой физиологии и общей патологии

Соловьёва Ольга Эдуардовна – доктор физико-математических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (ИИФ УрО РАН), директор

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

Защита диссертации состоится «20» февраля 2023 г. в 15:30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.7 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, аудитория 389.

E-mail: bellaum@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский проспект д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА» <https://istina.msu.ru/dissertations/507518934/>

Автореферат разослан «15» декабря 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
МГУ.015.7, доктор биологических наук

Б.А.Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Среди заболеваний сердечнососудистой системы (ССС) нарушения ритма сердца – аритмии, занимают одно из первых мест по распространенности. Фибрилляция предсердий (ФП) является крайне часто встречающейся формой нарушения ритма сердца. ФП является тахиаритмией и характеризуется быстрой, нерегулярной электрической и механической активностью в предсердной ткани, что приводит к потере предсердиями насосной функции [Schotten U. et al., 2011].

Фибрилляция предсердий сопровождается множеством осложнений и опасна тем, что отягчает течение заболеваний ССС. У человека при ФП ритм достигает 400–600 импульсов в минуту. ФП приводит к снижению наполнения желудочков, застою крови в предсердиях, что увеличивает риск образования тромбов и тромбоэмболии. Показано, что ФП может быть причиной стенокардии [Nattel S., 2002; Everett T.H. and Olgin J.E., 2004]. Желудочковая тахикардия, сопровождающая ФП, может усугубить сердечную недостаточность, стать причиной её декомпенсации.

Вероятность возникновения ФП увеличивается с возрастом: в 50 лет ФП наблюдается у 0,5%, в возрасте 80 лет – у 10% населения. Такие заболевания сердечно-сосудистой системы, как застойная сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца, перикардиты, гипертония способствуют возникновению ФП [Zipes D. and Jalife J., 2018]. Тем не менее, патогенез ФП до сих пор остается не до конца изученным [Alessie M.A. et al., 1990].

В настоящее время существует два подхода к терапии ФП, один из которых является инвазивным и предполагает хирургические вмешательства [Haïssaguerre M. et al., 1994], а второй основан на лекарственной терапии. Несмотря на значительный прогресс в поиске способов лечения ФП, до сих пор не найдено универсального метода борьбы с данным заболеванием. Эффективность фармакологической терапии остается недостаточно высокой, особенно при лечении «застарелых» хронических, персистирующих форм аритмии. Интервенционные методы часто сопровождаются осложнениями и требуют повторных хирургических вмешательств. В связи с вышесказанным, понимание механизмов формирования фибрилляции предсердий в связи с поиском мишеней для воздействия при разработке терапии заболевания является крайне актуальной задачей.

В начале XX века были предложены первые гипотезы касательно механизмов фибрилляции предсердий: во-первых, в концепции «патологического очага» [Winterberg H., 1906] подразумевалось, что участки предсердного миокарда приобретают способность самопроизвольно, с высокой частотой генерировать потенциалы действия и волны возбуждения. А во-вторых, гипотеза «круговой циркуляции возбуждения» подразумевала, что ФП формируется и персистирует в результате самоподдерживающегося кругового движения множества волн возбуждения в предсердиях [Lewis Th., 1912, 1921]. В настоящее время установлено, что инициация и поддержание ФП является результатом двух вышеуказанных механизмов [Jalife J. et al., 2002; Schneider M.A. 2003]. Более того, к настоящему моменту установлено, что эктопические, внеузловые очаги возбуждения, приводящие к ФП, в подавляющем количестве случаев обнаруживаются в миокардиальной ткани, располагающейся в стенке легочных вен [Haïssaguerre M. et al., 1998; 2000; Chen S-A et al., 1999; 2000]. Несмотря на установление источников активности, приводящей к ФП, клиническое описание очагов и условия инициации ФП в

легочных венах [Po S.S. et al., 2005; Arentz T. et al., 2007], непосредственные электрофизиологические механизмы инициации ФП в миокардиальной ткани легочных вен, остаются неизвестными [Chard M. and Tabrizchi R, 2009].

В частности, остается неизвестным, являются ли проаритмический тип биоэлектрической активности общим свойством миокардиальной ткани легочных вен у всех млекопитающих или характерен только для человека; сходны ли особенности эктопической автоматии легочных вен у разных животных, и можно ли, основываясь на животных моделях, разрабатывать фармакологические способы подавления эктопической активности легочных вен человека.

В настоящее время известно, что активность вегетативных нервов в миокардиальной ткани легочных вен играет одну из основных ролей в индукции проаритмической автоматии и ФП [Iwasaki Y.-K. et al., 2011; Schotten U. et al., 2011]. Тем не менее, ключевые факторы, которые способствуют проявлению аритмогенных биоэлектрических свойств и модуляции адренергических эффектов в легочных венах, остаются не установленными.

Остается нераскрытым вопрос о сходстве электрофизиологических свойств кардиомиоцитов легочных вен и пейсмекерных кардиомиоцитов нормального ритмоводителя сердца, синоатриального узла (САУ). Известно, что помимо САУ, целый ряд структур (атрио-вентрикулярный узел, кардиомиоциты коронарного синуса и периферии атрио-вентрикулярных клапанов) демонстрирует пейсмекерные свойства. До сих пор остается не установленным, какие именно молекулярные факторы способствуют появлению в кардиомиоцитах легочных вен свойств, делающих их сходными с пейсмекерными клетками САУ и других участков сердца, обладающих автоматией.

Согласно современным представлениям, как указано выше, ФП формируется в результате эктопического возбуждения, которое в миокардиальной ткани (субстрате) индуцирует множественную циркуляцию волн возбуждения. Поскольку целью при терапии ФП может быть не только подавление эктопической автоматии, но и предотвращение возникновения фибрилляторных волн, актуальной проблемой является изучение тканевой организации миокарда легочных вен как субстрата ФП. Наконец, актуальным является выяснение тканевых механизмов, препятствующих нормальному распространению возбуждения в легочных венах.

Степень разработанности темы

Специализированные поперечнополосатые мышечные клетки – кардиомиоциты – формируют основную мышечную часть стенки предсердий и желудочков сердца [Woodcock, Matkovich, 2005], называемую миокардом. Более 100 лет назад было показано, что на эмбриональных, плодных пренатальных, постнатальных стадиях онтогенеза, а также у взрослых животных (млекопитающих, птиц, низших позвоночных) и человека кардиомиоциты могут обнаруживаться и за пределами камер сердца [Elischer J., 1869; Stieda L., 1877]. Кардиомиоциты, обнаруживаемые за пределами камер сердца, не просто являются отдельными, разобщенными клетками, но образуют функциональную ткань, также как и в самих желудочках и предсердиях, которую можно было бы назвать *«экстракардиальной» миокардиальной тканью*. К настоящему времени показано, что вышеуказанная «экстракардиальная» ткань располагается в среднем слое стенки основных, крупных торакальных (грудных) сосудов всех млекопитающих. Более того, эта

ткань является неотъемлемым, нормальным элементом стенки торакальных сосудов, а также функциональным элементом сердечнососудистой системы.

Далеко не во всех группах позвоночных животных изучена локализация и развитость «экстракардиальной» миокардиальной ткани. Тем не менее показано, что у низших позвоночных животных «экстракардиальные» кардиомиоциты располагаются в стенке передних (краниальных) полых вен. У млекопитающих, птиц и человека такие кардиомиоциты обнаруживаются в стенке передних (верхних) полых вен, непарных вен, а также в стенке легочных вен. У многих млекопитающих миокардиальная ткань встречается в основании восходящей части аорты.

Установлено, что экстракардиальная миокардиальная ткань в стенке торакальных сосудов не является изолированной – эта ткань связана с миокардом стенки камеры сердца – правым или левым предсердием [Nathan H. and Eliakim, M., 1966]. В стенке сосуда миокардиальная ткань может образовывать отдельные тяжи либо формировать сплошные слои, полностью охватывающий периметр сосуда на большем или меньшем удалении от его устья.

Наиболее известным является феномен миокардиальной ткани легочных вен (ЛВ), в связи с тем, что около двух десятилетий назад была установлена связь этой ткани с предсердными аритмиями и, в частности, с индукцией фибрилляции предсердий. Миокардиальную ткань в стенке легочных вен в современной литературе принято называть миокардиальными «рукавами» или, просто, миокардом легочных вен.

К настоящему времени исследована тканевая организация и гистология экстракардиальной миокардиальной ткани человека [Nathan H and Gloobe H., 1970] и ряда млекопитающих животных [Hashizume H. et al., 1998]. Изучена ультраструктура составляющих ее кардиомиоцитов [Masani F., 1986; Mueller-Hoecker J, 2008]. Установлены эмбриональные источники клеточных предшественников кардиомиоцитов легочных вен, изучен эмбрио- и морфогенез миокардиальной ткани легочных вен [Schornstein T. et al., 1931; Mommersteeg M.T.M. et al., 2007, 2009, 2010]. Установлено, что именно миокард легочных вен в подавляющем количестве случаев является источником эктопической (внеузловой) активности, приводящей к фибрилляции предсердий у человека [Haissaguerre M. et al., 1998; Chen S-A et al., 1999; 2000] и при моделировании заболевания у животных [Nocini M., 2002]. Электрофизиологические свойства миокардиальной ткани легочных вен отличаются от таковых в предсердном миокарде на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях, что является также результатом различного клеточного происхождения [Postma A., 2009]. В частности, для кардиомиоцитов ЛВ характерны спонтанные выбросы Ca^{2+} [Patterson E et al., 2006; 2007; Okamoto Y., 2012], нарушения реполяризации потенциалов действия – ранние и задержанные постдеполяризации, аномальная автоматия [Irie M. et al., 2019].

Установлено также, что миокардиальные рукава ЛВ имеют богатую иннервацию, и что высвобождение медиаторов вегетативной нервной системы нервными окончаниями в ЛВ является необходимым фактором формирования и, возможно, регуляции проаритмической активности в данной ткани [Patterson E et al., 2005; 2007]. Показано, что внутриклеточные пути передачи адренергических сигналов в легочных венах отличаются от таковых в предсердном миокарде [Okamoto Y. Et al., 2022].

К настоящему времени выяснены некоторые ионные, молекулярные механизмы, которые делают миокард ЛВ предрасположенным к проаритмической активности.

Показано, что у кардиомиоцитов в легочных венах значительна неинактивируемая, перманентная составляющая ($I_{Na,late}$) натриевого деполяризующего тока (I_{Na}) [Malécot C.O. et al., 2015]. Кардиомиоциты легочных вен экспрессируют специфические, активируемые гиперполяризацией каналы хлорного тока [Okamoto Y. et al., 2019; 2020]. В легочных венах снижена экспрессия калиевых ионных токов, поддерживающих стабильный потенциал покоя [Tsuneoka Y., 2017; Rappone C. et al., 2000].

Несмотря на значительное внимание исследователей, принципиальные вопросы касательно электрофизиологических механизмов аритмогенности миокарда легочных вен остаются не разрешенными. Как указано выше, к таким вопросам относится установление ключевых регуляторных факторов, индуцирующих проаритмическую биоэлектрическую активность, а также выяснение тканевых факторов аритмогенеза в легочных венах.

Сравнительно-физиологические исследования организации суправентрикулярной области сердца и исследования реализации его пейсмекерной функции [Сухова Г.С. Удельнов М.Г, 1973; Сухова Г.С., 1977], проводившиеся ранее в нашей научной группе, в значительной степени, послужили основой для данного исследования. Многолетний опыт исследований в области электрофизиологии и фармакологии сердца [Rosenshtraukh et al., 2004], а также пионерские работы по изучению механизмов индукции аритмий [Камкин и др., 2003; Kamkin et al., 2022], является существенным вкладом при изучении биоэлектрических свойств миокарда легочных вен.

В связи с вышесказанным, в данной работе была поставлена следующая **цель**: изучить электрофизиологические свойства миокардиальной ткани легочных вен млекопитающих животных, выявить общие закономерности нервной регуляции, лежащие в основе аритмогенности данной ткани, а также установить основные факторы тканевого уровня, обуславливающие формирование в легочных венах функционального субстрата тахиаритмий.

Задачи исследования

В соответствии с целью, в работе были поставлены следующие задачи:

1. Охарактеризовать электрофизиологические свойства миокардиальной ткани легочных вен у лабораторных животных, включая крыс, мышей, морских свинок, кроликов; оценить возможность использования лабораторных животных для исследования механизмов аритмогенеза легочных вен;
2. Выяснить роль холинергической и адренергической регуляции в индукции эктопической, автоматической активности миокардиальной ткани легочных вен, используя лабораторных животных;
3. Определить возможность модуляции спонтанной, проаритмической биоэлектрической активности миокардиальной ткани легочных вен, вызванной адренергической стимуляцией, со стороны кардиоспецифических микроРНК;
4. Выявить особенности хронотопографии активации миокардиальной ткани легочных вен на примере вышеперечисленных лабораторных животных;
5. Установить основные факторы тканевой организации миокарда легочных вен, лежащие в основе проаритмических нарушений распространения возбуждения в данной ткани;
6. Выяснить роль холинергической, а также α - и β -адренергических компонентов симпатической нервной регуляции в формировании

аритмогенного характера проведения возбуждения и активации миокарда легочных вен;

7. Получить сведения о сходстве кардиомиоцитов легочных вен и пейсмекерных кардиомиоцитов синоатриального узла сердца.

Научная новизна исследования

В настоящей работе впервые проведено комплексное, систематическое изучение биоэлектрических свойств миокардиальной ткани легочных вен нескольких видов лабораторных млекопитающих животных, включая несколько линий мышей. Исследование позволило нам выявить общие электрофизиологические свойства и закономерности формирования адренергической спонтанной активности в легочных венах. В диссертационном исследовании впервые показано, что малые некодирующие молекулы РНК (микроРНК) могут усиливать адренергическую автоматию в легочных венах, в то время как эндотелиальные факторы не влияют на биоэлектрические свойства данной ткани.

Использование современных методов, позволило впервые выявить ранее неизвестные особенности хронотопографии активации (особенности распространения и проведения волн возбуждения) в миокардиальной ткани легочных вен мелких млекопитающих животных, которые служат модельными объектами при исследовании механизмов аритмогенеза.

Использование фармакологических методов, иммунофлуоресцентной микроскопии и РВ-ПЦР позволило впервые охарактеризовать миокардиальные клетки легочных вен как обладающие фенотипом, отличным как от предсердного, так и пейсмекерного миокарда.

Впервые исследована электрическая сопряженность кардиомиоцитов в миокардиальной ткани легочных вен. Основываясь на оценке экспрессии белков целевых контактов, оценке пассивных электрических свойств и анализе действия разобщающих агентов впервые показано, что для миокарда легочных вен характерен предсердный тип проведения возбуждения, а электрическая сопряженность не является основным фактором аритмогенности данной ткани.

В настоящей работе впервые установлено, что активация адренорецепторов $\alpha 1$ -типа усиливает проаритмические свойства миокардиальной ткани легочных вен за счет подавления проведения и формирования блоков возбуждения в совокупности с пространственно-гетерогенным увеличением длительности потенциалов действия.

Наконец, с помощью гистохимических методов впервые прослежено формирование и тканевые особенности симпатической иннервации; впервые сопоставлена локализация эктопических очагов автоматии и локальные особенности организации адренергических волокон в легочных венах у мелких лабораторных животных.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Результаты работы имеют теоретическую, фундаментальную, и практическую значимость. Теоретическое значение работы состоит в том, что в представленном исследовании выявлены закономерности биоэлектрической активности, холинергической регуляции и принципы индукции эктопической активности при адренергической стимуляции в миокарде легочных вен, ранее неизвестные и являющиеся общими для млекопитающих животных.

Фундаментальная значимость работы также определяется двумя выявленными и изученными аспектами электрофизиологии миокарда легочных вен, первый из которых связан с анализом факторов, способствующих индукции эктопической, автоматической активности, а второй с выяснением ключевых особенностей тканевой организации миокарда легочных вен в связи с их аритмогенностью. Полученные в работе результаты существенно расширяют представления о роли факторов тканевого уровня в аритмогенезе легочных вен. Мы показали, что локальная пространственная гетерогенность и анизотропия тканевых электрофизиологических свойств (скорости, направления проведения возбуждения) является важным механизмом, лежащим в основе проаритмической активности ЛВ.

В работе показано, что микроРНК избирательно экспрессируемые в сердце (miR-486-3p, miR-1, miR-133a-3p) модулируют эктопическую автоматия, вызванную адренергической стимуляцией, в миокарде легочных вен. Таким образом, выявлен новый фундаментальный механизм модуляции нервного контроля биоэлектрической активности ЛВ. Важное теоретическое значение имеет тот факт, что эндотелий вен, а также основные факторы, им продуцируемые, не оказывают заметного влияния на биоэлектрические свойства ЛВ, что указывает на автономность регуляции двух составляющих (гладкомышечной и миокардиальной) стенки легочных вен.

Нами установлено, что миокард легочных вен демонстрирует ключевые свойства, характерные как для пейсмекерной ткани (нестабильный потенциал покоя, низкий уровень Ncx2-5), так и для «рабочего» предсердного миокарда (экспрессию Sx43, отсутствие Sx40). Таким образом, фундаментальной особенностью миокарда легочных вен является «избирательное» смещение электрофизиологического фенотипа.

Новое направление в области фундаментальной электрофизиологии сердца, которое позволяют сформулировать результаты работы, связано с обнаруженной способностью $\alpha 1$ -адренорецепторного сигнального каскада подавлять проведение возбуждения в легочных венах. Установлено, что именно активация $\alpha 1$ -адренорецепторов влияет на паттерн активации и индуцирует проаритмический характер распространения волн возбуждения в легочных венах.

Значимость настоящей работы для практической медицины связана с неуклонным ростом встречаемости в популяции, такой патологии сердечнососудистой системы, как предсердные тахикардии, фибрилляция предсердий. В рамках данной работы охарактеризована роль «нетипичных» для миокарда адренорецепторов $\alpha 1$ -типа в модуляции тканевых свойств легочных вен. Показана важность α -адренорецепторов, как фактора аритмогенеза, обусловленного активностью миокарда легочных вен. Проаритмическое подавление проведения возбуждения и усиление гетерогенности биоэлектрических свойств при активации α -адренорецепторов в легочных венах делает необходимым учитывать α -составляющую симпатической регуляции при разработке фармакологических подходов к терапии фибрилляции предсердий.

С прикладной точки зрения результаты работы открывают возможность корректной интерпретации экспериментальных исследований, выполняемых с использованием животных моделей, и проводимых с целью анализа механизмов аритмогенеза. В представленной в работе показано, что при исследовании факторов, влияющих на тканевую гетерогенность и эктопическую автоматия в качестве модельного объекта предпочтительно использовать миокард легочных вен различных животных.

Положения, выносимые на защиту

1. Для миокарда легочных вен крыс, мышей, кроликов, морских свинок характерен нестабильный потенциал покоя (ПП), нарушенная реполяризация спонтанных потенциалов действия. Однако, в базальных условиях, для всех животных, за исключением мышей определенных линий, характерен низкий уровень эктопической, проаритмической активности, выражающейся в залпах спонтанных потенциалов действия или в аномальной автоматической активности. Автоматическая активность миокардиальной ткани ЛВ всех изученных животных оказывается подавленной при ритмической стимуляции, имитирующей активацию ткани со стороны естественного ритмоводителя сердца – САУ. Из всех изученных видов, крысы и определенные линии мышей (BALB/C, C57Bl/6), но не кролики и морские свинки являются наиболее подходящими животными в качестве объектов для моделирования и изучения механизмов аритмогенеза легочных вен.
2. Парасимпатическая стимуляция, активация внутрисердечных постганглионарных парасимпатических волокон либо рецепторов ацетилхолина приводит в миокарде легочных вен к гиперполяризации, уменьшению длительности ПД. Холинергическая стимуляция снижает длительность рефрактерности, но вызывает восстановление возбудимости миокарда легочных вен, и тем самым может оказывать как про-, так антиаритмическое действие в этой ткани. Эти эффекты обусловлены активацией М-холинорецепторов, калиевого тока, чувствительного к барию. Адренергическая стимуляция приводит к двухфазному изменению ПП у крыс, а также индукции различных форм автоматической активности в миокардиальной ткани легочных вен крыс и мышей, но не кроликов. Для индукции автоматической активности необходима активация адренорецепторов как α -, так и β -типа. Адренергическая (норадреналин-вызванная) автоматия в ЛВ обусловлена влиянием на белки, определяющие уровень цАМФ, круговорот внутриклеточного кальция и его трансмембранный транспорт. Адренергическая автоматия является общим свойством миокарда легочных вен, по крайней мере у лабораторных млекопитающих.
3. К факторам, модулирующим адренергическую автоматию в легочных венах, относятся малые некодирующие РНК (микроРНК) miR-486-3p, miR-1, miR-133a-3p. МикроРНК могут как подавлять, так и усиливать аритмогенность легочных вен, модулируя чувствительность к адренергической стимуляции.
4. Для миокардиальной ткани легочных вен при частоте стимуляции, близкой к частоте, генерируемой САУ, характерен предсердный тип проведения и хронотопографии возбуждения. Однако, при нестационарной активации в миокарде легочных вен возникают нарушения и блоки проведения возбуждения, альтернации параметров проведения, существенно большие, чем в предсердном миокарде. Данный феномен особенно выражен в миокардиальной ткани крыс.
5. Миокардиальная ткань легочных вен экспрессирует коннексины 43 (Cx43, белки целевых контактов), характерные для рабочего миокарда. Уровень и паттерн экспрессии Cx43 в миокарде ЛВ и предсердном миокарде, по крайней мере у крыс, не различается. Для кардиомиоцитов легочных вен характерен высокий

уровень электрического сопряжения, что подтверждается экспериментами с октанолом, и оценкой средней скорости проведения, однако, константа длины существенно ниже, чем в предсердиях. Однако, для миокардиальной ткани легочных вен млекопитающих характерен значительный тканевой разброс уровня потенциала покоя и длительности электрически-вызванных потенциалов действия. Основным фактором, обуславливающим нарушения распространения возбуждения в ЛВ, является гетерогенность ткани по длительности ПД.

6. Стимуляция α 1-адренорецепторов вызывает снижение скорости и блоки проведения возбуждения в миокарде легочных вен. Активация α 1-адренорецепторов способствует аритмогенному характеру активации миокарда легочных вен. Холинергическая стимуляция, а также активация β -адренорецепторов предотвращает нарушения проведения возбуждения за счет гиперполяризации в кардиомиоцитах легочных вен.
7. Кардиомиоциты легочных вен демонстрируют свойства, характерные как для пейсмекерного миокарда (низкий уровень экспрессии транскрипционного фактора Nkx2-5, деполяризованный ПП), так и свойства, характерные для «рабочих» кардиомиоцитов предсердий (высокую скорость проведения, экспрессию Sx43, отсутствие экспрессии «пейсмекерных» коннексинов Sx40, Sx45, деполяризацию при действии ионов Li^+). В ЛВ только отдельные характеристики кардиомиоцитов оказываются изменены по сравнению с предсердным миокардом и кардиомиоцитами САУ: фенотип кардиомиоцитов легочных вен является «смещенным» относительно миоцитов САУ.

Методология и методы исследования

Для решения поставленных в работе задач использовано несколько методических подходов. Электрофизиологические методы включают (1) регистрацию внутриклеточной биоэлектрической активности с помощью микроэлектродов; (2) метод картирования хронотопографии возбуждения, основанный на применении потенциалчувствительных флюоресцентных красителей. В сочетании с электрофизиологическими методами применен фармакологический анализ для выяснения механизмов эктопической активности в легочных венах. В работе использована (3) иммунофлюоресцентная конфокальная микроскопия, а также метод (4) гистохимического окрашивания нервных терминалей в ткани. Метод (5) РВ-ПЦР использован для оценки уровня экспрессии мРНК. Иммунофлюоресцентная микроскопия использована для идентификации в поперечных срезах легочных вен (1) маркеров кардиомиоцитов, (2) белков целевых контактов с помощью специфических антител.

Электрофизиологические эксперименты проведены с использованием тканевых препаратов различных (внелегочных, внутривенных) участков стенки легочных вен и предсердий, полученных от неонатальных (а) и (б) взрослых животных. Для выявления общих закономерностей организации электрической активности миокарда легочных вен млекопитающих животных, а также трансляруемости экспериментальных исследований в работе использованы мыши, крысы, морские свинки, кролики. Тканевые препараты легочных вен получены от мышей нескольких линий: BALB/C, CBA, C57Bl/6, а также межлинейных гибридов первого поколения B6CBAF1.

Эксперименты выполнены на кафедре физиологии человека и животных биологического факультете МГУ имени М.В.Ломоносова, в лаборатории электрофизиологии сердца института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ Кардиологии имени ак.Е.И.Чазова»; иммунофлюоресцентные исследования проведены на кафедре нормальной физиологии МБФ РНИМУ им. Н.И.Пирогова.

Степень достоверности данных

Представленные в работе данные получены с использованием современных общепринятых экспериментальных методик, стандартного научного оборудования и реактивов; эксперименты выполнены с использованием тканей, полученных от достаточного количества лабораторных животных контролируемого содержания; экспериментальные данные проанализированы и представлены в виде численных значений. Первичные экспериментальные данные размещены на открытых серверах и доступны для дополнительного анализа или могут быть получены по запросу от автора.

Статистическая обработка экспериментальных данных выполнена с использованием адекватных, стандартных методов и тестов; эксперименты и результаты, представленные в работе, воспроизводимы. Результаты исследования представлены для ознакомления научному сообществу и опубликованы в высокорейтинговых рецензируемых научных журналах. Публикации, в которых представлены результаты работы, имеют цитирования. В литературном обзоре и разделе, посвящённом обсуждению результатов, используются современные сведения, опубликованные в специализированных научных журналах и изданиях.

В работу вошли исследования, выполненные при поддержке нескольких грантов РФФИ (20-14-50459 (2020-21) – «Молекулярные механизмы онтогенеза ритмоводителя сердца у позвоночных животных»; 17-04-01921 (2017-19) – «Изучение биоэлектрической активности миокардиальной обкладки полых вен млекопитающих и ее адренергической регуляции»; 14-04-01781a (2014-16) – «Изучение ионных и молекулярных механизмов спонтанной деполяризации в кардиомиоцитах легочных вен в связи с проблемой возникновения предсердных аритмий») и РНФ (19-75-10039 (2019-21) - «Поиск новых способов корректировки нарушений электрической активности сердца с помощью микроРНК, регулирующих экспрессию генов ионных каналов»). Результаты работы одобрены экспертами соответствующих фондов.

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя Кузьмин В.С. заключается в разработке направления исследования, формулировании гипотез и концепции исследования. Соискатель лично осуществлял все этапы диссертационной работы: планирование экспериментов, адаптацию методик, выполнение физиологических, функциональных, молекулярно-биологических экспериментов, изготовление тканевых образцов, проведение иммунофлюоресцентных исследований, анализ данных, статистическую обработку и обобщение результатов, написание статей и тезисов, представление результатов работы на российских и международных конференциях, подготовка текста диссертации.

Апробация материалов диссертации

Результаты данной диссертационной работы были представлены на следующих всероссийских и международных конференциях и съездах: на XXII и XXIII съездах Физиологического общества им. И. П. Павлова (Россия, Волгоград, 2013; Воронеж, Россия 2017); на VI съезде союза физиологических обществ стран СНГ (Россия, Сочи, 2019); на V, VI и VII всероссийских школах-конференциях по физиологии кровообращения (Москва, МГУ имени М.В.Ломоносова, 2012, 2016, 2020); на Российской конференции "Физиология и биохимия сигнальных систем", посвященной 100-летию академика Т.М. Турпаева (Москва, Россия, 2018); на III Международном конгрессе, посвященном А.Ф. Самойлову «Фундаментальная и клиническая электрофизиология (Казань, Россия, 2019); на 1-й, 2-й и 3-ей молодежной школе-конференции "Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций", (Звенигородская биологическая станция, Россия, 2017, 2019); на международном симпозиуме «Биологическая подвижность» (Пушино, Россия, 2019), на международных школах-конференциях «Адаптация развивающегося организма» (Казань-Яльчик, 2014, 2016); на ежегодной всероссийской научно-практической конференции «Кардиология на марше 2021» (Россия, Москва, 2021).

Результаты диссертации также представлены на на 37-м и 38-м конгрессах международного союза физиологических обществ (World Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS), 2013, Киото, Япония; 2017, Рио-де-Жанейро, Бразилия); на ежегодной конференции общества экспериментальной биологии (Society for experimental biology, SEB Annual Main Meeting, 2017, Гетебург, Швеция); на конгрессе Европейской ассоциации сердечного ритма (EHRA Congress, Europace Cardiostim, 2017, Вена, Австрия); на 43-м международном совместном съезде Европейского электрофизиологического общества и рабочей группы по сердечной электрофизиологии («43rd European Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology Meeting», Лиссабон, Португалия, 2019); на съезде Европейской федерации физиологических обществ (Federation of European Physiological Societies, FEPS, 2014, Будапешт, Венгрия); на объединённом съезде Европейской федерации физиологических обществ и Австрийского физиологического общества (Joint Meeting of the Federation of European Physiological Societies and the Austrian Physiological Society, FEPS 2017, Вена, Австрия); на 4-м конгрессе физиологических наук Сербии (4th Congress of physiological sciences of Serbia with international participation: "current trends in physiological sciences: from cell signals to the biology of aging, Ниш, Сербия, 2018); на съездах скандинавского физиологического общества (Scandinavian Physiological Society Annual Meeting, SPS, Осло, Норвегия, 2016; Рейкьявик, Исландия, 2019).

Материалы диссертации апробированы на заседании кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова 10 октября 2022 года.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 34 статьи (из них 16 в журналах индексируемых аналитической базой Web of Science 'core collection') и 37 тезисов в сборниках докладов всероссийских и международных научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 291 странице, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения полученных данных, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Список литературы включает 321 источник. Работа проиллюстрирована 132 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные

В работе использованы тканевые препараты, поученные от крыс, мышей, кроликов и морских свинок. Самцы и самки (аутбредных) крыс стока Wistar возрастом 60-70 дней (180-200 г) были получены из питомника ФГБУ "НЦ Биомедицинских технологий" ФМБА и были использованы как для получения экспериментальных образцов (тканевых препаратов легочных вен и левого предсердия), так и для получения потомства.

Самцы кроликов породы «советская шиншилла» были получены из питомника лабораторных животных ФГБУ "НЦ Биомедицинских технологий" (филиал «питомник Столбовая»). В экспериментах использовали животных весом 3-3,5 кг (16 недель). В работе использовали мышей трех линий - BALB/C, C57Bl/6 и CBA (60 дней, 20-25 г). Животные были получены из филиалов ФГБУ "НЦ Биомедицинских технологий". В работе также использовали самцов (аутбредных) морских свинок породы Агути (90 дней, 300 г).

Всех животных (за исключением потомства крыс) перед экспериментом содержали не менее 2 нед в виварии в стандартных клетках при световом режиме 12:12, температуре 20-24°C и влажности 40-70% с доступом к воде и пище *ad libidum*.

Эксперименты на животных выполнены в соответствии с актуальными требованиями по содержанию и использованию лабораторных животных. Все предварительные манипуляции с животными и их эвтаназию проводили в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (National Academies Press (US), 2011). Экспериментальные протоколы были одобрены комиссией по биоэтике Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ Кардиологии» МЗ РФ.

Перед эвтаназией животным вводили р-р гепарина (1000 ед./кг, в/б в 0,2-0,4 мл ф. р-ра). Через 30 мин после введения гепарина мышей, крыс или морских свинок декапитировали. Кроликам вводили в краевую вену уха р-р пентобарбитала (40% в физ. р-ре) вплоть до констатации глубокого хирургического наркоза. После эвтаназии вскрывали грудную клетку, извлекали сердце вместе с легкими и помещали в емкость с перфузионным раствором комнатной температуры. В аорту вводили канюлю, соединенную со шприцем, содержащим перфузионный раствор комнатной температуры. Сердце промывали раствором, вытесняя кровь из коронарных сосудов предсердий и желудочков. Процедуру повторяли до полного удаления крови из сердца.

Затем выделяли многоклеточные препараты. В зависимости от типа экспериментов многоклеточные препараты включали (а) левое предсердие и легочную вену левой доли легкого либо только (б) «развернутый» сегмент легочной вены (**Рис.1**). Препараты первого типа использовали для сопоставления характера биоэлектрической активности в левом предсердии, устье, участках ветвления и ветвях легочных вен. Для получения препаратов такого типа делали надрез в области границы левого желудочка и предсердия, далее вели разрез вдоль межпредсердной перегородки, отделяли левое предсердие вместе с легочными венами и долями легких от сердца. Отсекали легочную ткань, полностью

сохраняя структуру ветвей левой легочной доли легких дистальнее первой бифуркации легочных вен.

Для микроэлектродных отведений легочную вену раскрывали, получая плоский тканевой препарат. Для этого отсекали ветви вены дистальнее участка ветвления и делали разрез вдоль продольной оси ствола легочной вены и ее бифуркации. В большей части экспериментов с оптическим картированием легочные вены сохраняли интактными, не делая продольных разрезов и не отделяя дистальных участков вен.

В части экспериментов с оптическим картированием использовали «развернутые» тканевые препараты сегментов легочных вен, отсекая левое предсердие и дистальные (постбифуркационные) участки вен. Раскрытый тканевой препарат переносили в экспериментальную камеру с перфузионным раствором комнатной температуры и фиксировали внутренней («эндотелиальной») стороной (стенкой) вверх: внешняя стенка ЛВ, таким образом, была обращена к дну камеры.

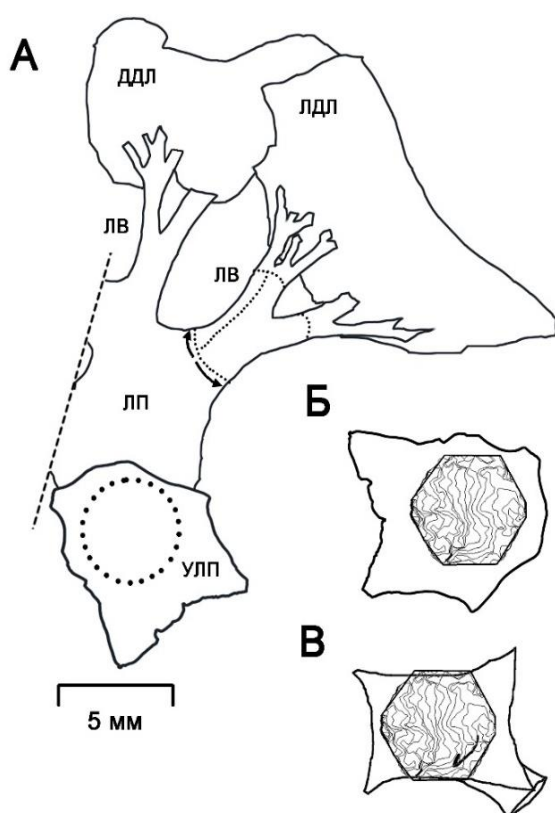


Рис. 1. Схематическое изображение препарата левого предсердия, легочных вен и долей легких крысы. **А.** общий вид изолируемой сердечно-легочной области крысы или мыши. Пунктиром показаны линии разрезов, наносимых для получения изолированного сегмента легочной вены. **Б.** изолированный тканевой препарат ушка левого предсердия, используемый в качестве контрольной суправентрикулярной миокардиальной ткани. **В.** Изолированный «развернутый» сегмент легочной вены левой легочной доли с бифуркацией и ветвью вены. На А пунктирный круг, а на Б и В октагональной рамкой показана область, в пределах которой отводили потенциалы действия либо проводили картирование электрической активности. УЛП — ушко левого предсердия, ЛП — гладкая стенка («крыша») левого предсердия, ЛВ — легочная вена, ЛДЛ — левая доля легкого, ДДЛ — добавочная доля легкого.

Электрическую стимуляцию изолированных тканевых препаратов начинали немедленно после изоляции в процессе препаровки. Стимуляцию осуществляли прямоугольными импульсами длительностью 2 мс (ЭСЛ-2, Россия или WPI Instruments A320, США), следующими с интервалами 200 (для мышей) или 300 мс (для крыс, морских свинок, кроликов) и амплитудой, равной двум пороговым значениям (1-3 В). Биполярные серебряные стимулирующие электроды (D=0,3 мм, тефлоновая изоляция) размещали на поверхности предсердной части препарата вблизи устья легочной вены. Электрическая стимуляция предотвращала спонтанную деполяризацию в миокарде легочных вен и потерю возбудимости в данной ткани в течение периода подготовки к эксперименту и стабилизации.

Регистрация биоэлектрической активности миокарда легочных вен

Для регистрации биоэлектрической активности использовали стеклянные микроэлектроды (сопротивлением 10-30 Мом и диаметром острия <1 мкм) заполненные 3М р-ром КСl и подключенные к предусилительной головке (входное сопротивление >100 ГОм) усилителя для внутриклеточной регистрации (Neuroprobe Amplifier A-M system 1600 или Warner Instruments, IE-210, США) посредством коаксиального держателя с электрохимической полуячейкой Ag/AgCl. Микроэлектроды изготавливали из стеклянных заготовок, используя микрокузницу («пуллер» Sutter Instrument P-30, США). В качестве заготовок использовали капилляры из боросиликатного стекла с внешним и внутренним диаметром 1,2 и 0,6 мм, соответственно, с одиночным внутренним филаментом (WPI instruments, США).

Усиленный и отфильтрованный (1-30000 Гц) сигнал поступал на АЦП (E-154, L-card, Россия, www.lcard.ru) с частотой дискретизации 10 КГц, который далее записывали и обрабатывали на компьютере с помощью программы «Power Graph 3.3» (Россия, Ди-Софт, www.powergraph.ru). Потенциал покоя (ПП) и потенциалы действия (ПД) регистрировали с внутренней (эндокардиальной, эндотелиальной) стороны многоклеточных препаратов.

Стабильного отведения ПД добивались путем погружения микроэлектрода в верхние слои фиксированного в перфузионной камере препарата миокарда при помощи микроманипулятора Narishige MM-3 (Япония). Приемлемым считали отведение, когда амплитуда электрически вызванных ПД составляла не менее 100 мВ.

В экспериментах с использованием микроэлектродной техники регистрировали в предсердном миокарде либо миокарде легочных вен: (а) электрически вызванные ПД при стационарной стимуляции; (б) спонтанные потенциалы действия; (г) залпы спонтанных потенциалов действия; (д) потенциал покоя и его колебания.

Для анализа электрически вызванных ПД использовали программу MiniAnalysis (Synaptosoft, США), с помощью которой измеряли длительность на уровне 50% и 90% реполяризации (ДПД50%, ДПД90%). Кроме того, используя программу Power Graph (Ди-софт, Россия) определяли максимальную скорость нарастания переднего фронта ПД (dV/dtmax) по наибольшему значению производной сигнала.

Для регистрации электрически-вызванных потенциалов действия осуществляли ритмическую непрерывную (стационарную) стимуляцию с помощью биполярных электродов. Потенциалы действия вызывали прямоугольными импульсами длительностью 2 мс и амплитудой, равной двум значениям порога возбуждения (1-10 мА при стабилизации по току). Возбуждающие импульсы наносили с частотой 2-5 Гц в зависимости от вида животного и типа эксперимента.

В ответ на адренергические или иные стимулы в покоем миокарде легочных вен возникают спонтанные потенциалы действия (СПД). В таком случае оценивали характеристики самих СПД (ДПД50%, ДПД90%, dV/dtmax), а также тип спонтанной активности (залповый, непрерывный), особенности спонтанной активности: рассчитывали (1) максимальную и среднюю частоту следования СПД, (2) длительность залпа СПД, (3) количество СПД в залпе, (4) длительность периода покоя между залпами СПД, (5) значения потенциала покоя (ПП), при котором возникал первый и последний СПД залпа.

В ряде экспериментов рассчитывали скорость нарастания медленной диастолической деполяризации (V_{мдд}), предшествующей спонтанным потенциалам

действия. В тех случаях, когда СПД имели конфигурацию характерную для пейсмекерных потенциалов, а также демонстрировали МДД, определяли скорость сдвига ПП.

Картирование хронотопографии возбуждения в миокарде легочных вен

Метод картирования электрической активности основан на применении потенциометрических (или потенциалчувствительных) флюоресцирующих зондов («красителей»). В нашей работе был использован потенциалчувствительный зонд di-4-ANEPPS, поскольку данный краситель хорошо проникает и удерживается в мембранах кардиомиоцитов тканевых препаратов (**Рис.2**). Максимум спектра поглощения этой молекулы, встроенной в липидный бислой, соответствует 470 нм, а положение максимума спектра эмиссии зависит от мембранного потенциала и лежит в диапазоне 620-740 нм.

Тканевые препараты легочных вен и левого предсердия мышей, крыс, морских свинок, кроликов получали также, как описано в предыдущем разделе. После диссекции препараты помещали в экспериментальную камеру и перфузировали раствором Тироде. Для насыщения ткани легочных вен и предсердий изолированные препараты перфузировали 30 мин р-ром, содержащим 5 мкМ di-4-ANEPPS (для этого 50 мкл р-ра, содержащего 5 мг/мл (10,5 мМ р-р) красителя в ДМСО добавляли в 100 мл перфузионного раствора). В тех экспериментах, когда это было необходимо (как правило, в экспериментах с предсердным миокардом) для подавления механической активности использовали «разобщитель электромеханического сопряжения» BDM (2,3-Butanedione monoxime, Sigma-Aldrich, США, 1 г/л, добавляли в перфузионный раствор) либо \pm блеббистатин (ингибитор АТФазной активности миозина, Sigma-Aldrich, США, 5 мкМ, добавляли в перфузионный раствор).

Флуоресцентные сигналы di-4-ANEPPS регистрировали с помощью высокочувствительной фотодиодной (PDA) матрицы H469V-012 (469 фотодиодов, WuTech Instruments, США) с оптической апертурой 19 мм, включенной в состав оптико-электронной установки. Матрица имеет гексагональную структуру, в которой один ряд включает 24 фотодиода. Благодаря гексагональной структуре эффективное разрешение матрицы составляет 37x37 пикселей.

Частота регистрации флуоресцентных сигналов каждым фотодиодом матрицы составляла 1,63 КГц (т.е. с интервалами 0,614 мс) при динамическом диапазоне 17 бит. Такая частота регистрации позволяла получать 4-5 значений интенсивности флуоресценции за время фазы деполяризации ПД (при средней длительности этой фазы в миокардиальной ткани 3 ± 1 мс), что достаточно для анализа и идентификации моментов активации в ткани.

Оптическая система включает систему призм, объектив Computar V5013 (фокальное расстояние 50 мм, апертура 1:1,3, CBC Group, Япония), которая смонтирована на расстоянии 24 мм от поверхности экспериментальной камеры и настроена таким образом, что при картировании охватывается участок препарата диаметром 5,5 мм (при этом общая площадь картирования составляет ≈ 19 мм²). При использовании вышеуказанной оптической системы каждый фотодиод матрицы регистрирует флуоресценцию с участка миокарда диаметром $\approx 0,23$ 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.

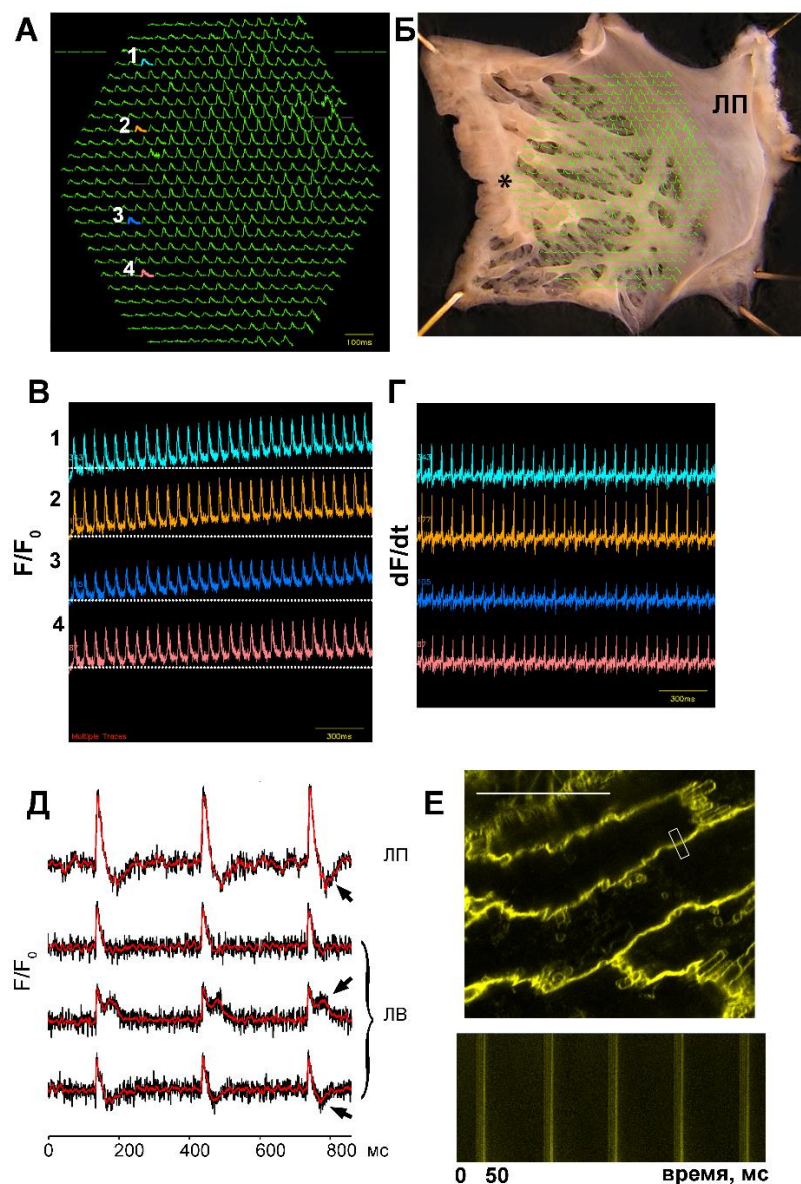


Рис. 2. Оптические сигналы (оптические ПД), регистрируемые в миокардиальной ткани с помощью гексагональной фотодиодной матрицы при использовании di-4-ANEPPS.

А. Репрезентативные (инвертированные) оптические сигналы, регистрируемые каждым фотодиодом матрицы за 50 мс.

Б. Область миокарда левого предсердия, в которой зарегистрированы оптические сигналы, показанные на **А**. **В.** Записи оптических сигналов, зарегистрированные отдельными фотодиодами матрицы (отмечены номерами на **А**) за период 1800 мс в миокарде левого предсердия. Видны последовательные оптические потенциалы действия. Пунктиром показан сдвиг базовой линии, обусловленный низкочастотным фотоиндуцированным изменением электрических характеристик фотодиодов.

Г. Дифференцированные сигналы, используемые для удаления сдвига базовой линии и идентификации моментов активации миокарда.

Д. Оптические сигналы от разных участков миокарда (в левом предсердии - ЛП, легочных венах - ЛВ). Исходные оптические сигналы (показаны черным цветом) и сигналы после фильтрации (метод скользящей медианы, показаны красным цветом). Стрелками показаны артефакты, возникающие в результате сокращения и смещения ткани. F/F_0 – нормализованная флюоресценция. **Е.** Накопление di-4-ANEPPS в мембранах кардиомиоцитов (сверху), а также инвертированные оптические сигналы от участка мембраны отдельного кардиомиоцита, реконструированные по суммарной флюоресценции в диапазоне 640-740 нм (снизу, значение мембранного потенциала пропорционально яркости псевдоцвета).

Флюоресценцию di-4-ANEPPS возбуждали с помощью кольцевого светодиодного осветителя с максимумом спектра излучения 480 нм, номинальной мощностью от 5 Ватт, суммарным световым потоком до 1500 люмен и пульсаций светового потока <0.1% до частоты 3 КГц.

Для разделения возбуждающего света и эмиссии di-4-ANEPPS, а также для регистрации флюоресценции только в длинноволновой части спектра эмиссии зонда

использовали красный отсекающий фильтр, эквивалентный стандарту КС14 с диапазоном пропускания >640 нм, помещенный на входе фотодиодной матрицы.

В ходе экспериментов оптические сигналы всеми фотодиодами матрицы регистрировали в течение 1000-1800 мс, таким образом, получали записи, включающие не менее трех циклов возбуждения препарата.

В результате инвертирования сигналов и прослеживания изменения уровня флюоресценции во времени по каждому фотодиоду матрицы получали оптические сигналы, соответствующие потенциалам действия (оптические ПД). Для удаления сдвига базовой линии, обусловленного фотоиндуцированным изменением электрических характеристик фотодиодов, проводили «детрендинг» используя метод линейной аппроксимации. Проводили фильтрацию шума, основанную на применении скользящей медианы (по 5 точкам). Дополнительно проводили сглаживание сигналов используя фильтр Савицкого-Голея с размером окна $W=31$ и 3-й степенью интерполирующего полинома $P=3$. Процедуру проводили для каждого канала в зоне интереса. После фильтрации оптические сигналы нормализовали на фоновую флюоресценцию (F_0).

На основе оптических сигналов строили изохронные карты, отражающие моменты одновременной активации в картируемой области миокардиальных тканевых препаратов. Для построения карт активации определяли максимальное значение производной оптических ПД (dF/dt_{max}) в каждом канале, подразумевая, что значение dF/dt_{max} соответствует максимальной скорости фазы деполяризации ПД в «точке» миокарда и соответствует моменту активации «точки» в ткани. Используя значения моментов активации, полученные для всех точек картируемой области, строили изохронные карты. В части экспериментов строили карты длительности оптических ПД и векторные карты скорости проведения возбуждения. Для построения карт длительности ПД использовали значения ДПД90. Для построения векторного поля скорости проведения рассчитывали градиенты в картах активации, используя дискретный градиентный оператор.

Иммунофлюоресцентный анализ экспрессии белков в миокарде легочных вен

Для иммунофлюоресцентного выявления десмина и белков щелевых контактов (Cx40, Cx43, Cx45) были использованы тканевые венозно-легочные препараты крыс возрастом 1-, 7-, 14 и 60 суток (взрослые животные). Препараты включали в себя участок ушка левого предсердия и легочную вену левой доли легкого. После выделения тканевые препараты помещали в пластиковую камеру объемом 2-3 мл, расправляли препарат при помощи энтомологических иголок. Тканевые образцы легочных вен фиксировали в 10%-ном формалине с нейтральным рН ($pH=7.2$) в течение 24 часов при комнатной температуре. Затем образцы обезвоживали с помощью стандартного протокола проводки материала и заливали в парафин.

За сутки до приготовления срезов парафиновые препараты замораживали при температуре $-20^{\circ}C$. С помощью ротационного микротомы с ручным приводом Leica RM2125RTS делали поперечные срезы предсердия либо легочной вены (в области первой бифуркации) толщиной 4 мкм. Далее проводили подготовку срезов для окрашивания. Для блокировки неспецифичных сайтов связывания срезы инкубировали в 5% козьей сыворотке (ПраймБиоМед, Россия либо Sigma-Aldrich, #G9023), растворенной в фосфатно-солевом буфере в течение 10-60 минут.

Для окрашивания срезы инкубировали с первичными антителами к целевым белками, растворенными (разбавитель антител ПраймБиоМед, Россия) в соответствующих разведениях 60 или более минут (в отдельных случаях до 24 ч) при комнатной температуре во влажной камере (Табл. 1). Далее проводили инкубацию со вторичными антителами, растворенными в PBS-T и ядерным красителем DAPI (1:2000, Sigma-Aldrich, #D9542) в течение 1 или 2 часов.

Таблица 1. Основные первичные антитела, использованные в работе для иммуногистохимического окрашивания срезов стенки легочных вен.

	первичное антитело	хозяин	реактивность	разведение	производитель	кат. номер
1	Anti-Connexin 43 Antibody, CT Antibody, моноклональные, клон 1C5.1	мышь	человек, крыса	1:400	Merck-Millipore	МАВТ528
2	Anti-Connexin 45 Antibody, поликлональные	кролик	человек, крыса, мышь	1:400	ThermoFisher Scientific	PA5-79311
3	Anti-Connexin 40 Antibody, поликлональные, верифицированные на нокаутах	кролик	человек, крыса, мышь	1:40	ThermoFisher Scientific	36-4900

Окрашенные препараты легочных вен и левого предсердия анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия) с объективом Plan-Apochromat 20x/0,8 M27. Для возбуждения флюоресценции антител, конъюгированных с флюорофором AlexaFluor, использовали диодный лазер с длиной волны 488 нм; для возбуждения флюоресценции антител, конъюгированных с флюорофором Cy3 использовали диодный лазер с длиной волны 555 нм.

При визуализации получали стековые изображения (4 стека, разрешение каждого стека 2048×2048 пикселей, 8 бит/пиксель) в конфокальном режиме (диаметр точечной диафрагмы – 1 мкм, интервал между стековыми плоскостями – 1 мкм), которые затем с помощью ПО Carl Zeiss ZEN 7.0 преобразовывали после удаления фоновой флюоресценции и шума в «однослойные» проекции, построенные по максимальным интенсивностям флюоресценции.

Анализ изображений, включающий идентификацию областей специфической флюоресценции, осуществляли в программе ImageJ (ImageJ 1.50i), используя плагин Bio-Formats Explorer ImageJ. (imagej.net/Bio-Formats). Используя стандартные процедуры ImageJ, рассчитывали процентное отношение общего количества флюоресцентных пикселей в бинарном изображении к общей площади изображения. Количество пикселей, соответствующих специфической флюоресценции, нормировали на площадь среза, вмещающую 1000 клеточных ядер.

Оценка уровня экспрессии транскриптов Nkx2-5 методом РВ-ПЦР

В эксперименте использовали препараты левого предсердия и легочных вен. Для стабилизации РНК после изоляции образцы тканей немедленно помещали в микроцентрифужную пробирку, заполненную фиксатором IntactRNA (Евроген, Россия, # BC031). В качестве исходного материала для проведения ПЦР использовали выделенную

и экстрагированную из гомогенизированных образцов тканей тотальную РНК. Раствор, полученный после экстракции РНК, обрабатывали ДНКазой I (2000 е.а./мл, NEB, USA, # M0303S). Количество и качество осажденной РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA), абсорбцию измеряли при длине волны 260 нм, (260/280 нм). Также проводили электрофорез в 1% агарозном геле с целью выяснения целостности полученной РНК.

После обработки ДНКазой I на РНК-матрице синтезировали библиотеку комплементарной ДНК (кДНК) с помощью вирусной обратной транскриптазы (MMLV ревертаза). Для обратной транскрипции использовали 500 нг РНК.

Праймеры для РВ-ПЦР подбирали при помощи программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, USA). GC-соотношение, температура плавления, способность к формированию шпилек и димеров определяли с помощью OligoAnalyzer™ Tool (<https://www.idtdna.com/>, USA). Нуклеотидные последовательности отобранных праймеров приведены в Таблице 2. Синтез праймеров осуществлялся компанией Евроген, Россия. Оценивали эффективность праймеров – считали эффективностью приемлемой, если она находилась в диапазоне 95-105%.

Таблица. 2. Последовательности праймеров (прямой – F, обратный – R, (специфичные для крысы, *Rattus norvegicus*), используемые в работе.

№	Белок	Ген	Праймеры: прямой (F) и обратный (R)	Эффективность праймеров	Размер ПЦР-продукта	T _{пл} , °C
1	Tbr	<i>Tbr</i>	F: TAATCCCAAGCGGTTTGCTG; R: TTCTTCACTCTTGGCTCCTGTG			
2	Nkx2-5	<i>Nkx2-5</i>	F: GGCGGATAAGAAAGAGCTGTGC	2.066	259	59.4
			R: ACACTTGTAGCGGCGGTCT	2.066	259	59.6

РВ-ПЦР выполняли с использованием амплификатора BioRad CFX96; количество циклов составляло 50. В экспериментах использовали реактивы производства компании Синтол, в качестве флюоресцентного красителя для детекции двуцепочечной ДНК был выбран EvaGreen (BIOTIUM, #31000), который добавляли в реакцию в количестве 0,5 мкл на 20 мкл смеси. Геномная ДНК служила положительным контролем, а в качестве негативного использовалась вода, использовавшаяся для приготовления реакционной смеси.

Полученные в результате ПЦР в реальном времени данные обрабатывали в программе Microsoft Excel. В качестве гена «домашнего хозяйства» использовали Tbr (ТАТА-связывающий белок). Экспрессия Tbr не различалась значимо (p>0.05) между образцами. Кривые плавления и пороговый цикл были определены с помощью программного обеспечения CFX-96. Все образцы были продублированы. Относительный уровень экспрессии был определен с использованием метода «ΔΔCt».

Дополнительные методы исследования, использованные в работе

Для выявления оценки интенсивности и определения периода формирования симпатической иннервации в постнатальном онтогенезе проводили визуализацию симпатических волокон в стенке ЛВ крыс разных возрастных групп: новорожденных и взрослых животных. Для визуализации симпатических нервных волокон использовали

метод гистохимического окрашивания миокардиальной ткани при помощи глиоксильной кислоты, образующей флюоресцирующее производное хинолина при взаимодействии с катехоламинами. Анализ распределения катехоламин-позитивных волокон осуществляли в стековых изображениях, полученных с использованием конфокального микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия), в программе ImageJ (ImageJ 1.50i) используя плагин Bio-Formats Explorer ImageJ. (imagej.net/Bio-Formats). Детали методики, а также результаты анализа приведены в разделах 3.8. и 4.5. диссертации.

В отдельной серии экспериментов определяли пассивные электрические свойства миокарда легочных вен, в частности константу длины (λ). Для оценки λ в легочных венах крыс, морских свинок и кроликов использовали данные о скорости проведения возбуждения, а также константу скорости пассивного изменения мембранного потенциала (τ_k) в точке регистрации электрически вызванных ПД с учетом некоторых упрощений. Детали методики, а также результаты анализа приведены в разделах 3.6. и 4.3.5. диссертации.

Для функциональной оценки степени электрической сопряженности кардиомиоцитов в миокарде ЛВ проводили эксперименты с использованием октанола в качестве «разобщающего» агента. Детали методики, а также результаты анализа приведены в разделах 3.5. и 4.3.1.9. диссертации.

Для исследования роли симпатической и парасимпатической иннервации в регуляции биоэлектрической активности миокардиальной ткани легочных вен проводили функциональные эксперименты с высокочастотной стимуляцией постганглионарных интрамуральных нервных окончаний в тканевых препаратах ЛВ крысы и мыши. Детали методики, а также результаты экспериментов приведены в разделах 4.2.1.7 и 4.3.2.6. диссертации.

Статистические методы, использованные в работе

Статистически значимые различия выявляли при помощи программы статистической обработки данных «GraphPad Prism 7». Использовали парный t-тест Стьюдента, точный тест Фишера, однофакторный либо двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений (one way ANOVA) и его аналог для непараметрических выборок (Критерий Краскела — Уоллиса) с последующим применением апостериорных тестов с использованием поправки на множественные сравнения (поправка Тьюки). Проверку распределения в выборках на нормальность осуществляли с помощью теста Шапиро-Уилка. В тех случаях, когда выборки не соответствовали нормальному распределению, а сравниваемых переменных было не более двух, использовали непараметрический критерий Мана-Уитни (для несвязанных выборок) либо критерий Вилкоксона (для связанных выборок). Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Данные в группах представлены как среднее \pm стандартное отклонение. n – количество экспериментов в той или иной группе (N – количество животных либо тканевых препаратов).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Потенциал покоя, потенциал действия в миокарде легочных вен

Для решения первой задачи исследования регистрировали потенциал покоя, потенциал действия в тканевых препаратах легочных вен крыс, мышей, кроликов, морских свинок с использованием различных режимов работы препаратов. Миокардиальная ткань в области устьев, проксимальных и дистальных участков легочных вен крысы, мыши и морской свинки генерирует ПД предсердного типа, в ответ на стационарную ритмическую электрическую стимуляцию ткани. Для проксимальной области и области устьев ЛВ крысы (при стимуляции с частотой 3 Гц) длительность ПД на уровне 90% реполяризации составляет 74 ± 2 мс ($n=10$), для дистальной части ЛВ (области, близкой к месту бифуркации вены) – 71 ± 1 мс ($n=10$), ДПД90% в левом предсердии крысы составляет 59 ± 3 мс ($n=18$). Таким образом, длительность ПД во «внелегочной» части ЛВ больше, чем в левом предсердии ($p < 0,05$). Длительность электрически вызванных ПД в миокарде легочных вен крыс выше, чем в миокарде левого предсердия при одинаковой частоте стимуляции препаратов.

Прекращение стационарной непрерывной электрической стимуляции и, соответственно, прекращение генерации ПД в ткани легочных вен приводит к изменениям потенциала покоя (**Рис. 3.А**). Для покоящегося миокарда ЛВ крысы характерен спонтанный сдвиг ПП, и степень этого сдвига (спонтанной деполяризации) ПП увеличивается по мере удаления точки регистрации от устьев легочных вен в направлении дистальных участков ЛВ. Таким образом, значение ПП в зависимости от места регистрации в покоящихся ЛВ лежит в диапазоне от -70 до -50 мВ ($n=25$). Для участка легочной вены крысы, располагающегося между устьем и первой бифуркацией, ПП составляет -67 ± 6 мВ ($n=20$). Эта величина ПП статистически значимо отличается от ПП в миокарде (покоящегося) левого предсердия (-79 ± 3 мВ, $n=20$, $p < 0,05$). Спонтанный сдвиг ПП не наблюдается в ритмически возбуждаемом и генерирующем ПД миокарде ЛВ крысы.

В предсердном миокарде у крыс при изменении режима активности – переходе в покоящееся состояние – спонтанной деполяризации не наблюдается. В отдельных случаях прекращение генерации ПД приводит к деполяризации до -55 и даже -50 мВ. Столь значительная деполяризация приводит к тому, что ткань становится неспособной немедленно отвечать генерированием ПД предсердного типа при возобновлении электрической стимуляции.

Длительность электрически вызванных ПД (ДПД90%) у морской свинки в левом предсердии (ЛП) составляет 58 ± 5 мс ($n=5$), в устье ЛВ – 67 ± 6 мс ($n=5$), а в наиболее дистальной участке миокардиального рукава – 64 ± 4 мс ($n=5$). Таким образом, длительность ПД у морской свинки является наибольшей в устье легочных вен. Как и у крыс, прекращение непрерывной электрической стимуляции и переход в покоящийся режим легочных вен у морской свинки приводит к спонтанному сдвигу ПП к более положительным значениям, чем в режиме генерации ПД, но только в дистальных участках ЛВ. Эта деполяризация развивается в течение $1,5 \pm 1$ мин и составляет $10 \pm 2,4$ мВ (**Рис.3.Б**).

Потенциал покоя и длительность ПД оценивали у нескольких линий мышей (BALB/c, C57Bl/6, CBA и межлинейных гибридов B6CBAF1). Тканевые препараты, одновременно включающие участки предсердий, а также три легочные вены, были

использованы для сопоставления конфигурации ПД в этих отделах суправентрикулярного миокарда. На примере мышей линии BALB/c установлено, что длительность электрически вызванных ПД, регистрируемых в проксимальных и дистальных участках легочных вен, различна (Рис. 4). Самая большая величина ДПД90% характерна для устья легочных вен, где она составляла 39 ± 5 мс ($n=7$). Длительность ПД в устьях вен статистически значимо отличалась от значений ДПД90% в остальных участках легочных вен. В левой легочной вене (ЛЛВ), правой легочной вене (ПЛВ) и восходящей легочной вене (ВЛВ) ДПД90% составляла 21 ± 5 мс ($n=6$), 26 ± 3 мс ($n=5$), 29 ± 4 мс ($n=5$), соответственно. Самое низкое значение ДПД90% характерно для ушка левого предсердия - 12 ± 2 мс ($n=5$), что статистически значимо отличалось от ДПД90% в устье ЛВ и остальных участках ЛВ.

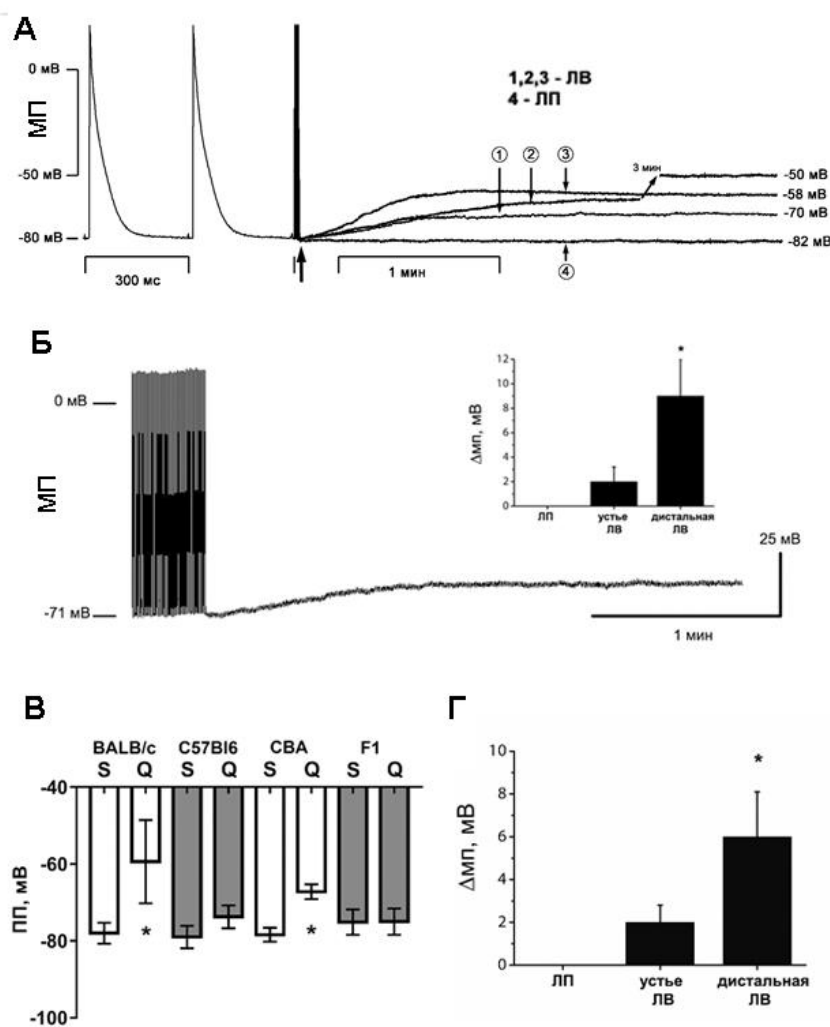


Рис. 3. А. Сдвиг потенциала покоя (ПП) в миокарде легочных вен (ЛВ). Прекращение электрической стимуляции (момент прекращения стимуляции и генерации ПД обозначен стрелкой) и переход миокардиальной ткани в покоящееся состояние в дистальном участке легочных вен сопровождается спонтанной деполяризацией - сдвигом ПП к менее негативным значениям. **А.** Сдвиг ПП в ЛВ крысы при переходе препарата в покоящееся состояние. Слева показаны электрически вызванные ПД, 1, 2, 3 - варианты изменения ПП в легочных венах, 4 - в предсердной части препарата (ЛП). **Б.** Сдвиг ПП в дистальном участке ЛВ морской свинки. Вставка справа - величина изменения ПП в левом предсердии, устье и дистальной ЛВ. * - $p < 0.05$ (однофакторный дисперсионный анализ, ANOVA). **В.** Сдвиг ПП в ЛВ

мышей различных линий (BALB/c, C57Bl/6, CBA и межлинейных гибридов B6CBAF1 (F1)). * - $p < 0,05$ (ПП при стимуляции vs ПП в покое, парный t-тест). **Г.** Сдвиг ПП, наблюдаемый в левом предсердии (ЛП), устье легочной вены (ЛВ), а также в ЛВ кролика. * - $p < 0.05$ (ANOVA, ЛП vs дистального участка ЛВ).

Результаты экспериментов, проведенных с помощью стандартной микроэлектродной техники, подтверждаются при оценке длительности оптических сигналов (оптических ПД) при окраске тканевых препаратов легочных вен потенциалчувствительным красителем di-4-ANNEPS. Реконструированная карта распределения длительностей оптических ПД, выявляет наибольшую длительность в

области устья легочных вен (**Рис.4.А**). Длительность ПД в различных отделах легочных вен оценивали не только у мышей линии BALB/c, но и у мышей линий C57Bl/6 и CBA, а также у межлинейных гибридов B6CBAF1. У всех этих типов мышей наблюдали сходное распределение длительностей ПД в венозно-предсердном миокарде, как и у мышей BALB/c. Потенциалы действия с наибольшей длительностью всегда обнаруживали в области устьев вен (**Рис.4.Б, В**). Значения ДПД90% для устья ЛВ и ушка ЛП всех четырех типов мышей представлены в таблице 3.

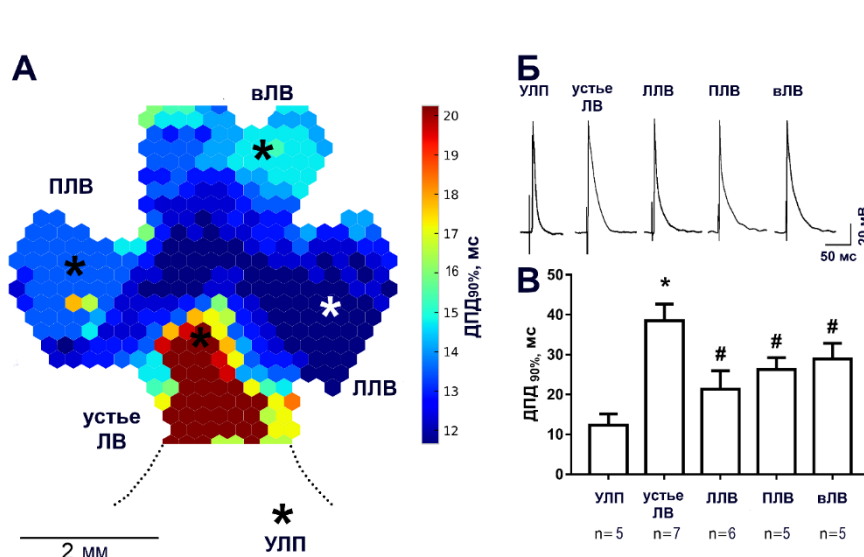


Рис.4. Длительность потенциала действия (ДПД90%), регистрируемых при электрической стимуляции в различных участках венозно-предсердного препарата мышей линии BALB/c. **А.** Карта ДПД90%, построенная на основе данных, полученных методом оптического картирования (временной интервал между изохронами 0,614 мс, звездочкой указаны

места, соответствующие регистрации ПД стеклянными микроэлектродами). **Б.** Репрезентативные примеры электрически вызванных ПД в разных областях венозно-предсердного препарата мыши. **В.** Длительность ПД (ДПД90%), регистрируемых с помощью стандартной микроэлектродной техники в различных участках венозно-предсердного препарата мыши. *, # - $p < 0.05$ (* - устье ЛВ vs. остальные группы; # - ЛЛВ, ПЛВ, вЛВ vs. УЛП; ANOVA). УЛП – ушко левого предсердия, ЛЛВ – левая легочная вена, ПЛВ – правая легочная вена, вЛВ – восходящая легочная вена.

Таблица 3. Значения ДПД_{90%} у мышей линии BALB/c, C57Bl/6, CBA, а также межлинейных гибридов B6CBAF1 в устьях легочных вен (ЛВ) и ушке левого предсердия (ЛП).

	BALB/c	C57Bl/6	CBA	F1
ЛВ	39±5 (n=7)	46±9 (n=5)	33±7 (n=6)	48±17 (n=8)
ЛП	12±2 (n=5)	20±4 (n=6)	30±5 (n=5)	25±5 (n=11)

У мышей BALB/c в электрически стимулируемом миокарде легочных вен ПП составил -78 ± 3 мВ (n=9). После прекращения электрической стимуляции у мышей некоторых линий происходил спонтанный сдвиг потенциала покоя к менее негативным значениям. После прекращения стимуляции у мышей линии BALB/c ПП стабилизировался на уровне -59 ± 10 мВ (n=5). Сдвиг ПП начинал развиваться сразу после прекращения электрической стимуляции, стабилизировался на новом уровне в течение $2,5 \pm 1,6$ минут, после чего, на протяжении всего периода покоя оставался на постоянном уровне. В среднем ПП в покое легочных венах мышей линии C57Bl/6 составлял -73 ± 3 мВ (n=5). У мышей линии CBA ПП при стационарной стимуляции/возбуждении составил -78 ± 2 мВ (n=5), а в покое миокарде -67 ± 2 мВ (n=5). Таким образом, для

миокарда ЛВ мышей линии СВА также характерен нестабильный уровень ПП. У гибридов первого поколения В6СВАF1 (гибридов линий СВА и С57В1/6) ПП в легочных венах в режиме стимуляции/возбуждения составил -75 ± 3 мВ (n=14). Статистически значимого спонтанного сдвига ПП у данного типа мышей после прекращения стимуляции не наблюдали: ПП в покоящихся легочных венах составил -74 ± 4 мВ (n=14). спонтанная деполяризация характерна только для легочных вен мышей линии ВАLВ/с и СВА. Таким образом, в состоянии покоя миокардиальная ткань легочных вен мышей, по крайней мере некоторых линий, демонстрировала те же свойства, что и у других грызунов – крыс, морских свинок.

У кролика конфигурация электрически вызванных ПД в ЛВ имеет вид характерный для рабочего миокарда, а потенциал покоя остается стабильным, близким по величине к таковому в левом предсердии (-78 ± 5 (n=5), -76 ± 3 (n=5) и -77 ± 4 (n=5) мВ для ЛП, устья ЛВ и наиболее удаленных участков миокардиальных муфт ЛВ, соответственно). Длительность ПД (ДПД90%) в ЛП составляет 58 ± 5 мс (n=5), в устье ЛВ - 78 ± 5 мс (n=5), а в наиболее дистальном участке миокардиального рукава - 71 ± 7 мс (n=5). Таким образом, наибольшая длительность ПД наблюдается у области устья легочной вены.

Прекращение непрерывной электрической стимуляции и, соответственно, прекращение генерации ПД и переход ткани в покоящийся режим приводит к спонтанному сдвигу ПП только в наиболее дистальных участках миокардиальных муфт ЛВ кролика. Эта деполяризация развивается в течение $3\pm 0,4$ мин и составляет $6,5\pm 2,4$ мВ (n=5, $p<0,05$). В проксимальном участке ЛВ кролика спонтанная деполяризация гораздо меньше ($1,8\pm 1,4$ мВ, n=5); деполяризация развивается после короткого периода, в течение которого наблюдается («постстимуляционная») гиперполяризация мембраны ($-1,8\pm 1,4$ мВ, n=5). Для проксимального и дистального участков миокардиальных муфт легочных вен у кролика характерны различия в биоэлектрической активности.

Таким образом, ПП в легочных венах у крыс, морских свинок, некоторых линий мышей и у кроликов является нестабильным, что делает эту ткань отличной от рабочего миокарда предсердий. Спонтанная деполяризация в легочных венах у крыс является наибольшей по сравнению с таковой в ЛВ кроликов, морских свинок. Увеличенная длительность ПД в устьях вен и, соответственно, значительный тканевой разброс уровня потенциала покоя и длительности электрически-вызванных потенциалов действия, спонтанная деполяризация, нестабильность ПП, вероятно, является свойством общим для миокардиальной ткани легочных вен большинства млекопитающих.

Автоматическая активность в миокардиальной ткани легочных в базальных условиях

В миокарде легочных вен взрослых крыс, морских свинок, кроликов не наблюдается залпов спонтанных ПД в базальных условиях, т.е. без адренергических либо холинергических воздействий. В миокардиальной ткани данных животных наблюдаются лишь единичные спутанные ПД, возникающие с интервалами в 1-3 мин. В отличие от вышеперечисленных животных, для мышей линии С57В1/6, а также для гибридов В6СВАF1 характерна автоматическая (спонтанная) активность в базальных условиях. Спонтанные ПД наблюдались у мышей линии С57В1/6 в 40% экспериментов (n=10); у гибридов F1 в 80% экспериментов (n=19). У мышей линии СВА автоматической активности в ЛВ в базальных условиях не наблюдали. У мышей линии СВА при

прекращении стимуляции наблюдали исключительно деполяризацию ПП, которая не сопровождалась какими-либо спонтанными потенциалами действия. У мышей BALB/c в базальных условиях спонтанные потенциалы действия возникали в 20% (в 6 из 30) случаев. Таким образом, некоторые линии мышей отличаются в плане электрофизиологических свойств легочных вен от других грызунов и кроликов.

У мышей линии C57Bl/6 базальная автоматическая активность в легочных венах не сопровождалась дополнительным сдвигом ПП или диастолической деполяризацией. Автоматическая активность носила залповый, периодический характер. Залпы спонтанных ПД следовали с интервалами $1,6 \pm 1,1$ с, а частота спонтанных ПД в залпе составляла $10,5 \pm 2,4$ Гц, что сопоставимо с частотой ПД, генерируемой синоатриальным узлом мыши (Рис.5).

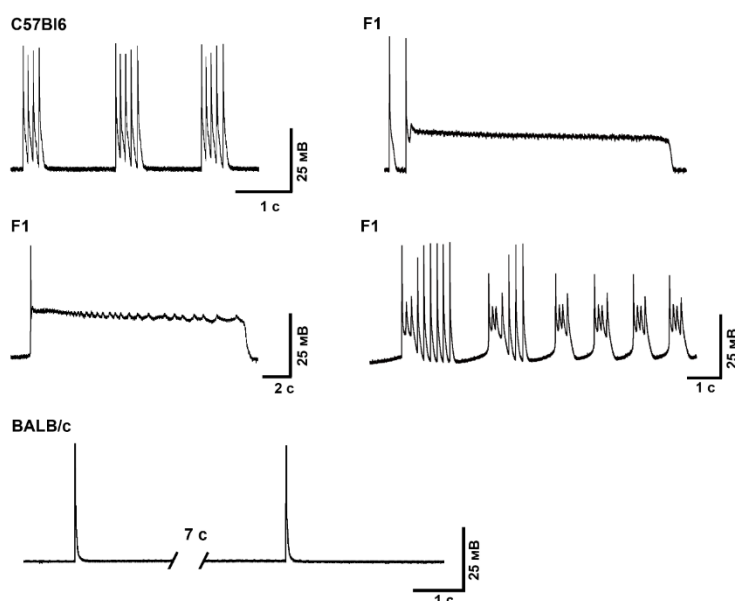


Рис.5. Репрезентативные примеры спонтанной автоматической активности в миокардиальной ткани легочных вен у мышей линии C57Bl/6 и у гибридов первого поколения B6CBAF1 (F1), а также примеры спонтанных единичных потенциалов действия, возникающих в ходе периода стабилизации ПП в миокарде ЛВ мышей BALB/c. У мышей C57Bl/6 залпы спонтанных ПД, а также отдельные ПД в залпе не предшествуются диастолической деполяризацией. Для спонтанных ПД в ЛВ у мышей B6CBAF1 характерна экстремальная длительность.

В легочных венах мышей гибридов B6CBAF1 спонтанные ПД возникали через 10-60 с после прекращения стимуляции. Как и у мышей C57Bl/6 потенциал покоя при этом оставался на постоянном уровне -74 ± 3 мВ (т.е. МДД отсутствовала). Спонтанная активность имела перманентный (сохранялась на протяжении всего периода регистрации) и регулярный характер. В 55% (в 8 из 15) в ЛВ мышей B6CBAF1 реполяризация спонтанных ПД сопровождалась повторяющимися длительными осцилляциями мембранного потенциала (Рис.5). Осцилляции МП возникали на уровне потенциала плато ($-10 - 0$ мВ) и могли иметь различную амплитуду. В ряде случаев, амплитуда осцилляций была очень низка, либо они отсутствовали вовсе. В последнем случае спонтанные ПД демонстрировали исключительно длительную фазу «плато». Длительность спонтанных ПД в легочных венах B6CBAF1 за счет осцилляций либо фазы «плато» могла достигать 20000 мс, что на 2,5 порядка превышает нормальную длительность ПД у мышей. Таким образом, отдельные линии мышей и их гибриды демонстрируют склонность миокарда легочных вен к проаритмической активности, а мыши B6CBAF1, вероятно, являются первым обнаруженным гибридом с генетически обусловленной (эктопической) аритмогенностью легочных вен, обусловленной ярко выраженной триггерной активностью.

Иммуноэкспрессия белков щелевых контактов в миокардиальной ткани легочных вен

В стенке легочных вен (снаружи от внутренней оболочки и снаружи от слоя гладкомышечных клеток), как и в рабочем миокарде предсердий, обнаруживается интенсивная иммуноэкспрессия белков щелевых контактов – коннексинов Сх43. В срезах, полученных от взрослых крыс, специфическая флюоресценция Сх43 в виде типичных полосок или групп пятен располагается в торцевых участках кардиомиоцитов, соответствующих расположению интеркалярных дисков и щелевых контактов. Для проксимальных участков легочных вен крысы характерно наличие двух миокардиальных слоев – внутреннего, с преимущественно продольным расположением клеток, и внешнего, с преимущественно радиальным расположением миокардиальных волокон. Флюоресценция Сх43 обнаруживается в обоих миокардиальных слоях стенки ЛВ (Рис. 6.А-В). Флюоресценция Сх43 обнаруживается по всему периметру вены (т.е. по всему периметру ее миокардиальной обкладки) как в проксимальных участках, так и в ветвях ЛВ дистальнее зоны бифуркации. Плотность и количество пятен специфической флюоресценции Сх43, отнесенное к площади среза, включающую 1000 ядер кардиомиоцитов, не отличается в миокарде левого предсердия и стенке легочных вен взрослых крыс ($p>0.1$). В миокарде ЛВ крыс иммуногистохимическими методами экспрессия белков коннексинов Сх45 не обнаруживается.

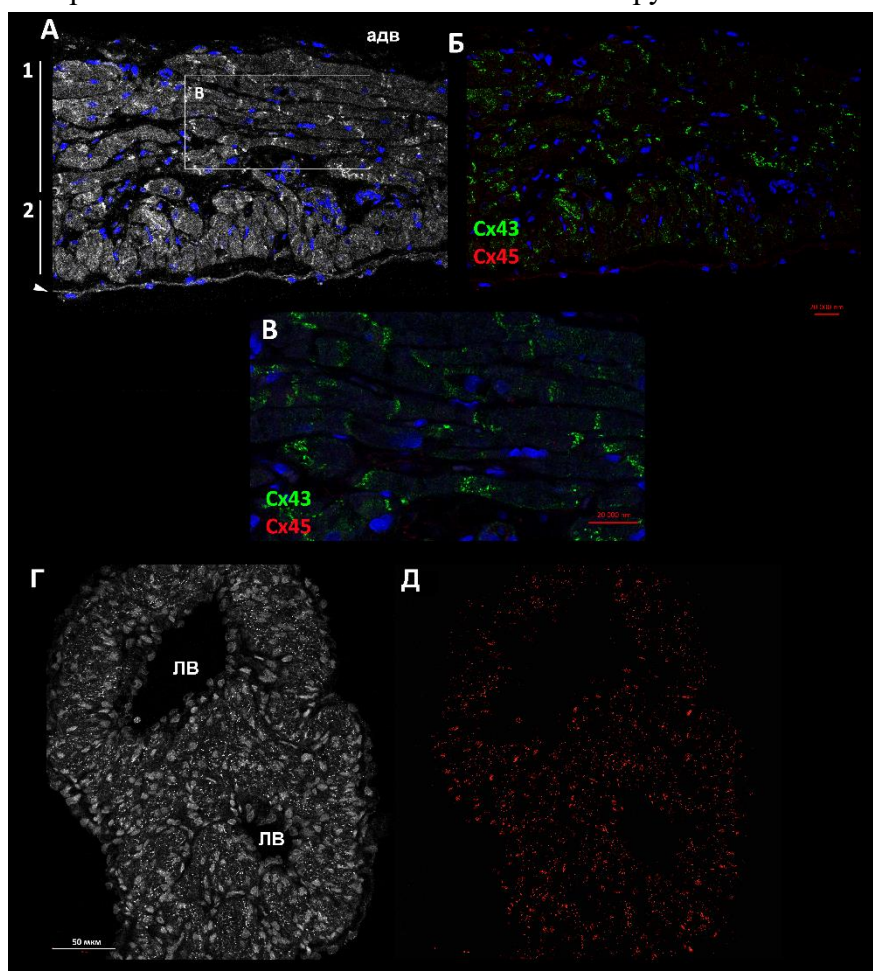


Рис.6. Иммуноэкспрессия белков щелевых контактов Сх43, Сх45 и Сх40 в миокарде легочных вен взрослых крыс. **А.** Структура стенки легочной вены. 1 – внешний, радиальный слой кардиомиоцитов; 2 – внутренний, продольный (коаксиальный) слой миокардиальной ткани в ЛВ. Стрелка указывает на внутреннюю оболочку (*tunica intima*) стенки вены и слой гладкомышечных клеток. Адв – адвентиция. **Б, В.** Участки стенки легочной вены при разном увеличении. Флюоресценция Сх43, показанная зеленым псевдоцветом, обнаруживается в виде полос в области контактов между кардиомиоцитами. Специфическая флюоресценция Сх45 отсутствует (красный псевдоцвет). Ядра окрашены DAPI (синий псевдоцвет). **Г.** Структура среза легочной вены неонатальных (1 сут постнатальной жизни) крыс. **Д.** Флюоресценция Сх40 в ЛВ неонатальных крыс: показана красным псевдоцветом. лв – просвет легочной вены.

В миокарде легочных вен взрослых крыс специфическая флюоресценция, источником которой являются коннексины Cx40, не обнаружена. Однако, в миокардиальной стенке легочных вен неонатальных животных (1 сут постнатальной жизни) выявляется интенсивная специфическая флюоресценция Cx40. Иммуноэкспрессия Cx40 обнаруживается в виде цепочек «пятен» на периферии кардиомиоцитов, включая их торцевые и латеральные участки. Такой тип экспрессии белков щелевых контактов типичен для неонатального миокарда. (Рис. 6.Г, Д). Следует отметить, что в предсердном рабочем (непейсмекарном) миокарде взрослых крыс иммуногистохимическими методами экспрессия высокопроводящего коннексина также Cx40 не обнаруживается. В отличие от взрослых животных, в срезах предсердного миокарда, полученных от новорожденных крыс (1 сут постнатальной жизни), отчетливо выявляется специфическая флюоресценция Cx40.

Таким образом, предсердный миокард и миокард ЛВ крыс являются крайне сходными в плане экспрессии основных белков щелевых контактов, а также в плане онтогенетического изменения паттерна их экспрессии. Для миокардиальной ткани легочных вен не характерна экспрессия коннексинов типичных для зрелого «рабочего» (Cx43), но не пейсмекарного миокарда (Cx45, Cx40).

Влияние ацетилхолина на биоэлектрическую активность легочных вен

Ацетилхолин (АЦХ) в миокардиальной ткани ЛВ у крыс (а также у мышей и морских свинок) вызывает типичные изменения – снижение длительности ПД и гиперполяризацию. При действии 1 мкМ АЦХ длительность электрически вызванных ПД на уровне 90% реполяризации ЛВ крыс быстро уменьшается до 11 ± 1 мс ($n=6$) от 74 ± 3 мс в контрольных условиях (Рис.7.А, Б). Вызванная АЦХ в ЛВ и левом предсердии гиперполяризация составила 7 ± 2 и 4 ± 1 мВ ($p(U) < 0.05$), соответственно. Атропин (1 мкМ) полностью подавлял эффекты АЦХ в миокарде легочных вен крыс (Рис.7.В, Г). В покое миокарде ЛВ АЦХ в области устья вызывает гиперполяризацию на 9 ± 2 мВ ($n=15$), а в области бифуркации вены на $13 \pm 1,5$ мВ (от -67 ± 3 до $-80 \pm 2,5$ мВ, $n=15$).

Гиперполяризация, вызываемая АЦХ в ЛВ имеет статистически значимо большую величину ($p(U) < 0.05$), чем в предсердном миокарде. В тех случаях, когда прекращение стимуляции ЛВ приводило к деполяризации до -55 , -50 мВ АЦХ (1-2 мкМ) в таких случаях приводил к восстановлению возбудимости за счет быстрой (10 ± 3 с) гиперполяризации ПП до значений -80 ± 5 мВ ($n=3$). Восстановление возбудимости в таких экспериментах носило скачкообразный характер – через несколько секунд после установления ПП на гиперполяризованном уровне в ответ на возбуждающие стимулы в ЛВ возникали электрически вызванные ПД с быстрым фронтом (270 ± 20 В/с) и без низкоамплитудных форм, характерных для «медленного ответа» (Рис. 7. Д, Е). Таким образом, АЦХ может вызывать ЛВ как проаритмические эффекты укорачивая длительность ПД и рефрактерности, так и антиаритмические, восстанавливая возбудимость и предотвращая блоки проведения возбуждения в данной ткани.

Барий вызывает подавление гиперполяризующего эффекта ацетилхолина в легочных венах. Этот эффект наблюдается как в покое миокарде, так и при стимуляции/возбуждении легочных вен (Рис. 7.Ж). Известно, что в предсердном миокарде действие АЦХ обусловлено активацией калиевого АЦХ-зависимого ионного

тока, чувствительного к Ba^{2+} . Эффекты АЦХ в ЛВ обусловлены активацией М-холинорецепторов и, калиевого тока, чувствительного к бария.

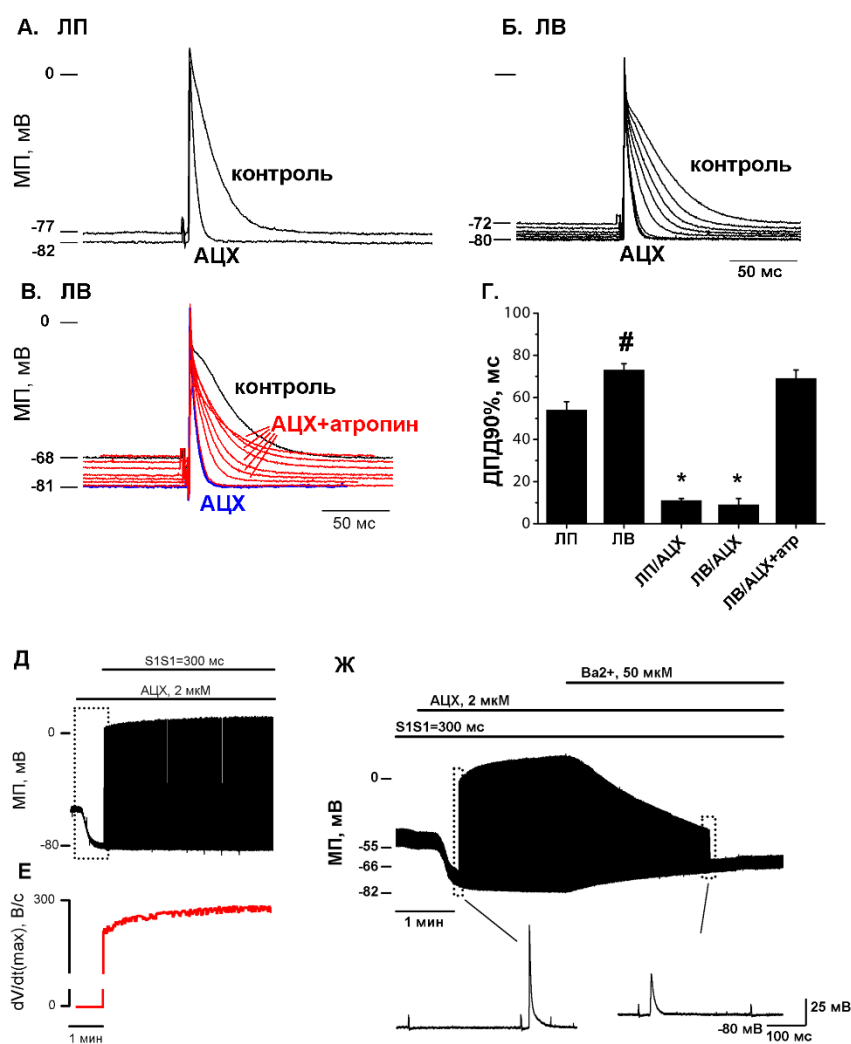


Рис.7. Влияние ацетилхолина на биоэлектрическую активность миокардиальной ткани легочных вен крысы. **А, Б.** Электрически вызванные потенциалы действия (ПД) в левом предсердии (ЛП), легочной вене (на уровне первой бифуркации ЛВ) крысы в контроле и при действии 1 мкМ ацетилхолина (АЦХ). **В.** Влияние атропина (1 мкМ) на ПД при действии АЦХ (1 мкМ). **Г.** Длительность ПД в предсердном миокарде и легочных венах крысы при действии ацетилхолина и подавление эффекта АЦХ атропином. **Д.** Восстановление возбудимости ЛВ после гиперполяризации, вызванной АЦХ. **Е.** Скорость нарастания фронта ПД в ЛВ сразу после восстановления имеет величину,

характерную для рабочего миокарда предсердий. **Ж.** Подавление барием гиперполяризации, вызванной ацетилхолином в ЛВ крысы, сопровождается деполяризацией и снижением амплитуды ПД. S1S1 – электрическая стимуляция с интервалами 250 мс. *, # - $p < 0.05$ (двухфакторная ANOVA, * - при сопоставлении с длительностью ПД в контроле; # - при сопоставлении ДПД в ЛВ и ЛП).

Эффекты агонистов адренорецепторов в миокардиальных рукавах легочных вен

Норадреналин (НА, 5-20 мкМ) оказывает многофазное действие на биоэлектрическую активность в легочных венах, что обусловлено различиями в кинетике передачи сигналов через сопряженные с α - и β -адренорецепторами внутриклеточных каскадов. Двухфазное изменение мембранного потенциала при действии НА в покое миокарде ЛВ сопровождается индукцией спонтанной активности (**Рис.8.А**).

Первой фазой после начала действия НА является гиперполяризация (11 ± 4 мВ, $p(T) < 0.05$, $n=25$), которая развивается в течение $1 \pm 0,5$ мин. Фазу гиперполяризации сменяет деполяризация. В ходе деполяризации, вызванной НА, ПП достигает -56 ± 4 мВ ($n=25$). Фаза деполяризации в большинстве экспериментов (22 из 25, 88%) оканчивалась

индукцией автоматической активности (спонтанных ПД) различного характера (**Рис.8.Б, В**). Автоматическую активность, которую НА вызывает в легочных венах, можно разделить на два типа: (1) залповая автоматическая (или спонтанная) активность и (2) автоматическая активность, имеющая квази-регулярный характер.

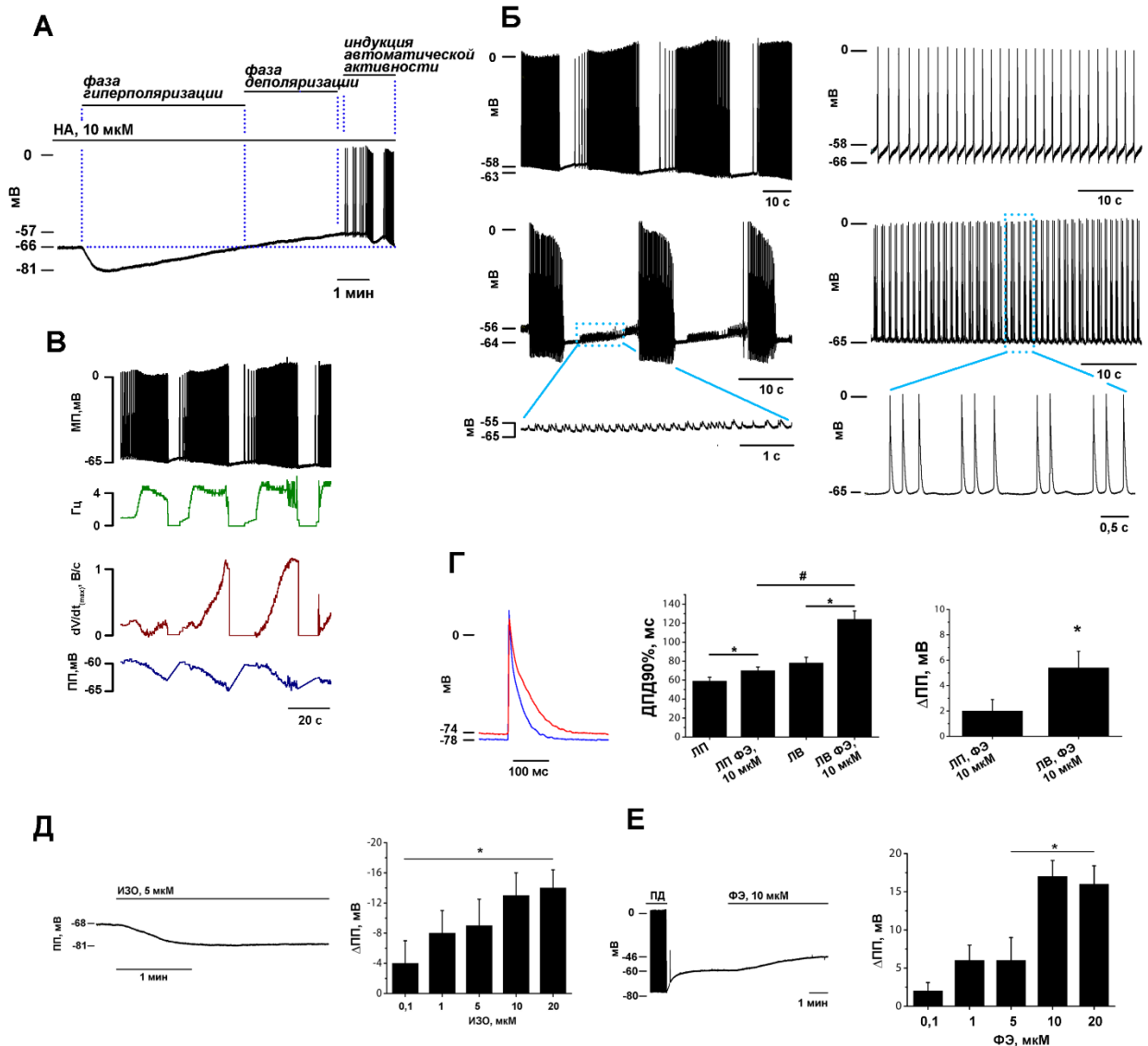


Рис. 8. Эффекты активации адренорецепторов в миокардиальной ткани легочных вен (ЛВ). **А.** Многофазный характер влияния норадреналина (НА) на потенциал покоя в легочных венах крысы и индукция НА залпов спонтанных ПД. **Б.** Спонтанная активность в ЛВ крысы, вызванная НА: (*слева*) автоматическая активность залпового характера и подпороговые колебания мембранного потенциала, предшествующие залпам спонтанных ПД; (*справа*) автоматическая активность регулярного характера. **В.** Характер и величины изменений частоты СПД в залпе, скорости нарастания фронта СПД и потенциала покоя в ходе залпов автоматической активности, вызванной НА. **Г.** Влияние агониста α-адренорецепторов фенилэфрина (ФЭ) на электрически вызванные ПД и потенциал покоя при электрической стимуляции (S1S1=300 мс) миокарда ЛВ. Примеры электрически вызванных ПД (*слева*) в контроле (синий) и после 5 мин действия 10 мкМ ФЭ (*красный*); длительность ПД (*в центре*); величина депполяризации при действии 10 мкМ ФЭ при постоянной электрической стимуляции в левом предсердии (n=5) и ЛВ (n=6, *справа*). **Д.** Гиперполяризация в покоемшемся миокарде ЛВ при действии агониста β-адренорецепторов изопротеренола (ИЗО). **Ж.** Депполяризация в покоемшемся миокарде ЛВ при действии ФЭ. *, # - p<0.05 (одно-или двухфакторная ANOVA, либо U-тест).

Блокаторы фосфодиэстераз (ИВМХ), активаторы аденилатциклазы (форколин), блокаторы натрий-кальциевого обменника (бензамил) и рианодиновых рецепторов (рианодин) разнонаправлено влияют на спонтанную активность, индуцированную норадреналином, что доказывает важную роль $[Ca^{2+}]_i$ в реализации этой активности.

Активация адренорецепторов в ЛВ влияла также на электрически вызванные ПД и ПП в покоящихся препаратах. Активация α_1 -адренорецепторов фенилэфрином (ФЭ, 10 мкМ) приводила к статистически значимому увеличению длительности электрически вызванных ПД, а также деполяризации в ЛВ (**Рис.8.Г**). Значимая деполяризация в легочных венах приводит к снижению скорости фронта и амплитуды ПД. В противоположность ФЭ, активация β -адренорецепторов изопротеренолом вызывала гиперполяризацию как при ритмической активации, так и в покоящихся препаратах ЛВ. ИЗО, как и АЦХ приводит к восстановлению возбудимости миокарда ЛВ (**Рис.8.Д**).

Фенилэфрин вызывал деполяризацию ПП в покоящихся ЛВ дополнительно к спонтанному сдвигу ПП, возникающему после прекращения электрической стимуляции (**Рис.8.Е**). Деполяризация, вызываемая ФЭ, является дозозависимой в диапазоне концентраций 5-10 мкМ. При действии ФЭ в концентрации 10 мкМ сдвиг ПП составлял $17 \pm 3,5$ мВ, а само значение ПП достигало -46 ± 8 мВ ($n=15$). Следует отметить, что эффект ФЭ развивался гораздо медленнее, чем эффект ИЗО. Деполяризация, вызванная ФЭ, по моменту возникновения соответствует второй фазе эффекта, наблюдаемого при действии норадреналина. Активация α_1 -адренорецепторов и индуцированная ей деполяризация необходима для индукции спонтанной активности в ЛВ.

Паттерн активации миокардиальной ткани легочных вен при холинергической и α -адренергической стимуляции

Ацетилхолин (АЦХ) не оказывает заметного влияния на характер активации и скорость проведения возбуждения в легочных венах крыс, мышей и морских свинок в условиях периодической стимуляции миокарда лёгочных вен ($n=7$), как и рабочего миокарда левого предсердия ($n=5$). Скорость проведения возбуждения в ЛВ в контрольных условиях при стимуляции с длительностью цикла (S1S1) 150-500 мс не отличается от таковой, регистрируемой в присутствии 1-5 мкМ АЦХ. В условиях стационарной активации ацетилхолин не вызывает в ЛВ возникновения зон функциональной невозбудимости или блоков проведения возбуждения. Однако АЦХ влияет на характер активации ЛВ крыс в том случае, когда возбуждение миокарда ЛВ является нерегулярным. Как указано выше, кратковременное (1 мин) прекращение стимуляции с последующим ее возобновлением приводит к снижению скорости проведения. АЦХ предотвращает снижение скорости проведения возбуждения, вызванное пребыванием ткани в состоянии покоя (**Рис. 9.А, Б**).

Адренергическая стимуляция вызывает существенные изменения паттерна активации миокарда ЛВ у крыс. Активация α_1 -адренорецепторов индуцирует блоки проведения возбуждения в ветвях ЛВ, но не в предсердном миокарде или устьях ЛВ при длительности межимпульсных интервалов, близкой к функциональному рефрактерному периоду (**Рис.9, В-Е**). Индуцированные ФЭ (10 мкМ) блоки проведения возникали во всех экспериментах ($n=10$), преимущественно в дистальной части ЛВ.

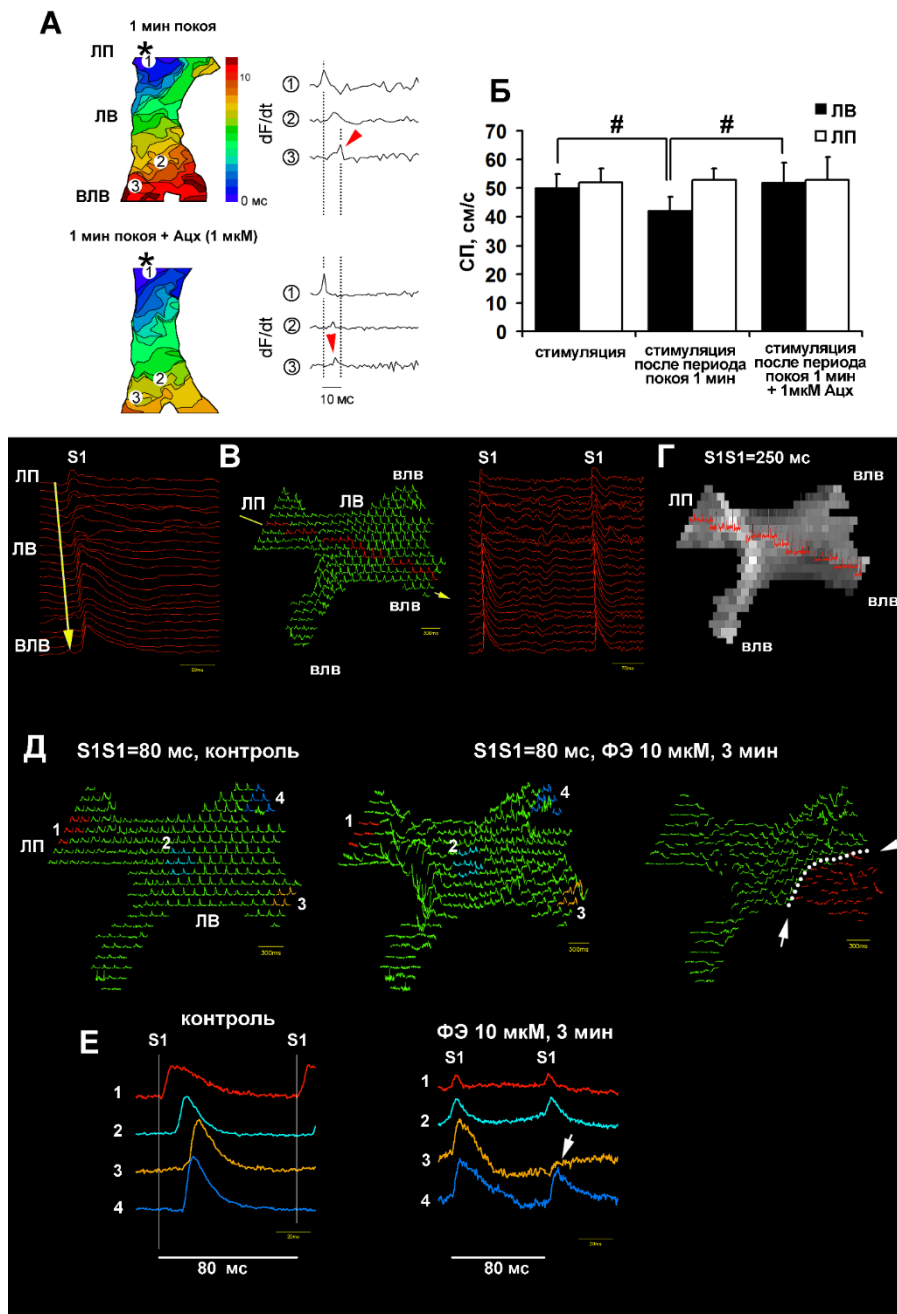


Рис. 9. Влияние ацетилхолина и агониста $\alpha 1$ -адренорецепторов фенилэфрина на проведение возбуждения в миокардиальной ткани легочных вен. **А.** Изохронная карта активации легочных вен после периода покоя длительностью 1 мин (*сверху*) в контроле и на фоне действия 1 мкМ АЦХ (*снизу*). Для сопоставления моментов активации дистального участка ЛВ справа приведены дифференцированные оптические сигналы (dF/dt) для точек 1, 2, 3. * - стимулирующие электроды. Красными стрелками показано уменьшение временного интервала между активацией предсердия и ветви ЛВ под действием АЦХ. **Б.** Скорость проведения (СП) возбуждения в ЛВ и левом предсердии при стимуляции; при возобновлении электрической стимуляции после 1 мин периода покоя в контрольных условиях, либо на фоне действия 1 мкМ АЦХ. # - $p < 0.05$

(ANOVA, тест Фридмана). **В.** Индивидуальные оптические ПД, регистрируемые в предсердии, устье ЛВ, легочной вене и ее ветви (показаны также красным на схеме справа) при распространении волны возбуждения, возникающей в контрольных условиях в ответ на электрические стимулы (S1), наносимые с интервалами 250 мс. Желтой стрелкой показана последовательность активации и индукции ПД в тканевом препарате. **Г.** То же, что и на В, но показаны два последовательных цикла (S1) возбуждения. **Д.** Схемы с оптическими ПД, регистрируемыми фотодиодами PDA-матрицы при стимуляции тканевого препарата ЛВ с интервалами 80 мс. ПД возникают в контрольных условиях (*слева*) в ответ на каждый стимул (S1) во всех участках препарата. Красным, голубым, синим и желтым цветом показаны оптические ПД в предсердии (1), стволе ЛВ (2), ветвях ЛВ (3, 4). В *центре* показано то же, что и *справа*, но для двух последовательных циклов. Активация $\alpha 1$ -адренорецепторов 10 мкМ ФЭ приводит к блоку проведения волны возбуждения, возникающей в ответ на каждый второй S1 стимул (в центре, *слева*) в ветви ЛВ. Пунктиром (*справа*) показана граница блока возбуждения при действии ФЭ. **Е.** Оптические сигналы, регистрируемые в предсердии (1), стволе легочной вены (2) и ее ветвях (3, 4) при стимуляции с интервалами (S1S1) 80 мс в контроле (*слева*) и через 3 мин после начала действия 10 мкМ ФЭ (*справа*). Белой стрелкой показано отсутствие возбуждения в ответ на очередной S1 стимул в ветви ЛВ. ВЛВ – ветвь легочной вены.

Кроме того, при стационарной электрической стимуляции ($S1S1=250$ мс) ФЭ снижает скорость проведения возбуждения (у крыс) на $24\pm 5\%$ ($n=10$, $p(T)<0,05$). Таким образом, эффекты активации $\alpha 1$ -адренорецепторов в ЛВ крысы противоположны эффектам АЦХ, а также демонстрируют пространственную неоднородность; адренергические блоки проведения возбуждения в ЛВ связаны с неравномерным увеличением ДПД и деполяризацией ПП, усилением пространственной гетерогенности электрофизиологических свойств ЛВ.

Хронотопография возбуждения в миокарде легочных вен при нестационарной активации

Паттерн активации в легочных венах, как и в предсердии, крыс слабо изменяется при уменьшении длительности интервалов между возбуждающими импульсами от 500 до 70 ± 10 мс. Дальнейшее уменьшение межимпульсных интервалов ($S1S1<70$ мс) приводит к возникновению циклических изменений паттерна активации и длительностей ПД (в 11 из 13). Повторяющиеся в последовательных циклах возбуждений изменения параметров электрической активности, т.е. осцилляции (иначе «поударные альтернации»), предшествуют в ЛВ возникновению периодики Венкебаха - то есть активации миокарда в ответ только на каждый второй возбуждающий импульс. Установление периодики Венкебаха указывает на то, что длительность межимпульсных интервалов соответствует длительности функционального рефрактерного периода (ФРП). Появление осцилляций/альтернаций в ЛВ указывает на функциональную, динамическую неоднородность данной ткани при интервалах стимуляции близких к ФРП. При периодике Венкебаха блок возбуждения в ответ на каждый второй импульс возникал в непосредственной близости к месту расположения стимулирующих электродов в проксимальном отделе ЛВ.

При длительности межимпульсных интервалов близкой или равной ФРП (± 2 мс) средняя скорость проведения возбуждения в ЛВ оказывалась статистически значимо (28 ± 7 см/с, $n=11$, $p(T)<0,01$) сниженной по сравнению со скоростью при $S1S1=300$ мс (51 ± 8 см/с), но, что более важно, возрастал пространственный разброс локальных скоростей проведения в ЛВ (что наглядно демонстрирует разброс изохронных линий на картах активации – **Рис.10**). В части экспериментов (3 из 11) альтернации возникали в нескольких участках (стволе и ветвях) тканевых препаратов легочных вен. Как правило, амплитуда осцилляций ДПД, а также величина пространственных альтернаций была большей в ветвях, чем в стволе легочных вен. Активация с интервалами близкими к ФРП в части экспериментов приводила к индукции блоков проведения возбуждения в ветвях ЛВ: динамически-индуцированные (функциональные) блоки проведения возникали циклически, реципрокно (поочередно) в одной из двух ветвей основного ствола ЛВ в дополнение к альтернациям хронотопографии возбуждения.

В миокарде гладкостенной части левого предсердия, в отличие от ЛВ, при активации с интервалами, близкими к ФРП, не наблюдали альтернаций ДПД и паттерна проведения возбуждения. При достижении ФРП в левом предсердии, в том числе и в пограничной зоне ЛП, происходило резкое установление периодики Венкебаха. Блок проведения возбуждения наблюдали только в одном эксперименте (1 из 11) в переходной зоне между ушком и свободной стенкой предсердия.

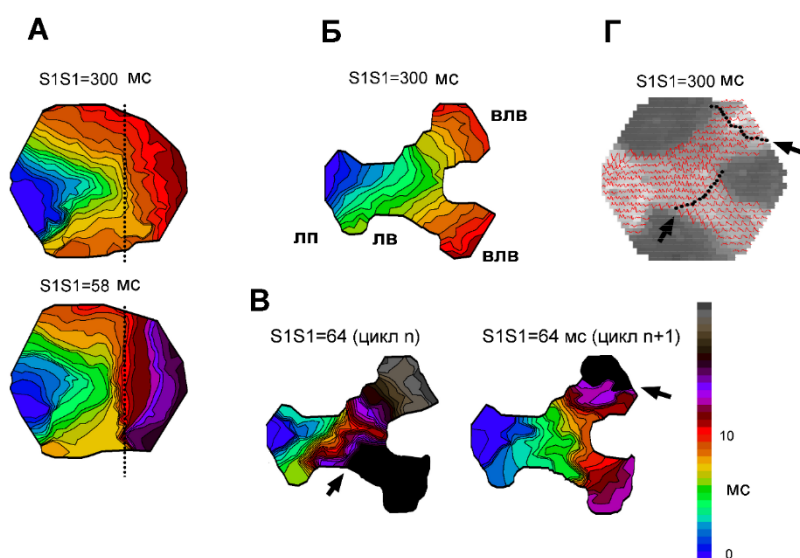


Рис.10. Функциональные реципрокные, периодические блоки проведения возбуждения в ветвях легочной вены. А. Репрезентативные примеры изохронных карт активации участка левого предсердия, включающего часть ушка (слева в каждой карте, отделено пунктиром) и часть свободной стенки (справа в каждой карте) предсердия, при длительности межимпульсных (S1S1) интервалов равной 300 мс (сверху) и длительности, соответствующей величине

функционального рефрактерного периода (ФРП, снизу). Б. Карта активации легочных вен (ЛВ) при длительности межимпульсных (S1S1) интервалов равной 300 мс. В. Карты активации того же самого участка ЛВ, что и на Б, но при длительности межимпульсного интервала 64 мс (ФРП=64 мс). Показаны карты активации для двух последовательных циклов возбуждения (n - слева и n+1 - справа). Видно, что паттерн активации в ЛВ при S1S1=64 мс существенно различается в двух последовательных циклах. Стрелкой показаны места блокады проведения в ветвях легочной вены для циклов n и n+1. Черным цветом показаны невозбудимые области. Г. Область съемки PDA-матрицы и оптические ПД, регистрируемые каждым фотодиодом. Стрелкой и пунктирной линией отграничены области, демонстрирующие периодическую функциональную невозбудимость. ЛП – левое предсердие; ВЛВ – ветвь легочной вены.

Влияние экзогенных микроРНК на автоматическую активность, вызванную нордреналином в легочных венах

В серии экспериментов исследовали способность микроРНК при системном введении изменять характер спонтанной активности в миокардиальной ткани легочных вен. В работе исследовали эффекты микроРНК, для которых подтверждено, что их экспрессия специфически повышена в миокарде предсердий и желудочков сердца.

Эксперименты проводили на тканевых препаратах, полученных от мышей гибридов В6СВАF1, демонстрирующих значительную склонность к эктопической активности. Для оценки эффектов микроРНК рассчитывали такие параметры как встречаемость (частота возникновения в экспериментах) осциллирующих спонтанных ПД, диастолической деполяризации, задержанных постдеполяризий и постпотенциалов, встречаемость залпового типа спонтанной активности в препаратах ЛВ от животных, получавших носитель (контрольная группа) либо одну из трех микроРНК. Кроме того, рассчитывали такие количественные характеристики как максимальная частота спонтанных ПД и частота постдеполяризий при залповом типе активности. Ни одна из трех микроРНК (miR-486-3p, miR-1, miR-133a-3p) не приводила к полному подавлению эктопической активности в легочных венах мышей В6СВАF1, а также не приводила к полной нормализации реполяризации спонтанных ПД гибридов В6СВАF1 в том случае, когда биоэлектрическую активность регистрировали 24 часа после введения микроРНК. Однако, каждая из исследованных микроРНК вызывала изменение отдельных

характеристик проаритмической биоэлектрической активности, свойственной легочным венам мышей в контрольных условиях, либо индуцированной норадреналином.

Так, при действии норадреналина в ЛВ животных, получавших miR-1, не возникали ранние постдеполяризации (Рис. 11). Остальные параметры не были изменены в данной группе. В базальных условиях введение miR-486-3p приводило (в противоположность miR-1) к статистически значимому увеличению встречаемости спонтанного сдвига ПП в интервалах между спонтанными потенциалами действия. Ни один из других параметров, как в базальных условиях, так и при действии НА, не был изменен у мышей, получавших miR-486-3p. Тем не менее, в миокарде ЛВ крыс miR-486-3p усиливала деполяризацию, предшествующую инициации залпов СПД при действии норадреналина. В ЛВ мышей, получавших miR-133a-3p, на фоне норадреналина наблюдали большее количество задержанных постдеполяризаций (т.е. усиление триггерной активности), а также большую встречаемость залпов спонтанных ПД, чем в контрольных условиях.

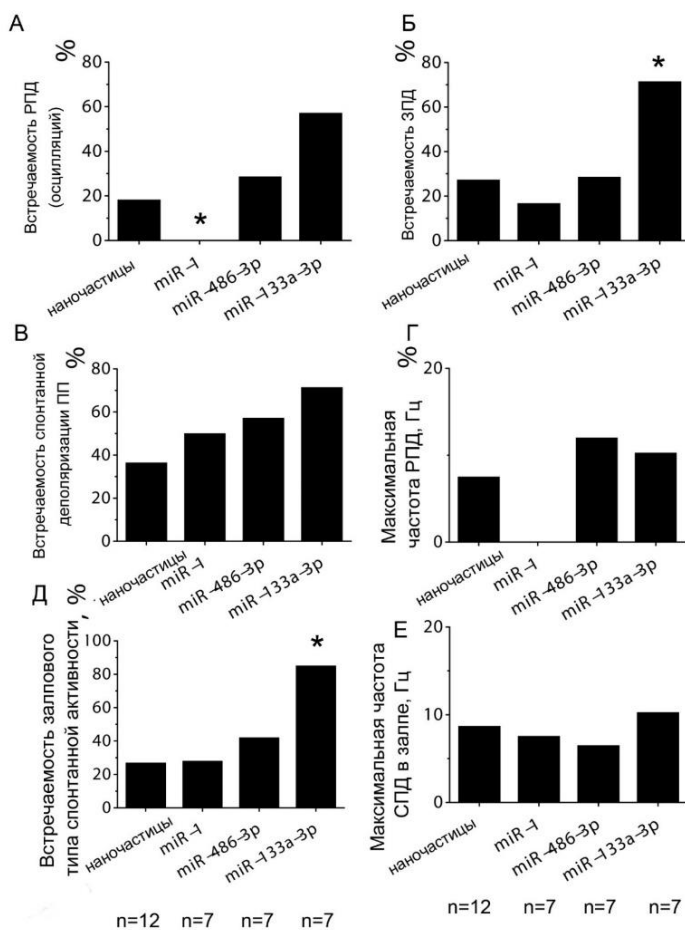


Рис.11. Характеристики эктопической активности и аномальных спонтанных потенциалов действия (СПД) в миокардиальной ткани легочных вен мышей B6CBAF1 на фоне норадреналина (10 мкМ) через 24 часа после введения микроРНК miR-1, miR-133a-3p, miR-486-3p или носителя (суспензии наночастиц). РПД – осцилляции мембранного потенциала по типу множественных ранних деполаризаций. ЗПД – множественные задержанные постдеполяризации (постпотенциалы). А. Встречаемость ранних постдеполяризаций; Б. Встречаемость задержанных постдеполяризаций; В. Встречаемость спонтанного сдвига потенциала покоя (по типу медленной диастолической деполаризации в синоа-атриальном узле); Г. Максимальная частота РПД; Д. Встречаемость залпового типа спонтанной активности; Е. Максимальная частота СПД в залпе.

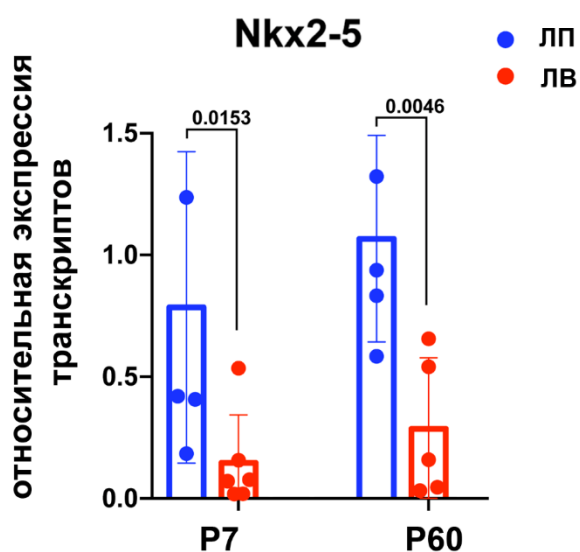
*- $p < 0.05$ (точный тест Фишера, микроРНК vs контроль (наночастицы)).

Таким образом, результаты наших экспериментов указывают на то, что miR-1 в легочных венах мышей гибридов B6CBAF1 предотвращает проаритмическую триггерную активность, подавляя постдеполяризации и способствуя поддержанию стабильного уровня потенциала покоя. В противоположность этому, miR-133a-3p стимулирует постдеполяризации, подавляет способность поддержания ПП и усиливает залповый проаритмический тип эктопической активности. МикроРНК miR-486-3p, вероятно, также вызывает проаритмические эффекты в легочных венах мышей, подавляя возможность

поддержания постоянного уровня ПП, однако в меньшей степени, чем miR-133a-3p. Таким образом, впервые установлено, что кардиоспецифические микроРНК могут модулировать эктопическую активность, вызванную норадреналином в миокардиальной ткани легочных вен. Комплексность эффектов микроРНК обусловлена множественностью их мишеней (мРНК) в кардиомиоцитах. Так нами установлено, что усиление адренергических проаритмических эффектов при действии miR-133a-3p происходит за счет подавления экспрессии в кардиомиоцитах протеинфосфатазы PPP2CA, усиления кальциевого ионного тока $I_{Ca,L}$, ослабления реполяризирующего тока I_{to} , а также накопления цАМФ в результате подавления экспрессии фосфодиэстераз.

Экспрессия транскрипционного фактора *Nkx2-5* в миокардиальной ткани легочных вен

Транскрипционный фактор (ТФ) *Nkx2-5* является одной из ключевых молекул, определяющих электрофизиологический фенотип кардиомиоцитов. Высокий уровень экспрессии *Nkx2-5* способствует формированию биоэлектрических свойств, характерных для рабочего миокарда. Предполагалось, что в процессе онтогенеза уровень экспрессии *Nkx2-5* в кардиомиоцитах легочных вен снижается, что делает эти клетки более сходными с клетками пейсмекерного миокарда. При оценке экспрессии *Nkx2-5* методом РВ-ПЦР установлено, что в ЛВ взрослых крыс уровень этого ТФ действительно низкий (**Рис. 12**)



по сравнению с миокардом левого предсердия. Однако, уровень экспрессии в ЛВ у крыс на 7 сут постнатальной жизни также оказывается статистически значимо сниженным по сравнению с миокардом неонатального предсердия. Таким образом, экспрессия *Nkx2-5* в легочных венах, по крайней мере у крыс, остается стабильно низкой, начиная с рождения до 60 дня постнатальной жизни.

Рис.12. Относительный уровень экспрессии транскрипционного фактора *Nkx2-5* в предсердном миокарде и миокарде легочных вен крысы на 7 и 60 сут постнатальной жизни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приоритет настоящей работы заключается в установлении нескольких электрофизиологических закономерностей, свойственных миокардиальной ткани легочных вен, которые отличают ее от «рабочего» миокарда предсердий и лежат в основе тканевых механизмов аритмогенеза.

В работе проведено систематическое исследование клеточных и тканевых электрофизиологических свойств, исследование нервной регуляции биоэлектрической активности миокарда легочных вен с использованием нескольких видов лабораторных животных: мышь, крыса, морская свинка и кролик. Проведенные исследования позволили установить, что нестабильность потенциала покоя, нарушение реполяризации

потенциалов действия, склонность к триггерной активности являются общими свойствами, характерными для миокардиальной ткани легочных вен всех изученных млекопитающих животных. Следует отметить, что для всех животных, за исключением мышей определенных линий, характерен низкий уровень базальной автоматии, а проаритмическая эктопическая активность формируется в ЛВ при адренергической стимуляции ткани [Кузьмин и др., 2017; Кузьмин, Розенштраух, 2012]. Важно отметить, что в данной работе впервые удалось выявить уникальный межлинейный гибрид мышей (B6CBAF1), у которых миокардиальная ткань легочных вен демонстрирует крайне интенсивную триггерную активность в базальных условиях и может быть, таким образом, рассмотрена в качестве генетически-обусловленной модели аритмогенеза [Kuzmin et al., 2021c; Потехина и др., 2019a].

В настоящей работе впервые показано, что при стационарном (ритмическом, непрерывном) режиме активации возбуждение распространяется в интактном миокарде легочных вен изученных лабораторных животных с параметрами близкими к таковым в предсердиях. Локальные участки с подавленным проведением или даже невозбудимые области миокарда могут формироваться в ткани легочных вен и при стационарном режиме активации, однако, по-видимому, только при воздействии дополнительных факторов, например, растяжении [Кузьмин, Розенштраух, 2012]. Нестационарный режим активации или адренергическая стимуляция вызывают в легочных венах локальное снижение скорости проведения, альтернации и блоки проведения возбуждения, провоцируя возникновение контуров циркуляции возбуждения и аритмогенез. Важное значение имеет установление того факта, что предрасположенность к нарушенному проведению возбуждения в легочных венах, обусловлена не столько сниженной электрической сопряженностью миокарда [Кузьмин и др., 2015], сколько тканевой гетерогенностью биоэлектрических характеристик, т.е. разбросом локальных значений длительности ПД, уровня ПП, длительности рефрактерности [Potekhina et al., 2019; Egorov et al., 2015].

Впервые обнаружено, что $\alpha 1$ -адренергическая составляющая симпатической регуляции является фактором, необходимыми для возникновения проаритмической активности в легочных венах. Установлено, что в миокардиальной ткани легочных вен обнаруживается высокий уровень экспрессии $\alpha 1$ -адренорецепторов как на уровне мРНК, так и на уровне белка [Kuzmin et al., 2021]. Показано, что активация $\alpha 1$ -адренорецепторов кардиомиоцитов легочных вен сдвиг мембранного потенциала в сторону деполяризации и спонтанные потенциалы действия, являющиеся триггерными событиями, способными вызвать внеочередную волну возбуждения в легочных венах и предсердном миокарде. Впервые установлено, что активация $\alpha 1$ -адренорецепторов влияет не только на формирование триггеров в легочных венах, но делает миокард ЛВ подходящим субстратом для формирования фибрилляторных контуров, подавляя распространение и индуцируя блоки проведения возбуждения. Такого обоюдного эффекта не оказывает β -адренергическая или холинергическая составляющие вегетативной нервной системы, стимулирующие только триггерную активность [Кузьмин, Розенштраух, 2012], либо только облегчающие возникновение контуров циркуляции возбуждения за счет снижения длины волны и рефрактерности соответственно. Важно отметить, что, как и в предсердиях, холинергические эффекты в легочных венах реализуются в основном за счет

активации рецепторов ацетилхолина М2-типа, хотя частично могут быть опосредованы рецепторами М1- и М3-типа [Иванова и др., 2018].

Таким образом, для миокарда легочных вен показана значительная тканевая гетерогенность биоэлектрических свойств. Усиление тканевой гетерогенности, возможно, является еще одним – третьим, механизмом, посредством которого активация $\alpha 1$ -адренорецепторов способствует аритмогенезу в легочных венах.

Помимо доминантного, нормального ритмоводителя сердца и миокарда легочных вен, внеузловой автоматической активностью обладает целый ряд структур в суправентрикулярном отделе сердца [Кузьмин и др., 2017]. К таким структурам относятся миокардиальная ткань полых [Ivanova et al., 2021; 2019] и непарной вены [Ivanova and Kuzmin, 2017], миокардиальные участки предсердной перегородки [Pustovit et al., 2022], миокардиальная ткань стенки коронарного синуса [Leonidova et al., 2017]. Продемонстрировано, что вышеперечисленные структуры обладают различной, вероятно, меньшей аритмогенностью, чем миокардиальная ткань легочных вен [Кузьмин и др., 2017; Кузьмин, Розенштраух, 2010]. Тем не менее, как и в легочных венах активация $\alpha 1$ -адренорецепторов вызывает в вышеперечисленных наджелудочковых структурах деполяризацию ПП, изменение длительности ПД, и что наиболее важно, нарушения проведения волны возбуждения. Результаты настоящей работы позволяют предположить, что проаритмические эффекты активации $\alpha 1$ -адренорецепторов характерны для всех участков сердца, склонных к эктопической автоматии. Таким образом, в работе впервые продемонстрирован новый тканевой механизм аритмогенеза, реализуемый симпатическими воздействиями посредством адренорецепторов $\alpha 1$ -типа. Данные касательно участия $\alpha 1$ -адренергической компоненты симпатической нервной регуляции в аритмогенезе могут быть учтены при разработке новых подходов к терапии тахиаритмий и фибрилляции предсердий.

Впервые установлено, что микроРНК (миР-133а-3р, миР-486-3р, миР-1) [Aminua et al., 2021], уровень экспрессии которых повышен в рабочем миокарде предсердий и которые подавляют экспрессию белков, характерных для пейсмекерных кардиомиоцитов САУ, наряду с другими факторами [Потехина и др., 2019; Каримова и др., 2016], могут модулировать эктопическую автоматию, индуцированную норадреналином в миокардиальной ткани легочных вен. В работе продемонстрировано, что вышеуказанные микроРНК вызывают разнонаправленное изменение отдельных параметров, характеризующих базальную или адренергическую автоматию в легочных венах. Показано, что миР-1 предотвращает, а миР-133а-3р и миР-486-3р стимулируют эктопическую автоматию. Сложный характер действия микроРНК может быть обусловлен множественностью их внутриклеточных мишеней. В настоящее время показано, что внутриклеточными мишенями миР-486-3р являются, помимо прочих, мРНК адренорецепторов $\alpha 1$ -типа. Впервые продемонстрирована принципиальная возможность коррекции адренергической аритмогенной активности в легочных венах с помощью микроРНК. Результаты работы могут служить заделом для новой области электрофизиологии сердца – исследованию механизмов контроля адренергической эктопической автоматии в наджелудочковом миокарде со стороны малых некодирующих РНК и их комплексов. С прикладной точки зрения обнаружение нового механизма предотвращения эктопической активности в легочных венах может способствовать разработке принципиально новых способов терапии фибрилляции предсердий.

Показано, что тип биоэлектрической активности, базальная автоматия, чувствительность к адреностимуляции и адренергическая эктопическая автоматия в миокарде легочных вен меняется в ходе онтогенеза [Kuzmin et al., 2021]. Показано также, что изменение электрофизиологических свойств миокарда легочных вен в онтогенезе происходит при участии формирующегося симпатического отдела нервной системы [Потехина, 2020]. Проаритмические свойства не присущи миокарду легочных вен исходно и возникают в ходе развития (постнатального, у крыс): кардиомиоциты легочных вен приобретают признаки «электрофизиологического фенотипа», характерного для пейсмекерных клеток САУ. Для нас и для наших коллег оставался открытым вопрос: являются ли кардиомиоциты легочных вен близкими к пейсмекерным кардиомиоцитам по всем ключевым маркерам? Мы впервые установили, что для кардиомиоцитов ЛВ характерен низкий уровень ключевого транскрипционного фактора Nkx2-5, который стимулирует экспрессию ионных каналов и переносчиков, определяющих «рабочий» фенотип [Кузьмин и др., 2021]. Уровень экспрессии калиевых ионных каналов Kir2.x, необходимых для стабилизации ПП в миокарде ЛВ тоже низок, как в САУ [Ivanova and Kuzmin, 2018]. С другой стороны, кардиомиоциты легочных вен не экспрессируют коннексины «пейсмекерных» целевых контактов – Cx40, Cx45. По набору и уровню экспрессируемых коннексинов кардиомиоциты ЛВ не отличаются от кардиомиоцитов предсердий. Таким образом, электрофизиологический фенотип кардиомиоцитов легочных вен является «смещенным» к пейсмекерному фенотипу только по отдельным характеристикам.

Феномен онтогенетического преобразования свойств, а также избирательное, но в то же время множественное «смещение» электрофизиологических характеристик кардиомиоцитов позволяют предположить участие особого регуляторного механизма в формировании и поддержании аритмогенности миокарда легочных вен. Возможно, что особый паттерн экспрессии микроРНК является одним из таких механизмов, как это показано в настоящее время для САУ [Aminua et al., 2021]. «Смещенность» свойств ЛВ открывает возможность селективной коррекции фенотипа ЛВ, которая не затрагивала бы функционирование нормального ритмоводителя сердца, например, с помощью методов генной терапии.

В итоге, результаты работы (1) позволяют корректно соотносить результаты экспериментальных исследований с клиническими данными, касающимися индукции ФП и более полно интерпретировать эффекты антиаритмических соединений в миокарде легочных вен; (2) раскрывают новые механизмы аритмогенеза в миокарде легочных вен, а также (3) проясняют роль α -адренергической составляющей симпатической регуляции в формировании тахиаритмий.

ВЫВОДЫ

1. Для миокардиальной ткани легочных вен (ЛВ) всех изученных видов млекопитающих животных характерны нестабильный потенциал покоя и нарушения реполяризации спонтанных потенциалов действия. Для всех изученных видов животных, за исключением мышей отдельных линий, характерен низкий уровень проаритмической активности в базальных условиях; миокард ЛВ крыс и мышей является наиболее подходящим в качестве

- модельного объекта для изучения эктопии и тканевой гетерогенности как механизмов аритмогенеза в легочных вен.
2. Холинергическая стимуляция может вызывать в ЛВ как проаритмические, так и антиаритмические эффекты; адренергическая стимуляция при одновременной активации α - и β -адренорецепторов приводит к индукции различных форм автоматической активности.
 3. МикроРНК miR-486-3p, miR-1, miR-133a-3p модулируют базальную и адренергическую эктопическую автоматию в легочных венах;
 4. Для интактной миокардиальной ткани легочных вен свойственен предсердный тип проведения возбуждения при ритме, близком к ритму САУ, по крайней мере, у изученных животных; аритмогенные нарушения проведения возбуждения миокард легочных вен демонстрирует при нестационарном режиме активации ткани;
 5. Основным фактором, обуславливающим аритмогенный характер хронотопографии возбуждения является электрофизиологическая гетерогенность ткани, но не сниженная электрическая сопряженность кардиомиоцитов или сниженная экспрессия белков щелевых контактов.
 6. На тканевом уровне активация α 1-адренорецепторов кардиомиоцитов, но не β -адренергическая стимуляция, подавляет нормальное распространение волн возбуждения в миокарде легочных вен и является ключевым фактором аритмогенеза в данной ткани. Холинергическая стимуляция может способствовать нормальному проведению возбуждения в легочных венах.
 7. Кардиомиоциты легочных вен демонстрируют электрофизиологические свойства характерные как для пейсмекерного, так и для рабочего миокарда. Для кардиомиоцитов ЛВ, как и для кардиомиоцитов САУ, характерен низкий уровень ключевого транскрипционного фактора Nkx2-5, в то время как по набору экспрессируемых коннексинов кардиомиоциты ЛВ не отличаются от кардиомиоцитов предсердий.

**СПИСОК НАУЧНЫХ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ В ЖУРНАЛАХ SCOPUS, Web of Science (WOS), RSCI, А ТАКЖЕ В
ИЗДАНИЯХ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ ДЛЯ ЗАЩИТЫ В ДИССЕРТАЦИОННОМ
СОВЕТЕ МГУ 015.7, ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ ФИЗИОЛОГИЯ**

1. Pustovit K.B., SamoiloVA D.V., Abramochkin D.V., Filatova T.S., **Kuzmin V.S.** α 1-adrenergic receptors accompanied by GATA4 expression are related to proarrhythmic conduction and automaticity in rat interatrial septum // Journal of Physiology and Biochemistry. — 2022. (DOI:10.1007/s13105-022-00902-8, IF(2021)=4.020, WoS) (1,3/0,8)*
2. Ivanova A.D., Filatova T.S., Abramochkin D.V., Atkinson A. J., 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. — 2021. — Vol. 231, no. 4. — P. e13597. (DOI:10.1111/apha.13597, IF(2021)=7.523, WoS) (2.86/1)
3. Aminua 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 micrnas // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. — 2021. — Vol. 166, no. 86. — P. e13597. (DOI:10.1016/j.pbiomolbio.2021.04.008, IF(2020)=3,667, WoS) (2,2/0,5)
4. **Kuzmin V.S.**, Ivanova A.D., Filatova T.S., Pustovit K.B., Kobylina A.A., Atkinson A.J., Petkova M., Voronkov Y.I., Abramochkin D.V., Dobrzynski H. Micro-RNA 133a-3p induces repolarization abnormalities in atrial myocardium and modulates ventricular electrophysiology affecting *ica,l* and *ito* currents // *European Journal of Pharmacology*. — 2021. — Vol. 908. — P. 174369. (DOI:10.1016/j.ejphar.2021.174369, IF(2021)=4,432, WoS) (1,6/1,1)
 5. **Kuzmin V.S.**, Potekhina V.M., Odnoshivkina Y.G., Chelombitko M.A., Fedorov A.V., Averina O.A., Borodkov A.S., Shevtsova A.A., Lovat M.L., Petrov A.M. Proarrhythmic atrial ectopy associated with heart sympathetic innervation dysfunctions is specific for murine b6cbaf1 hybrid strain // *Life Sciences*. — 2021. — Vol. 266. — P. 118887. (DOI:10.1016/j.lfs.2020.118887, IF(2021)=5,037, WoS) (1,5/0,7)
 6. Abramochkin D.V., **Kuzmin V.S.**, Matchkov V., Kamensky A.A., Wang T. The pacemaker of snake heart is localized near the sinoatrial valve // *Journal of Experimental Biology*. — 2021. — Vol. 224, no. 16. — P. jeb.242778. (DOI:10.1242/jeb.242778, IF(2021)=3,308, WoS) (1,5/0,9)
 7. **Kuzmin V.S.**, Ivanova A.D., Potekhina V.M., Samoiloa D.V., Ushenin K.S., Shvetsova A.A., Petrov A.M. The susceptibility of the rat pulmonary and caval vein myocardium to the catecholamine-induced ectopy changes oppositely in postnatal development // *Journal of Physiology*. — 2021. — Vol. 599, no. 11. — P. JP280485. (DOI:10.1113/JP280485, IF(2021)=6,228, WoS) (3,1/2)
 8. **Кузьмин В.С.**, Каменский А.А. Молекулярные механизмы онтогенеза ритмоводителя сердца у позвоночных животных // *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология*. — 2021. — Т. 76, № 4. — С. 183–201. (IF(RINC2021)=1,077, Scopus) (2,4/2,1)
 9. **Кузьмин В.С.**, Кобылина А.А., Пустовит К.Б., Иванова А.Д., Абрамочкин Д.В. МикроРНК miR-133a-3p усиливает адренергическую проаритмическую активность в миокарде лёгочных вен крыс, повышая внутриклеточную концентрацию цАМФ // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2021. — Т. 172, № 12. — С. 664–668. (DOI:10.47056/0365-9615-2021-172-12-664-668, IF(2021)=0,804, Scopus) (0,66/0,4)
 10. Pustovit K.B., Potekhina V.M., Ivanova A.D., Petrov A.M., Abramochkin D.V., **Kuzmin V.S.** Extracellular ATP and β -NAD alter electrical properties and cholinergic effects in the rat heart in age-specific manner // *Purinergic Signalling*. — 2019. — Vol. 15, no. 1. — P. 107–117. (DOI:10.1007/s11302-019-09645-6, IF(2020)=3,765, WoS) (2,18/1,2)
 11. Ivanova A.D., Samoiloa D.V., Razumov A.A., **Kuzmin V.S.** Rat caval vein myocardium undergoes changes in conduction characteristics during postnatal ontogenesis // *Pflugers Archiv, European Journal of Physiology*. — 2019. — Vol. 471, no. 11. — P. 1493–1503. (DOI:10.1007/s00424-019-02320-0, IF(2021)=3,657, WoS) (2,0/1,0)
 12. Potekhina V.M., Averina O.A., Razumov A.A., **Kuzmin V.S.**, Rozenshtaukh L.V. The local repolarization heterogeneity in the murine pulmonary veins myocardium contributes to the spatial distribution of the adrenergically induced ectopic foci // *The Journal of Physiological Sciences*. — 2019. — Vol. 69, no. 6. — P. 1041–1055. (DOI:10.1007/s12576-019-00724-2, IF(2021)=2,781, WoS) (1,8/1,1)

13. Потехина В.М., **Кузьмин В.С.**, Абрамочкин Д.В. Внеклеточный диаденозинтетрафосфат подавляет эктопическую активность в миокардиальной ткани легочных вен у взрослых, но не у новорожденных крыс // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. — 2019. — Т. 74, № 1. — С. 34–41. (IF(RINC2021)=1,077, Scopus) (0,6/0,3)
14. Потехина В.М., Аверина О.А., **Кузьмин В.С.** Суправентрикулярный миокард сердца мышей В6СВАF1 проявляет генетически-обусловленную аритмогенность благодаря эктопической автоматии и триггерной активности // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. — 2019. — Т. 74, № 2. — С. 115–122. (IF(RINC2021)=1,077, Scopus) (0,9/0,5)
15. Ivanova A.D., **Kuzmin V.S.** Inhibition of inward rectifier potassium currents by chloroquine causes significant electrophysiological changes in the rat thoracic veins myocardium // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. — 2018. — Vol. 160, no. 4. — P. 645–653. (IF(RINC2021)=0,901, Scopus) (0,6/0,2)
16. Иванова А.Д., Тапилина С.В., **Кузьмин В.С.** Изучение роли ацетилхолиновых рецепторов М1-, М2- и М3-типов в регуляции электрической активности миокардиальной ткани полых вен в раннем постнатальном онтогенезе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2018. — Т. 166, № 10. — С. 404–409. (IF(2021)=0,804, Scopus) (0,74/0,24)
17. Abramochkin D.V., **Kuzmin V.S.**, Rosenshtraukh L.V. A new class iii antiarrhythmic drug niferidil prolongs action potentials in guinea pig atrial myocardium via inhibition of rapid delayed rectifier // Cardiovascular Drugs and Therapy. — 2017. — Vol. 31, no. 5. — P. 525–533. (DOI:10.1007/s10557-017-6762-x, IF(2020)=3,727, WoS) (1,1/0,4)
18. Bogus S.K., **Kuzmin V.S.**, Abramochkin D.V., Suzdalev K.F., Galenko-Yaroshevsky P.A. Effects of new antiarrhythmic agent ss-68 on excitation conduction, electrical activity in purkinje fibers and pulmonary veins: Assessment of safety and side effects risk // Journal of Pharmacological Sciences. — 2017. — Vol. 133, no. 3. — P.122-129. (DOI:10.1016/j.jphs.2017.01.008, IF(2021)=3,578, WoS) (0,9/0,6)
19. 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. — P. 1–12. (DOI:10.1007/s12576-017-0569-1, IF(2021)=2,781, WoS) (1,4/0,6)
20. Иванова А.Д., **Кузьмин В.С.**, Розенштраух Л. В. β -адренергическая стимуляция вызывает проаритмическую активность в миокардиальной ткани полых вен // Доклады Академии наук. — 2017. — Т. 476, № 2. — С. 237–241. (DOI:10.7868/S0869565217260255, IF(RINC2019)=0,783, Scopus) (0,72/0,4)
21. Каримова В.М., **Кузьмин В.С.**, Розенштраух Л.В. Внутриклеточные молекулярные механизмы адренергической регуляции мембранного потенциала миокарда легочных вен // Кардиология. — 2017. — Т. 57, № 11. — С. 34–41. (DOI:10.18087/cardio.2017.11.10052, IF(RINC)=0,777, Scopus) (0,9/0,5)
22. **Кузьмин В.С.**, Алексеева Н.В., Розенштраух Л.В. Миокардиальная ткань торакальных вен позвоночных животных: происхождение и контроль биоэлектрических свойств // Успехи физиологических наук. — 2017. — Т. 48, № 3. — С. 3–28. (IF(RINC2019)=0,509, Scopus) (3/2,8)
23. Pustovit K.B., **Kuzmin V.S.**, Abramochkin D.V. Diadenosine tetra- and pentaphosphates affect contractility and bioelectrical activity in the rat heart via p2 purinergic receptors //

- Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. — 2016. — Vol. 389, no. 3. — P. 303–313. (DOI:10.1007/s00210-015-1199-x, IF(2021)=3,195, WoS) (1,3/0,6)
24. **Kuzmin V.S.**, Pustovit K.B., Abramochkin D.V. Effects of exogenous nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) in the rat heart are mediated by P2 purine receptors // Journal of Biomedical Science. — 2016. — Vol. 23, no. 1. — P. 50. (DOI:10.1186/s12929-016-0267-y, IF(2021)=8,41, WoS) (1,3/0,8)
25. Каримова В.М., Пустовит К.Б., Абрамочкин Д.В., **Кузьмин В.С.** Влияние пуриновых комедиаторов на автоматическую активность, вызванную норадреналином в миокардиальных рукавах легочных вен // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2016. — Т. 162, № 11. — С. 536–542. (IF(2021)=0,804, Scopus) (0,8/0,3)
26. Каримова В.М., **Кузьмин В.С.**, Ундровинас Н.А., Розенштраух Л.В. Роль цитоплазматического кальция в регуляции потенциала покоя миокарда лёгочных вен крыс и мышей // Доклады Академии наук. — 2016. — Т. 469, № 2. — С. 260–263. (DOI:10.7868/S0869565216200287, IF(RINC2019)=0,783, Scopus) (0,5/0,25)
27. Egorov Y.V., **Kuzmin V.S.**, Glukhov A.V., Rosenshtraukh L.V. Electrophysiological characteristics, rhythm, disturbances and conduction discontinuities under autonomic stimulation in the rat pulmonary vein myocardium // Journal of Cardiovascular Electrophysiology. — 2015. — Vol. 26, no 10. — P. 1130-1139. (DOI:10.1111/jce.12738, IF(2021)=2,942, WoS) (1,2/0,4)
28. **Кузьмин В.С.**, Егоров Ю.В., Каримова В.М., Розенштраух Л.В. Оценка константы длины в предсердном миокарде и миокардиальной обкладке легочных вен млекопитающих // Доклады Академии наук. — 2015. — Т. 460, № 3. — С. 1–5. (DOI:10.7868/S0869565215030299, IF(RINC2019)=0,783, Scopus) (0,7/0,4)
29. **Кузьмин В.С.**, Розенштраух Л.В. Автоматическая активность в миокарде легочных вен крысы при действии изопротеренола и бария // Доклады Академии наук. — 2012. — Т. 444, № 4. — С. 452–456. (DOI:10.1134/S0012496615010093, IF(RINC2019)=0,783, Scopus) (0,6/0,5)
30. Егоров Ю.В., Столбова В.И., **Кузьмин В.С.**, Розенштраух Л. В. Влияние антиаритмического препарата 3-его класса Ниферидила (РГ-2) на биоэлектрическую активность миокарда легочных вен // Кардиология. — 2012. — № 2. — С. 47–51. (IF(RINC)=0,777, Scopus) (0,6/0,15)
31. **Кузьмин В.С.**, Розенштраух Л.В. Изменение возбудимости миокарда легочных вен крысы при адренергическом воздействии // Доклады Академии наук. — 2012. — Т. 443, № 4. — С. 516–519. (IF(RINC2019)=0,783, Scopus) (0,45/0,4)
32. **Кузьмин В.С.**, Розенштраух Л.В. Изучение распространения возбуждения в миокарде легочных вен крысы с использованием метода оптического картирования // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. — 2012. — Т. 98, № 9. — С. 1119–1130. (IF(RINC)=0,514, RSCI) (1,4/1,3)
33. **Кузьмин В.С.**, Розенштраух Л.В. Ионные механизмы действия антиаритмических препаратов III класса // Кардиология. — 2010. — Т. 50, № 7. — С. 49–61. (IF(RINC)=0,777, Scopus) (1,5/1,4)
34. **Кузьмин В.С.**, Розенштраух Л.В. Современные представления о механизмах возникновения фибрилляции предсердий. Роль миокардиальных рукавов в легочных венах // Успехи физиологических наук. — 2010. — Т. 41, № 4. — С. 3–26. (IF(RINC2019)=0,509, Scopus) (2,8/2,5)

* – Объем в условных печатных листах/вклад автора в условных печатных листах.

**ОСНОВНЫЕ ТЕЗИСЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В
ЖУРНАЛАХ SCOPUS, WOS, RSCI**

1. **Kuzmin V.S.**, Ivanova A.D., Ushenin K.S., Razumov A.A. Optical mapping of the sinus venosus elucidates the thoracic veins derived pro-arrhythmic ectopy // *Acta Physiologica* (Abstracts from The Annual Meeting of The Scandinavian Physiological Society). — 2019. — Vol. 227, Suppl. 721. — P. 6. (IF = 5.868, WoS)
2. Ivanova A.D, **Kuzmin V.S.** Acetylcholine affects the electrical properties of neonatal caval vein myocardium via noncanonical mechanism // Abstracts from The Annual Meeting of The Scandinavian Physiological Society. *Acta Physiologica*. — 2019. — Vol. 227. — P. 41. (IF = 5.868, WoS)
3. Ivanova A.D, **Kuzmin V.S.**, Filatova T.S. Caval vein myocardium demonstrates automaticity and properties of a leading pacemaker // *EP Europace*. — 2019. — Vol. 21, Suppl. 2. — P. ii750. (IF = 5.231, WoS)
4. Abramochkin D.V., **Kuzmin V.S.**, Rosenshtraukh L.V. A new antiarrhythmic drug niferidil prolongs action potentials in guinea pig atrial myocardium via inhibition of potassium currents // *Europace*. — 2017. — Vol. 19, Suppl. 3. — P. iii117. (IF = 5.231, WoS)
5. Karimova V.M., **Kuzmin V.S.** Action potentials alteration and arrhythmogenic conduction disturbances under alpha-1-adrenoreceptor activation in the murine pulmonary vein // *Acta Physiologica*. — 2017. — Vol. 219, Suppl. S710. — P. 26. (IF = 5.868, WoS).
6. **Kuzmin V.S.**, Karimova V.M., Rozenshtraukh L.V. Adrenergic and rate control of excitation pattern in rat caval veins cardiac tissue // *Acta Physiologica*, - 2017. -Vol. 219, Suppl. S710. - P. 4. (IF = 5.868, WoS)
7. Karimova V.M., **Kuzmin V.S.** Mechanisms of beta-adrenergic regulation of bioelectric activity in murine pulmonary veins myocardium // *Acta Physiologica*. — 2017. — Vol. 221, Suppl. S713. — P. 117-118. (IF = 5.868, WoS)
8. Pustovit K.B, Pakhomov N.V, **Kuzmin V.S.** Extracellular diadenosine tetraphosphate affects contractility and cytoplasm calcium level via protein kinase c pathway // *Acta Physiologica*. — 2017. — Vol. 221, Suppl. S713. — P. 212. (IF = 5.868, WoS)
9. Leonidova S.V., Pustovit K.B, **Kuzmin V.S.** Pacemaker properties and adrenergic regulation of the rat coronary sinus myocardium // *Europace*. — 2017. — Vol. 19, no. 3. — P. iii240. (IF = 5.231, WoS)
10. Pustovit K. B., **Kuzmin V. S.**, Abramochkin D. V. Diadenosine polyphosphates alter heart bioelectrical activity in rodent and non-rodent via different receptors and signalling pathways // *Acta Physiologica*. — 2016. — Vol. 219. — P. 21. (IF = 5.868, WoS)
11. Karimova V.M., **Kuzmin V.S.** Adrenergic regulation of bioelectrical activity of rat pulmonary veins myocardium // *Acta Physiologica*. — 2015. — Vol. 215, Suppl. S706. — P. 66. (IF = 5.868, WoS)
12. **Kuzmin V.S.**, Egorov Y.V. Electrical propagation in the various sites of the pulmonary veins of mammalian // *Acta Physiologica* (Special Issue: Abstracts of the Joint meeting of the Federation of European Physiological Societies (FEPS) and the Hungarian Physiological Society, 27-30 August, Budapest, Hungary). -2014. - Vol. 211, Suppl. s697. - P. 10. (IF = 5.868, WoS)

13. Karimova V.M., **Kuzmin V.S.** Conduction of excitation in the rat atria and pulmonary veins under normal condition and after octanol application // *Acta Physiologica*. — 2014. — Vol. 211, Suppl. 697. — P. 100. (IF = 5.868, WoS)

ОСНОВНЫЕ ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ НА РОССИЙСКИХ И МЕЖДУНАРОДНЫХ КОНФЕРЕНЦИЯХ

14. **Кузьмин В.С.**, Иванова А.Д., Филатова Т.С., Пустовит К.Б., Абрамочкин Д.В. МикроРНК, специфические для пейсмейкерного миокарда, как регуляторы аритмогенной эктопической активности в сердце // «Физиология на марше 2021», Кардиологический вестник. Т.16. №2-2. 2021. С.35.
15. **Кузьмин В.С.**, Пустовит К.Б., Иванова А.Д., Воронина Я.А., Малыхина И.А., Кобылина А.А., Абрамочкин Д.В. МикроРНК miR-133a-3p как регулятор внутриклеточного сигнального каскада β -адренорецепторов в миокардиальной ткани легочных вен крыс // «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». Сборник статей. ФГБУН «ФИЦ» Пушинский НЦ биологических исследований РАН», Пушкино. 2021. Т.2. С. 415.
16. **Кузьмин В.С.**, Иванова А.Д., Пустовит, К.Б., Абрамочкин, Д.В. Роль микроРНК в контроле проаритмической эктопической автоматии в предсердном миокарде // «Физиология и патология кровообращения. VII всероссийская с международным участием школа-конференция». Тезисы докладов. РА ИЛЬФ. Москва. 2020. С. 67–68.
17. Иванова А.Д., **Кузьмин В.С.** Преобразование биоэлектрической активности миокардиальной ткани полых вен в ходе постнатального онтогенеза и некоторые механизмы её регуляции // «Третья молодежная школа-конференция Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций». Сборник материалов. М: Университетская книга. 2019. С. 14–15.
18. Филатова Т.С., Иванова А.Д., **Кузьмин В.С.** Экспрессия каналов HCN1/2/4 в миокардиальной ткани торакальных вен на разных этапах постнатального онтогенеза // Третья молодежная школа-конференция Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций. М: Университетская книга. 2019. С. 18–19.
19. **Kuzmin V.S.**, Potekhina V.M., Ivanova A.D., Abramochkin D.V. Electrical activity in the myocardium of thoracic veins and extra-nodal proarrhythmic automaticity during the development of mammalian heart // Abstract book “4th Congress of physiological sciences of Serbia with international participation. Serbia. Nish”. Belgrade: Serbian Physiological Society. 2018. P.54.
20. **Kuzmin V.S.**, Ivanova A.D. Age dependence of rat caval vein myocardial sleeve automaticity in early postnatal ontogenesis // IUPS 2017: The Rhythms of Life. Rio de Janeiro, Brazil. 2017. doi.org/10.36866/pn.109.14.
21. Karimova V.M., **Kuzmin V.S.** Ectopic excitation and conduction in murine thoracic veins cardiac tissue under adrenergic stimulation // IUPS 2017: The Rhythms of Life. Rio de Janeiro, Brazil. 2017. doi.org/10.36866/pn.109.14.
22. **Kuzmin, V.S.**, Klimov, E.A., and Abramochkin, D.V. Terrestrial anuran *Rana temporaria* avoids thermally induced heart failure due to maintenance of atrioventricular and ventricular conduction. // Abstract book of SEB Annual Meeting, Gothenburg, Sweden, 2017. P. 251–251.
23. Иванова, А.Д., **Кузьмин, В.С.** Автоматическая активность в миокарде полых вен крысы при холинергических и адренергических воздействиях на ранних этапах

- постнатального онтогенеза // Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. Издательство Истоки. Воронеж. 2017. С. 144–145.
24. Пустовит, К.Б., **Кузьмин, В.С.** Антиадренергические эффекты внеклеточного над+ у крыс в раннем постнатальном онтогенезе // «Вторая молодежная школа-конференция Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций». Сборник материалов. М: Университетская книга. 2017. С. 21–22.
 25. **Кузьмин, В.С.**, Каримова, В.М., Иванова, А.Д., Розенштраух, Л.В. Биоэлектрическая активность в миокардиальных структурах - производных эмбрионального венозного синуса у млекопитающих // Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. Издательство Истоки. Воронеж. 2017. С. 105–107.
 26. **Кузьмин В.С.** Миокардиальная обкладка торакальных вен позвоночных животных: происхождение, биоэлектрические свойства и возможные причины аритмогенности // «Вторая молодежная школа-конференция Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций». Сборник материалов. М: Университетская книга. 2017. С. 14.
 27. Потехина В.М., **Кузьмин В.С.** Влияние внеклеточного никотинамидадениндинуклеотида (НАД+) на биоэлектрическую активность в миокарде легочных вен крысят на разных стадиях развития // «Вторая молодежная школа-конференция Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций». Сборник материалов. М: Университетская книга. 2017. С. 20–21.
 28. Каримова, В.М., **Кузьмин, В.С.** Роль сигнального каскада бета-адренорецепторов и кальциевых каналов в индукции эктопической активности в миокарде легочных вен мышей // Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. Издательство Истоки. Воронеж. 2017. С. 146–148.
 29. **Кузьмин В.С.** Миокардиальная обкладка торакальных вен: происхождение и связь с предсердными аритмиями // «Тезисы докладов VI Всероссийской с международным участием школы – конференции по физиологии кровообращения». Москва. Издательство ООО «Макс Пресс». 2016. С. 14.
 30. Иванова, А.Д., **Кузьмин, В.С.** Влияние соединений-ингибиторов токов аномального выпрямления на биоэлектрическую активность миокардиальной ткани полых вен крысы // «Тезисы докладов VI Всероссийской с международным участием школы – конференции по физиологии кровообращения». Москва. Издательство ООО «Макс Пресс». 2016. С. 200.
 31. Каримова, В.М., **Кузьмин, В.С.** Роль цитоплазматического кальция в регуляции потенциала покоя миокарда легочных вен крысы // «Тезисы докладов VI Всероссийской с международным участием школы – конференции по физиологии кровообращения». Москва. Издательство ООО «Макс Пресс». 2016. С. 129.
 32. **Kuzmin V.S.**, Egorov Yu.V., Rosenshtraukh L.V. Conduction of excitation in the rabbit and rat pulmonary veins myocardium under normal conditions and parasympathetic stimulation // «37th (21-26 July 2013) congress of the International Union of Physiological Sciences at Birmingham, UK». IUPS 2013 Abstract book. 2013. P. 255P-256P.
 33. **Кузьмин В.С.**, Егоров Ю.В., Розенштраух Л.В. Биоэлектрическая активность миокарда легочных вен крысы и кролика: связь с возникновением и предотвращением фибрилляции предсердий // «XXII Съезд физиологического общества имени И.П.Павлова». Тезисы докладов. Издательство ВолгГМУ. 2013. С. 277.

34. **Кузьмин В.С.**, Егоров Ю.В. Автоматическая активность в миокарде легочных вен. Возможные механизмы и связь с фибрилляцией предсердий // «Тезисы докладов V Всероссийской с международным участием школы – конференции по физиологии кровообращения» Москва. Издательство ООО «Макс Пресс». 2012. С. 21.
35. **Кузьмин В.С.**, Егоров Ю.В. Розенштраух Л.В. Нестабильность мембранного потенциала миокарда легочных вен: связь с предсердными аритмиями // Научные труды III съезда физиологов СНГ «Физиология и здоровье человека». М.: Медицина–Здоровье. 2011. С. 135.
36. **Kuzmin V.S.**, Egorov Yu.V. Influence of the acetylcholine and the isoproterenol on the membrane potential in the rat pulmonary veins myocardium // «Turkish - FEPS Physiology Meeting». Abstract book. 2011. P. PC044.
37. **Кузьмин В.С.**, Абрамочкин Д.В., Сухова Г.С. Особенности биоэлектрической активности миокардиальных рукавов легочных вен, способствующие возникновению фибрилляции предсердий // Материалы 10-й юбилейной Всероссийской научной конференции с международным участием Физиологические механизмы адаптации растущего организма. Казань: изд-во ТГГПУ. 2010. С. 100–102.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЦХ - ацетилхолин
 ВЛВ – ветвь легочной вены
 ДДЛ – добавочная доля легкого
 ДПД – длительность потенциала действия
 ЗПД – множественные задержанные постдеполяризации (постпотенциалы)
 ИЗО - изопротеренол
 ЛВ – легочная вена
 ЛП – левое предсердие
 ЛДЛ – левая доля легкого,
 МДД - медленная диастолическая деполяризация
 МП – мембранный потенциал
 НА - норадреналин
 ПД - потенциал действия
 ПП - потенциал покоя
 РПД – осцилляции мембранного потенциала по типу множественных ранних деполяризаций.
 САУ - синоатриальный узел
 СВА – линия мышечной
 СПД – спонтанные потенциалы действия
 ССС - сердечно-сосудистая система
 ТФ – транскрипционный фактор
 цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
 ФП - фибрилляция предсердий
 ФРП - функциональный рефрактерный период
 ФЭ - фенилэфрин
 УЛП – ушко левого предсердия