

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Кузьмин Владислав Стефанович

ТКАНЕВЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОАРИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИОКАРДА
ЛЕГОЧНЫХ ВЕН

Специальность – 1.5.5 – физиология человека и животных

Диссертация на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант
доктор медицинских наук, профессор
Камкин Андрей Глебович

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	11
Актуальность темы исследования.....	11
Степень разработанности темы.....	13
Задачи исследования.....	15
Научная новизна исследования.....	16
Теоретическая и практическая значимость исследования.....	17
Положения выносимые на защиту.....	18
Методология и методы исследования.....	20
Степень достоверности данных.....	21
Личный вклад автора.....	22
Апробация материалов диссертации.....	22
Публикации.....	23
Структура и объем диссертации.....	23
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ	24
2.1. Миокардиальная ткань и кардиомиоциты стенки легочных вен у млекопитающих животных и человека: анатомо-морфологическая характеристика	25
2.1.1. Обнаружение и доказательство миокардиальной природы мышечной ткани среднего слоя стенки легочных вен.....	26
2.1.2. Ультраструктура кардиомиоцитов легочных вен.....	30
2.1.3. Пейсмекерные кардиомиоциты (Р-клетки) в стенке легочных вен.....	31
2.1.4. Организация миокардиальных рукавов легочных вен у разных представителей класса млекопитающих и человека.....	32
2.1.5. Экспрессия молекулярных маркеров миокарда в стенке легочных вен.....	34
<i>Экспрессия и секреция предсердного натрийуретического пептида кардиомиоцитами легочных вен</i>	34
<i>Экспрессия молекулярных маркеров кардиомиоцитов в ткани легочных вен</i>	36
2.2. Гипотезы происхождения, эмбриональное развитие и морфогенез миокардиальной ткани легочных вен	39
2.2.1. Ранние этапы кардиогенеза.....	40
2.2.2. Второе кардиогенное поле как источник прокардиогенных клеток-предшественников венозного полюса сердца.....	42

2.2.3. Молекулярные маркеры мезодермы кардиогенных полей.....	43
2.2.4. Морфогенез легочных вен как сосудистой структуры.....	45
2.2.5. Миграция, рекрутинг и трансдифференцировка прокардиогенных клеток при формировании миокарда легочных вен.....	47
2.2.6. Связь электрофизиологического фенотипа кардиомиоцитов и паттерна экспрессии транскрипционных факторов.....	48
2.2.7. Динамика формирования миокардиальных рукавов легочных вен.....	50
2.3. Гипотезы о функциональной роли миокардиальной ткани в стенке легочных вен млекопитающих животных.....	53
2.4. Миокардиальная ткань легочных вен как источник предсердных аритмий.....	57
2.4.1. Механизмы фибрилляции предсердий.....	57
2.4.2. Идентификация миокарда легочных вен, как основного источника эктопической, профибрилляторной активности.....	59
2.5. Механические и электрофизиологические свойства миокардиальной ткани легочных вен.....	63
2.5.1. Сократимость миокардиальной ткани легочных вен.....	63
2.5.2. Электрофизиологические свойства миокардиальной ткани легочных и полых вен.....	63
2.5.3. Характеристики основных ионных токов кардиомиоцитов легочных вен, определяющих тип электрической активности.....	69
2.5.4. Проаритмические свойства миокардиальной ткани легочных вен.....	71
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	74
3.1. Экспериментальные животные.....	74
3.2. Получение тканевых препаратов предсердий и легочных вен.....	75
3.3. Перфузия многоклеточных препаратов легочных вен.....	76
3.4. Регистрация биоэлектрической активности с помощью микроэлектродной техники.....	77
3.4.1. Экспериментальная установка для регистрации потенциала покоя и потенциалов действия.....	77
3.4.2. Регистрация потенциала покоя, потенциалов действия и спонтанной автоматической активности.....	78
3.4.3. Регистрируемые параметры.....	79
3.4.4. Экспериментальные протоколы.....	82
3.5. Картирование хронотопографии возбуждения в миокарде легочных вен.....	83

3.5.1. Принцип метода «оптического» картирования электрической активности и соотношение оптических и электрических сигналов.....	83
3.5.2. Экспериментальная установка для оптического картирования.....	87
3.5.3. Подготовка образцов для картирования биоэлектрической активности в препаратах легочных вен и левого предсердия.....	88
3.5.4 Анализ данных оптического картирования.....	94
3.6. Расчёт константы длины в миокардиальной ткани.....	95
3.7. Иммунофлюоресцентный анализ экспрессии белков в миокарде легочных вен.....	96
3.7.1. Получение тканевых образцов и приготовление парафиновых блоков.....	96
3.7.2. Иммунофлюоресцентное окрашивание.....	96
3.7.3. Получение конфокальных изображений и анализ распределения коннексинов в миокарде легочных вен.....	98
3.8. Флюоресцентная микроскопия катехоламин-содержащих волокон в миокарде легочных вен.....	99
3.8.1. Приготовление и окрашивание тканевых образцов легочных вен.....	99
3.8.2. Обработка конфокальных изображений и анализ распределения катехоламин-позитивных волокон в легочных венах.....	100
3.9. Оценка уровня экспрессии транскриптов Nkx2-5 методом РВ-ПЦР.....	102
3.9.1. Выделение РНК предсердного миокарда и миокарда легочных вен.....	102
3.9.2. Обработка ДНКазой I, проверка качества выделения РНК.....	103
3.9.3. Обратная транскрипция.....	103
3.9.4. Выделение геномной ДНК.....	104
3.9.5. Подбор праймеров.....	105
3.9.6. Проведение полимеразной цепной реакции.....	105
3.10. Статистические методы, использованные в работе.....	107
4. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	109
4.1 Строение миокардиальных рукавов легочных вен млекопитающих.....	109
4.1.1. Общая анатомическая организация легочных вен некоторых млекопитающих животных.....	109
4.1.1.1. Легочные вены крысы.....	109
4.1.1.2. Легочные вены мыши.....	111
4.1.1.3. Легочные вены кролика.....	112

4.1.2. Формирование миокардиальной ткани легочных вен млекопитающих в ходе онтогенеза.....	114
4.2. Биоэлектрическая активность миокардиальной ткани легочных вен млекопитающих.....	118
4.2.1. Биоэлектрическая активность миокардиальной ткани легочных вен крысы и ее регуляция.....	118
4.2.1.1. Потенциал покоя, потенциал действия и рефрактерность в легочных венах крысы.....	118
<i>Вызванные потенциалы действия в миокардиальной ткани легочных вен крысы.....</i>	<i>118</i>
<i>Рефрактерность в миокардиальной ткани легочных вен.....</i>	<i>118</i>
<i>Спонтанный сдвиг потенциала покоя в миокардиальной ткани легочных вен крысы..</i>	<i>118</i>
<i>Влияние режима возбуждения на биоэлектрическую активность в легочных венах...</i>	<i>120</i>
4.2.1.2. Влияние внеклеточного лития на биоэлектрическую активность легочных вен крысы.....	121
4.2.1.3. Влияние ацетилхолина на биоэлектрическую активность легочных вен крысы.....	122
<i>Влияние ацетилхолина на электрически вызванные ПД в миокарде легочных вен.....</i>	<i>122</i>
<i>Влияние ацетилхолина на ПП в покоящейся миокардиальной ткани легочных вен.....</i>	<i>123</i>
<i>Влияние ацетилхолина на возбудимость миокарда легочных вен.....</i>	<i>123</i>
<i>Влияние бария на потенциал покоя и электрически вызванные ПД при действии ацетилхолина в легочных венах.....</i>	<i>124</i>
<i>Эффекты ацетилхолина, выделяемого некантовым путем в миокарде легочных вен.....</i>	<i>125</i>
4.2.1.4. Эффекты норадреналина в миокардиальных рукавах легочных вен крыс.....	125
<i>Влияние норадреналина на потенциал покоя в миокардиальной ткани легочных вен крысы.....</i>	<i>125</i>
<i>Автоматическая активность, вызываемая норадреналином в легочных венах крысы.....</i>	<i>126</i>
<i>Залповая активность и конфигурация спонтанных ПД, вызванных норадреналином, при действии блокаторов α- и β-адренорецепторов в легочных венах крысы.....</i>	<i>129</i>
<i>Залповая активность, вызванная норадреналином, при действии агентов, влияющих на «круговорот» цитоплазматического кальция в легочных венах.....</i>	<i>131</i>
<i>Влияние режима возбуждения на автоматическую активность, индуцированную норадреналином, в легочных венах.....</i>	<i>133</i>
4.2.1.5. Эффекты активации β -адренорецепторов в миокарде легочных вен крыс.....	134

<i>Влияние активации β-адренорецепторов на электрически вызванные ПД в миокарде легочных вен</i>	134
<i>Влияние активации β-адренорецепторов на потенциал покоя в миокарде легочных вен</i>	135
<i>Восстановление возбудимости в легочных венах при активации β-адренорецепторов</i>	136
<i>Влияние атропина на эффекты агониста β-адренорецепторов изопроterenолола в миокарде легочных вен</i>	137
<i>Влияние бария на эффекты агониста β-адренорецепторов изопроterenолола в миокарде легочных вен</i>	138
<i>Влияние агентов, регулирующих внутриклеточный баланс цАМФ на потенциал покоя в легочных венах крысы</i>	142
4.2.1.6. Эффекты активации α1-адренорецепторов миокардиальных рукавов легочных вен крысы	143
<i>Влияние фенилэфрина на потенциал покоя в легочных венах</i>	143
<i>Влияние фенилэфрина на электрически вызванные потенциалы действия в легочных венах</i>	144
4.2.1.7. Влияние стимуляции интрамуральных постганглионарных нервов на биоэлектрическую активность миокардиальной ткани легочных вен крысы	145
4.2.1.8. Роль пеймекерного тока If в формировании биоэлектрической активности легочных вен крысы	146
4.2.1.9. Влияние факторов эндотелия на потенциал покоя и потенциалы действия в легочных венах крысы	147
<i>Роль эндотелия в регуляции потенциала покоя</i>	147
<i>Эндотелин-1</i>	148
<i>Внеклеточный калий</i>	148
<i>Влияние доноров оксида азота на потенциал покоя в миокарде легочных вен крысы</i> ..	149
4.2.2. Биоэлектрическая активность миокардиальной ткани легочных вен мыши и ее регуляция	150
4.2.2.1. Потенциал действия, потенциал покоя и спонтанная автоматическая активность в миокарде легочных вен мышей	150
<i>Вызванные потенциалы действия в миокардиальной ткани легочных вен мышей</i>	150
<i>Потенциал покоя</i>	152
<i>Автоматическая активность в миокардиальной ткани легочных вен мышей различных линий в базальных условиях</i>	153

<i>Автоматическая активность в миокардиальной ткани легочных вен мышей линии C57Bl/6, гибридов C57Bl/6/CBA в базальных условиях</i>	153
4.2.2.2. <i>Эффекты норадреналина в миокардиальных рукавах легочных вен мышей</i> ...155	
<i>Биоэлектрическая активность в миокарде легочных вен мышей линии BALB/c при действии норадреналина</i>	155
<i>Биоэлектрическая активность в миокарде легочных вен мышей линии CBA, C57Bl/6 и межлинейных гибридов B6CBAF1 при действии норадреналина</i>	156
<i>Залповая активность, вызванная норадреналином, при действии при действии антагонистов кальциевых каналов в легочных венах мышей</i>	158
4.2.2.3. <i>Эффекты активации β-адренорецепторов в миокарде легочных вен мышей</i> ..159	
<i>Влияние активации β-адренорецепторов на потенциал покоя и спонтанную активность в легочных венах мышей линии BALB/C</i>	159
4.2.2.4. <i>Эффекты активации α1-адренорецепторов миокардиальных рукавов легочных вен мышей</i>	160
<i>Влияние активации α-1-адренорецепторов на электрически вызванные потенциалы действия в легочных венах мышей линии BALB/C</i>	160
<i>Влияние активации α-1-адренорецепторов на потенциал покоя и спонтанную активность в легочных венах мышей линии BALB/C</i>	161
4.2.2.5. <i>Влияние экзогенных микроРНК на базальную автоматическую активность и автоматическую активность, вызванную норадреналином в легочных венах мышей B6CBAF1</i>	163
4.2.3. Биоэлектрическая активность миокардиальной ткани легочных вен кролика и ее регуляция	167
4.2.3.1. <i>Общая характеристика биоэлектрической активности миокарда легочных вен кролика в разных режимах работы</i>	167
4.2.3.2. <i>Влияние ацетилхолина на биоэлектрическую активность легочных вен кролика</i>	170
4.2.3.3. <i>Влияние активации адренорецепторов на биоэлектрическую активность легочных вен кролика</i>	171
<i>Влияние норадреналина на ПП в миокардиальной ткани легочных вен кролика</i>	171
<i>Влияние активации β-адренорецепторов на ПП в миокардиальной ткани легочных вен кролика</i>	172
<i>Влияние активации α1-адренорецепторов на ПП в миокардиальной ткани легочных вен кролика</i>	172

4.2.4. Биоэлектрическая активность миокардиальной ткани легочных вен морской свинки и ее регуляция.....	174
4.2.4.1.Общая характеристика биоэлектрической активности миокарда легочных вен морской свинки в разных режимах работы.....	174
4.2.4.2. Влияние ацетилхолина на биоэлектрическую активность легочных вен морской свинки.....	175
4.3. Хронотопография активации миокардиальной ткани легочных вен.....	178
4.3.1. Распространение возбуждения в миокардиальной ткани легочных вен крысы.....	178
4.3.1.1. Проведение возбуждения в различных отделах легочных вен крысы.....	178
4.3.1.2. Локальная гетерогенность проведения волны возбуждения в изолированных сегментах стенки легочных вен.....	183
4.3.1.3. Длина волны возбуждения в миокардиальной ткани легочных вен при стационарной активации.....	184
4.3.1.4. Влияние режима активации на проведение возбуждения в миокардиальной ткани легочных вен.....	186
4.3.1.5. Хронотопография возбуждения в миокарде легочных вен при нестационарной активации.....	188
4.3.1.6. Хронотопография возбуждения в миокарде легочных вен при нанесении внеочередных возбуждающих стимулов.....	193
4.3.1.7. Холинергическая регуляция проведения возбуждения в миокардиальной ткани легочных вен.....	195
4.3.1.8. Влияние активации адренорецепторов $\alpha 1$ -типа на характер проведения возбуждения в легочных венах крысы.....	197
4.3.1.9. Влияние октанола на проведение возбуждения в предсердном миокарде и миокарде легочных вен крысы.....	198
4.3.2. Распространение возбуждения в миокардиальной ткани легочных вен мыши.....	203
4.3.2.1.Хронотопография возбуждения при антероградном режиме активации.....	203
4.3.2.2. Хронотопография возбуждения при ретроградном режиме активации.....	204
4.3.2.3. Хронотопография возбуждения в миокарде легочных вен мыши при нанесении внеочередных возбуждающих стимулов.....	205
4.3.2.4. Влияние активации адренорецепторов $\alpha 1$ -типа на характер проведения возбуждения в легочных венах мыши.....	206

4.3.2.5. Эктопическая активация миокардиальной ткани легочных вен мыши при адренергической стимуляции.....	207
4.3.2.6. Эктопические очаги в миокардиальной ткани легочных вен мыши, индуцированные стимуляцией постганглионарных интрамуральных нервов.....	209
4.3.3. Распространение возбуждения в миокардиальной ткани легочных вен кролика.....	211
4.3.4. Распространение возбуждения в миокардиальной ткани легочных вен морской свинки.....	214
4.3.4.1. Хронотопография активации легочных вен морской свинки при стационарной и нестационарной активации.....	214
4.3.4.2. Хронотопография активации легочных вен морской свинки при холинергическом воздействии.....	218
4.3.5. Пассивные электрические характеристики миокарда легочных вен.....	220
4.4. Иммуноэкспрессия белков щелевых контактов в миокардиальной ткани легочных вен.....	222
4.5. Симпатическая иннервация легочных вен.....	227
4.5.1. Симпатическая иннервация миокардиальной ткани легочных вен крыс.....	227
4.5.2. Симпатическая иннервация миокардиальной ткани легочных вен мышей.....	231
4.6. Экспрессия транскрипционного фактора Nkx2-5 в миокардиальной ткани легочных вен.....	236
5.ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	237
5.1. Возможность применения тканевых образцов легочных вен грызунов в качестве модельных объектов при исследовании механизмов предсердных аритмий.....	237
5.2. Механизмы, обуславливающие спонтанную деполяризацию потенциала покоя в миокардиальной ткани легочных вен.....	240
5.3. Регуляция биоэлектрической активности миокардиальной ткани ЛВ нейромедиаторами вегетативной нервной системы.....	245
5.4. Гипотеза о частичной «фетализации» миокарда легочных вен как причины их аритмогенности.....	247
5.5. Нейромедиаторные факторы в индукции проаритмической активности в миокарде легочных вен.....	250

5.5.1. Влияние эндотелиальных факторов на биоэлектрические свойства миокардиальной ткани легочных вен.....	250
5.5.2. Потенциальная роль микроРНК в формировании эктопической автоматии миокарда легочных вен.....	252
5.6. Тканевые механизмы аритмогенности и особенности электрического сопряжения в миокардиальной ткани легочных вен.....	253
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	256
7. ВЫВОДЫ.....	260
8. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	261
9. СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	263

I. ВВЕДЕНИЕ

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 [Allessie 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 [Haissaguerre 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 слое (медии) 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; Pappone 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 заделом 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, иммунофлюоресцентной 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 щелевых 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 автоматию, 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 Nkx2-5), так и для «рабочего» предсердного миокарда (экспрессию Cx43, отсутствие Cx40).

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 автоматию 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 $\alpha 1$ -адренорецепторов вызывает снижение скорости и блоки поведения возбуждения в миокарде легочных вен. Активация $\alpha 1$ -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 флуоресцентных красителей. В сочетании с электрофизиологическими методами применен фармакологический анализ для выяснения механизмов эктопической активности в легочных венах. В работе использована (3) иммунофлуоресцентная конфокальная микроскопия, а также метод (4) гистохимического окрашивания нервных терминалей в ткани. Метод (5) РВ-ПЦР использован для оценки уровня экспрессии мРНК. Иммунофлуоресцентная микроскопия использована для идентификации в поперечных срезах легочных вен (1) маркеров кардиомиоцитов, (2) белков щелевых контактов с помощью специфических антител.

Электрофизиологические эксперименты проведены с использованием тканевых препаратов различных (внелегочных, внутрелегочных) 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 транслируемости 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, используется 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»; 14-04-01781а (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 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.

II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ

Специализированные поперечнополосатые мышечные клетки – кардиомиоциты – формируют ткань камер сердца. Основная мышечная часть стенки предсердий и желудочков сердца, сформированная кардиомиоцитами, называется миокардом. Помимо предсердий и желудочков у большинства низших (немлекопитающих) позвоночных животных, а также у млекопитающих в пренатальном периоде онтогенеза миокардиальную стенку, состоящую из кардиомиоцитов, имеет дополнительная камера сердца - венозный синус. Тем не менее, на эмбриональных, плодных пренатальных, постнатальных стадиях развития, а также у взрослых животных (млекопитающих, птиц, низших позвоночных) и человека кардиомиоциты могут обнаруживаться и за пределами камер сердца. Кардиомиоциты, обнаруживаемые за пределами камер сердца, могут образовывать как в самих желудочках, так и в предсердиях, функциональную ткань, которую можно было бы назвать «экстракардиальной» миокардиальной тканью. К настоящему времени показано, что вышеуказанная «экстракардиальная» ткань встречается в стенке основных, крупных торакальных (грудных) сосудов практически всех млекопитающих. Более того, эта ткань является неотъемлемым, нормальным элементом стенки торакальных сосудов, а также функциональным элементом сердечно-сосудистой системы (ССС).

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. Наиболее известным является феномен миокардиальной ткани легочных вен в связи с тем, что около двух десятилетий назад была установлена связь этой ткани с предсердными аритмиями и, в частности, с индукцией фибрилляции предсердий.

Экстракардиальная миокардиальная ткань в стенке торакальных сосудов не является изолированной. Эта ткань связана с миокардом стенки камеры сердца – правым или левым предсердием, правым желудочком (в случае легочного ствола). В стенке сосуда миокардиальная ткань может образовывать отдельные тяжи либо формировать сплошные слои, полностью охватывающие периметр сосуда на большем или меньшем удалении от его устья. Вследствие специфической анатомической организации для обозначения миокардиальной ткани торакальных сосудов были введены такие термины как «миокардиальные рукава» (*myocardial sleeve*), «миокардиальные муфты», «миокардиальная

обкладка» (*atrial sheath*) вен или аорты. Применительно к миокардиальной ткани в легочных венах уже более полувека назад предложены термины "coeur pulmonaire" [Guieysse-Pellisier, 1945] или «пульмонарный миокард» (*pulmonary myocardium*) [Favaro, 1910]. В настоящее время в научной литературе принято говорить о «миокарде легочных вен».

Исследование свойств кардиомиоцитов и миокардиальной ткани торакальных вен (легочных вен, в частности), выявление причин особых электрофизиологических свойств, а также их аритмогенности невозможно без понимания происхождения данной ткани. Поскольку объектом в данной работе является «миокард» именно легочных вен, ниже будут последовательно даны характеристики миокардиальной ткани этих вен, рассмотрены гипотезы происхождения и гипотезы о функциональной роли миокарда легочных вен у млекопитающих и человека; будут приведены известные данные о биоэлектрических свойствах миокардиальной ткани ЛВ.

2.1. Миокардиальная ткань и кардиомиоциты стенки легочных вен у млекопитающих животных и человека: анатомо-морфологическая характеристика

Легочные вены млекопитающих являются частью малого круга кровообращения, который, как известно, обеспечивает газообмен между кровью легочных капилляров и воздухом легочных альвеол. По легочным венам кровь, обогащенная в легких кислородом, притекает к сердцу. Кровь попадает в левое предсердие через устья легочных вен, располагающиеся в дорзолатеральном участке («крыше») стенки левого предсердия. Анатомически можно выделить два отдела легочных вен: внутрileгочные участки – то есть участки сосудов, располагающиеся внутри легочной ткани долей легких, а также «свободные» участки вен – то есть отрезки сосудов, начинающиеся от места выхода вен из долей легких (т.н. хилума легочных долей) до места их слияния с левым предсердием. Свободные участки легочных вен имеют одну или две бифуркации, так что в долю легкого может входить несколько ветвей легочной вены. Участки вены, располагающиеся дистальнее первой бифуркации, принято называть проксимальными, а участки, располагающиеся за границей первой бифуркации – дистальными. Следует также указать, что внелегочные участки вен могут быть разделены на внутри- и внеперикардиальные зоны. Таким образом, наиболее близким (проксимальным) отделом вены к устью в левом предсердии будет ее внутриверикардиальный внелегочный участок.

Стенку сосудов принято разделять на три слоя: внутренний слой (интиму), средний слой (медия) и внешний слой (адвентицию). Стенки легочных вен млекопитающих, в том числе и человека, имеют типичное для венозных сосудов строение: внутренняя поверхность

сосуда выстлана эндотелием, снаружи от которого располагается базальная пластинка – эти два слоя формируют интиму. Снаружи от базальной пластинки в стенке легочных вен располагается тонкий слой гладкомышечных клеток (ГМК), формируя первую часть меди. Толщина слоя ГМК клеток сильно варьирует в зависимости от отдела сосуда и вида животного; у мелких млекопитающих ГМК могут образовывать лишь один слой или даже не формировать единого слоя, обнаруживаясь в виде разрозненных островков клеток. Снаружи от ГМК клеток в зависимости от вида животного может располагаться более или менее выраженный слой эластических волокон (эластическая пластинка) [Hashizume et al., 1998].

Практически у всех мелких млекопитающих животных вплоть до самых дистальных внутрилегочных отделов вен, а у крупных млекопитающих и человека в проксимальных участках вен снаружи от ГМК и эластической пластинки располагается слой ткани, состоящий из сердечных мышечных клеток – кардиомиоцитов. Как будет показано далее, кардиомиоциты стенки легочных вен формируют сложным образом организованную миокардиальную ткань, которая в свою очередь, может иметь несколько различаемых клеточных слоев и охватывать периметр стенки вены полностью либо частично. Таким образом, медиа легочных вен состоит минимум из трех частей: ГМК, эластических волокон и миокардиальной ткани. Медиа легочных вен богата нервными окончаниями. Следует отметить, что такое же строение имеет стенка проксимальных участков верхней полой вены человека или краниальных вен мелких млекопитающих, некоторых низших позвоночных животных.

Снаружи от средней оболочки в легочных венах располагается адвентиция, включающая соединительнотканые элементы, фибробласты, адипоциты. Адвентиция проксимальных участков вен имеет собственные сосуды (*vasa vasorum*), также в адвентиции залегают крупные нервные стволы.

2.1.1. Обнаружение и доказательство миокардиальной природы мышечной ткани среднего слоя стенки легочных вен

Таким образом, организация среднего слоя стенки легочных вен (и торакальных вен в целом) отличается от периферических вен наличием «мышечных волокон» (согласно терминологии, что соответствует миокардиальной ткани в современной терминологии). Возможно, что впервые мышечные волокна в стенке торакальных вен были обнаружены более 200 лет назад, и это открытие было сделано при изучении строения полых, а не легочных вен: мышечные волокна в стенке этих вен описаны в целом ряде анатомических и медицинских трудов, начиная с 16-го и 17-го веков [Bidloo, 1685; Senac (de), 1774]. В

своих трудах датский анатом Джон Валеус описывает «мясистые волокна» укрывающие стенки полых вен в проксимальной их части у собак, быков и человека [WALE, 1641]. В более поздних работах описаны уже детали организации мышечной ткани вен: указывается, что тонкие «мышечные тяжи» у человека, перемежающиеся «жилистой» тканью, могут располагаться вокруг «венозных стволов» частично по спирали, а частично по кругу [von Soemmerring, 1792]. В диссертации по медицине 1836 года одного из учеников Яна Пуркинье, озаглавленной как «De arteriarum et venarum structura» [Raeuschel, 1836], дано четкое описание мышечных структур именно в среднем слое (медии) сосудов, а также указано, что мышечные структуры имеют протяженность вплоть до зоны ответвления подключичной вены в верхней полых вен, а в легочных венах человека - достигают зон бифуркации. В большей части современной литературы Рошель цитируется как «первооткрыватель» мышечной ткани торакальных, и в частности, легочных вен. В целом ряде руководств по анатомии и гистологии 1850-1860-х годов, в том числе и в руководстве, изданном под редакцией J Генле, указывается на присутствие «мускулатуры скелетного типа» или «сердечной мускулатуры» в стенке полых и легочных вен человека [Kölliker, 1854; Peaslee, 1857; Leydig, 1957; Hessling, 1866; Henle, 1868].

В широко известном детальном исследовании, посвященном эмбриональному развитию и перинатальному преобразованию торакальных и коронарных вен у человека, Джон Маршалл [Marshall, 1850] указывает, что стенка коронарного синуса, а также рудименты облитерированной кривой вены левого предсердия (известной в настоящее время как вена Маршалла) содержат мышечные волокна.

В более поздних работах уже приводится более детальное описание ткани, содержащей «поперечно-полосатые мышечные клетки» в стенке легочных вен человека, обезьяны и мелких млекопитающих, включая крыс [Elischer, 1869; Stieda, 1877]. Таким образом, присутствие миокардиальной ткани в стенке легочных вен грызунов выявлено почти полтора века назад. В 1877 в немецком журнале «Centralblatt für die medicinischen Wissenschaften» опубликована короткая работа Казанского профессора С. Арштейна, в которой дана гистологическая характеристика мышечным волокнам в стенке легочных вен крыс и мышей и показано, что по морфологическим признакам эти волокна не отличаются от «мышечных волокон» (миокардиальной ткани) предсердий [Arnstein, 1877].

В 1890-х годах выходит в свет несколько работ авторов из Италии и Японии [Akaza, 1899], посвященных тканевой организации поперечно-полосатой ткани в стенке легочных вен. Работы этих авторов стали основой для исследований в данной области итальянских и японских групп ученых в XX веке. В работе Piana G.P впервые показано, что «мышечная» (миокардиальная) ткань в стенке легочных вен крайне неоднородна, и у крупных животных

может формировать несколько слоев, включать ветвящиеся продольные, радиальные, диагональные пучки или тяжи миокардиальных волокон [Piana, 1893].

Таким образом, исследователи уже 19-го века имели глубокое представление о строении стенки торакальных вен и были осведомлены о существовании экстракардиальной мышечной ткани в торакальных сосудах человека и млекопитающих животных; имели представление о сложной организации миокардальной ткани легочных вен. Тем не менее, значительного внимания этому феномену уделено не было и к концу 19-го века исследования в области гистологии и физиологии «мышечной» ткани торакальных вен практически не проводились.

Внимание к торакальным венам было обращено уже в начале 20-го века на новом витке развития науки в области гистологии и физиологии сердечно-сосудистой системы. Миокардальная ткань в торакальных венах была «переоткрыта» Кейтом и Флаком – первооткрывателями доминантного ритмоводителя сердца - синоатриального узла (САУ). В одной из своих ключевых работ [Keith and Flack, 1907], посвященной поиску тканевой основы ритмоводителя сердца, вышеуказанными авторами установлено, что проксимальные участки легочных и полых вен человека имеют «миокардальную обкладку», непрерывно переходящую в миокардальную стенку камер предсердий. Кейтом и Флаком подчеркивается, что ткань в стенке торакальных вен является именно миокардом по своей природе.

В 1910 г. итальянский исследователь, профессор в области «художественной анатомии» Дж. Фаваро, используя новые в то время гистологические методы и основываясь на наблюдении Кейта и Флака, провел детальное исследование мышечной ткани в легочных венах ряда млекопитающих животных, человека и подтвердил ее миокардальный характер [Favaro, 1910]. Фаваро подтвердил тканевую связанность миокарда предсердий и ткани в стенке легочных вен, хотя, как указано выше, эта гипотеза была предложена ранее [Elischer, 1869; Keith and Flack, 1907]. Фаваро систематизировал известные на то время сведения о миокардальных волокнах в торакальных венах, а также ввел в употребление специальный термин - «пульмонарный миокард». Исследование строения миокардальной ткани легочных вен было продолжено известным Итальянским гистологом и эмбриологом, руководителем нескольких будущих Нобелевских лауреатов, Луиджи Буччианте [Bucciantè, 1940]. В его работах указывается на сложную тканевую организацию «пульмонарного миокарда».

В работе 1921 года было показано, что миокардальная ткань у крыс и мышей в стенке легочных вен распространяется вплоть до «тончайших» ветвей внутрилегочных сосудов [Garnel F. 1921]. Именно в данной работе впервые была выявлена такая

особенность грызунов как исключительно развитые, протяженные миокардиальные рукава торакальных вен. В данной работе также было показано, что цитоморфологически кардиомиоциты легочных вен крыс и мышей не отличаются от кардиомиоцитов предсердий. Эти наблюдения были подтверждены в ряде последующих работ [Kramer and Marks, 1965]. Впервые, гистологические особенности миокардиальной ткани ЛВ линейных мышей описаны в 1941 г, одной из сотрудниц недавно созданной Джексоновской Мемориальной Лаборатории [Fekete, 1941], известной в настоящее время как крупнейший в мире питомник линейных и генномодифицированных животных. Миокардиальная ткань была выявлена также в стенке ЛВ инбредных крыс. При окрашивании стенки легочных вен и их ветвей с помощью трихрома Массона в меди крыс линии Спрег-Доули была выявлена обширная поперечно-полосатая мускулатура (миокардиальная ткань) [Klavins, 1963].

В дальнейшем мышечная/миокардиальная ткань легочных вен была детально исследована у человека. В работе 1933 г. [Amano, 1933] установлено, что длина миокардиальных рукавов у человека достигает 7- 15 мм и может выходить за пределы перикардиальной полости («перикардиального мешка»); в настоящее время установлено, что «экстраперикардиальные» миокардиальные тяжи в стенке внелегочных сегментов вен обнаруживаются в 30% популяции [Mueller-Hoescker et al., 2008]. В вышеуказанной работе 1933 г. также впервые было показано, что «миокардиальные рукава» легочных вен обнаруживаются уже у плода. В дальнейшем было подтверждено раннее формирование миокардиальной обкладки ЛВ у всех млекопитающих животных. Так было установлено, что у мышей сформированная миокардиальная ткань в стенке легочных вен обнаруживается на 19 день эмбрионального развития, а отдельные группы миобластов (незрелых, делящихся кардиомиоцитов) выявляются на 14 день [Klika and Jarkovska, 1976].

В 1930-х годах известный Японский исследователь, пульмонолог Masuichi Takino из университета Киото [Takino 1933, 1934], изучая возможное участие парасимпатических нервов в развитии бронхиальной астмы, обратился к легочным венам. Такино, как и другие исследователи, выявил миокардиальную ткань в стенке вен нескольких видов млекопитающих и разделил эти виды на три группы по степени протяженности миокардиальных рукавов в торакальных венах. Крысы и мыши, согласно Такино, относятся к группе животных, имеющих наиболее протяженные миокардиальные рукава; к этой группе Такино также отнес летучих мышей, поскольку у них были также обнаружены миокардиальные волокна во внутрелегочных участках вен. Кошки и собаки, согласно Такино, относятся к группе животных с миокардиальными рукавами легочных вен наименьшей длины. Поскольку Такино интересовался нервной регуляцией работы дыхательной системы и кровотока в малом круге кровообращения, им была исследована

иннервация легочных вен. Возможно, что Такино первым обнаружил и описал богатую иннервацию миокардиальной стенки легочных вен у млекопитающих и человека.

Результаты исследования миокарда торакальных, и в частности легочных вен животных и человека представлены в целом перечне учебников и руководств начала и середины 20-го века [Lauche A; Benninghoff, 1930; Brenner, 1935; Franklin, 1937; Guieysse-Pellisier, 1945; Науек, 1953]. Однако, большая часть сведений, представленных в указанных источниках, оставалась в рамках общей гистологии.

2.1.2. Ультраструктура кардиомиоцитов легочных вен

Каррер в 1959 [Karrer, 1959, 1960] году использовал методы, новые на то время, электронной микроскопии для исследования ультраструктуры миокардиальной ткани в легочных венах. В работах Каррера впервые установлено наличие нервных терминалей в меди и миокардиальной ткани легочных вен у грызунов. Каррером также было впервые показано, что между кардиомиоцитами в легочных венах обнаруживаются интеркалярные диски и десмосомы, как и в рабочем миокарде предсердий.

В работе 1961 года с помощью методов электронной микроскопии впервые проведена оценка размерных характеристик субклеточных структур кардиомиоцитов внутрилегочных участков вен [Policard et al., 1961]. Авторами работы показано, что размеры миофиламентов миокардиальных клеток легочных вен существенно меньше, чем таковые, характерные для рабочих клеток камер сердца, хотя размеры других субклеточных структур сходны в предсердиях и легочных венах.

Ультраструктурное исследование легочных вен крыс выявило, что для кардиомиоцитов легочных вен крыс характерен богато развитый саркоплазматический ретикулум, как и в предсердных кардиомиоцитах. Использование электронной микроскопии позволило установить, что клетки в легочных венах связаны интеркалярными дисками, располагающимися в полярных областях кардиомиоцитов, и формируют, таким образом, полноценную миокардиальную ткань [Ludatscher, 1968].

Позже, было установлено, что интеркалярные диски между кардиомиоцитами ЛВ содержат белки щелевых контактов – коннексины, являющиеся элементами щелевых контактов. Показано, что распределение и уровень экспрессии основного коннексина рабочего миокарда - Cx43 в кардиомиоцитах ЛВ такой же, как и в предсердном миокарде [Verheule et al., 2002]. Установлена экспрессия Cx43 в миокардиальных рукавах ЛВ крыс [Xiao et al., 2016]. Есть сведения, что миокардиальная ткань ЛВ, по крайней мере у некоторых животных, экспрессирует коннексины, характерные для пейсмекерного миокарда и миокарда проводящей системы (Cx40), но не для рабочего миокарда предсердий

и желудочков [Yeh et al., 2003; Sun et al., 2008]. Распределение интеркалярных дисков, наличие белков щелевых контактов позволил предположить, что проведение возбуждения в миокардиальной ткани легочных вен, по крайней мере на микроскопическом уровне, реализуется также, как и в предсердном миокарде, но может иметь локальные особенности из-за слабой электрической сопряженности кардиомиоцитов. Охват возбуждением торакальных вен, активное распространение волны возбуждения в легочных венах было подтверждено у человека и крупных млекопитающих с помощью электрографических методов при выполнении хирургических процедур на сердце, с помощью имплантированных электродов в экспериментах. При анализе паттерна активации показано, что при синусном ритме или при навязывании ритма из области САУ волна возбуждения достигает миокардиальных рукавов легочных вен лишь незначительно позже, чем ушка левого предсердия, что делает маловероятных «узлового» (медленного) типа проведения в этой ткани. И в клинике, и в экспериментальном исследовании на животных (собаках) было показано, что, нанося возбуждающие стимулы в дистальных участках миокардиальных рукавов ЛВ, можно навязать ритм работы всей суправентрикулярного миокарда сердца, а также ритм сокращения всех его камер [Spach et al., 1972].

2.1.3. Пейсмекерные кардиомициты (Р-клетки) в стенке легочных вен

С помощью методов электронной микроскопии в миокардиальных обкладках легочных вен крыс были выделены несколько цитоморфологических типов кардиомиоцитов. Среди них были обнаружены клетки, имеющие малые размеры, бедные миофиламентами и митохондриями. Автор работы предположил, что данные клетки идентичны пейсмекерным, так называемым Р-клеткам (pale cell) сино-атриального узла. Сходство указанных Р-подобных клеток легочных вен с кардиомиоцитами САУ обусловлено также выявленными слабыми межклеточными связями, образуемыми этими клетками [Masani, 1986]. Группы Р-подобных клеток, перемежающиеся с обычными кардиомиоцитами, были обнаружены во внутрилегочных претерминальных участках миокардиальных рукавов, богатых окончаниями нервных волокон. На основе данного наблюдения позже было сделано предположение, что эти клетки, как и в САУ, способны к автоматии и являются центрами эктопической автоматии в легочных венах.

Позже сообщалось об обнаружении Р-клеток, клеток переходного типа (кардиомиоцитов внешней зоны САУ), а также кардиомиоцитов, сходных по строению с кардиомиоцитами волокон Пуркинье в ЛВ человека [Perez-Lugones et al., 2003]. В легочных венах собаки с помощью PAS-окрашивания были обнаружены кардиомиоциты богатые гликогеном, которые по мнению авторов, близки по строению к кардиомиоцитам САУ

[Chou et al., 2005]. Важно отметить, что Р-клетки не были обнаружены в стенке легочных вен в последующих исследованиях, более того их существование подвергается сомнению некоторыми авторами [Anderson and Ho, 2004; Chen and Yeh, 2003]. Вопрос о наличии пейсмекерных кардиомиоцитов в ЛВ остается открытым. Как будет показано далее, определение клеточного мезенхимального источника прокардиогенных клеток ЛВ, а также анализ паттерна экспрессии транскрипционных факторов, делает маловероятным существование в легочных венах таких же кардиомиоцитов как в САУ.

2.1.4. Организация миокардиальных рукавов легочных вен у разных представителей класса млекопитающих и человека

Группой британских ученых в 1961 году было изучено строение внутрилёгочных участков артерий и вен малого круга кровообращения целого ряда млекопитающих животных [Best and Heath, 1961]. В вышеуказанной работе были подтверждены результаты Granel и показано, что у всех грызунов, в отличие от крупных животных и человека, миокардиальная ткань обнаруживается во внутрилёгочных венах первого и второго порядка. Авторами было показано, что у мышей, крыс и бурундуков средняя оболочка (медия) легочных вен практически полностью состоит из миокардиальной ткани. У крыс миокардиальная ткань ЛВ образует два слоя: во внешнем слое кардиомиоциты залегают перпендикулярно продольной оси вены («циркулярный»); во внутреннем слое кардиомиоциты залегают соосно просвету вены [Paes de Almeida et al., 1975]. Медия, и соответственно миокардиальная ткань отделены у крыс от внутренней оболочки вен (интимы) «толстой», удвоенной внутренней эластической пластинкой.

Позже, с помощью гистологических методов было подтверждено наличие миокардиальной ткани в стенке всех (полых, непарной, легочных) вен собаки [Carrow and Calhoun, 1964]. Было установлено, что в легочных венах собак миокардиальная ткань формирует несколько слоев, включая спиральный слой миокардиальных клеток. Авторы указывают, что у разных пород собак протяженность миокардиальных слоев варьирует. Наибольшая длина наблюдается у пуделей и овчарок (7,6 и 12 см соответственно).

Крамером и Марксом в 1965 [Kramer and Marks, 1965] году было проведено систематическое исследование гистологии и морфологии легочных вен в отряде грызунов (Rodentia). Авторами установлено, что у всех 48 исследованных представителей отряда в стенке легочных вен обнаруживаются миокардиальные рукава. Только у морской свинки (*Cavia porcellus*) кардиомиоциты не обнаруживаются во внутрилёгочных участках вен, в то время как у остальных грызунов слои миокардиальной ткани распространяются вплоть до бифуркаций внутрилёгочных вен второго порядка (Табл. 1). Наибольшую протяженность

миокардиальные рукава имели у представителей семейства мышинные (Muridae). Позже было показано, что миокардиальная обкладка внутрилегочных отделов вен (имеющих диаметр 70-250 мкм) развита одинаково интенсивно у мышей всех наиболее распространенных линий, например C57Bl/6 и BALBc [Mueller-Hoecker et al., 2008].

Таблица 1. Наличие и характер миокардиальной ткани в стенке легочных вен некоторых представителей семейства грызунов.

вид	вид	наличие	протяженность
Rattus norvegicus	крыса	да	внутрилегочные вены
Cavia porcellus	морская свинка	да	внелегочные участки
Peromyscus leucopus	белоногий хомячок	да	внутрилегочные вены
Citellus leucurus	бурундук	да	внутрилегочные вены
Oryzomys pnilustris	Болотная крыса	да	внутрилегочные вены
Meriones unguiculatus	когтистая песчанка	да	внутрилегочные вены
Mus musculus	мышь	да	внутрилегочные вены
Synornys ludouicianus	луговая собачка	да	внутрилегочные вены

Наконец, в 1966-1970 годах было проведено гисто-анатомическое исследование устьев легочных вен человека и крупных животных (овца, лошадь, верблюд). В этих работах было установлено, что для устьев легочных вен человека и всех животных характерны крайне развитые циркулярные слои миокардиальной ткани [Nathan and Eliakim, 1966; Nathan and Gloobe, 1970]. Было показано, что при значительной вариабельности протяженности миокардиальных рукавов у всех изученных видов животных имеются циркулярный слой миокардиальной ткани в легочных венах [Roux et al., 2004].

Позже были охарактеризованы миокардиальные рукава отдельных легочных вен человека, а также их вариабельность в популяции. Показано, что протяженность миокардиальных обкладок сильно варьирует и может, иметь длину от 1,8-3 до 25-48 мм у человека [Mueller-Hoecker et al., 2008]. В целом, установлено, что правые легочные вены человека имеют большую протяженность, чем левые. В последние десятилетия прогресс в изучении морфологии миокардиальных структур ЛВ человека связан с внедрением в клиническую практику процедуры аблации вен и техники электроанатомического картирования. Показано также, что у человека миокардиальная ткань не ограничена внутривенными участками вен. Миокардиальная ткань в стенке легочных вен

человека может не формировать сплошную обкладку по периметру сосуда, но образует продольные отдельные, расходящиеся и анастомозирующие волокна; направление волокон в ЛВ может значительно изменяться. Дистальная граница миокардиального рукава образована множеством мелких миокардиальных выпячиваний, постепенно “растворяющихся” в фиброзной ткани [Saito et al., 2000; Ho et al., 2001]. Такие структуры в стенке ЛВ человека обозначают как «миокардиальные перивенозные тяжи». Наибольшую толщину миокардиальный рукав имеет в области атрио-венозного соединения. Например, в области устья вен у крысы миокардиальный рукав состоит из 5–8-10 слоев кардиомиоцитов. В основании ЛВ человека толщина миокардиального рукава составляет несколько миллиметров (в среднем – 3,7 мм) [Nathan and Eliakim, 1966].

Несмотря на заметные различия в макроскопической анатомии, гистологическая и ультраструктурная организация кардиомиоцитов легочных вен человека и грызунов весьма сходна. Примечательно, что заметных различий в микроанатомии и гистологии миокардиальных рукавов ЛВ у здоровых индивидов и пациентов с историей фибрилляции предсердий обнаружено не было за исключением несколько большей протяженности миокардиальных рукавов у последних [Kholova I, 2003].

В дальнейшем наличие миокардиальной ткани в стенке экстрапульмонарных и внутрилегочных сегментов вен было подтверждено у всех млекопитающих, включая примитивных (*Suncus murinus*, *мыскусовая землеройка*), а также в стенке торакальных (легочных и полых) вен птиц [Endo et al., 1992]. Оказалось, что самые мелкие насекомоядные грызуны, низшие и высшие приматы имеют в большей или меньшей степени развитые миокардиальные рукава легочных вен - слои кардиомиоцитов обнаруживаются в стенке вен диаметром от 25 до 150 мкм и даже в основании лепестков клапанов венул у некоторых видов мелких млекопитающих [Endo et al., 1992; 1995; 1997]. Таким образом, миокардиальная ткань в стенке легочных вен не является редкой особенностью, но типична для млекопитающих животных. Более того, исследования, проведенные в 1980-х годах, позволили предположить, что сердечная мускулатура в стенке легочных вен появляется на самых ранних этапах филогенеза млекопитающих животных.

2.1.5. Экспрессия молекулярных маркеров миокарда в стенке легочных вен

Экспрессия и секреция предсердного натрийуретического пептида кардиомиоцитами легочных вен

В конце 1980-х годов появляется ряд работ, которые были направлены на установление происхождения кардиомиоцитов предсердий и легочных вен благодаря использованию молекулярных маркеров мышечных клеток. Известно, что миоциты

предсердий содержат большое количество специфических секреторных гранул («гранулы, специфические для предсердий», atrial specific granules - ASG) [Cantin M, 1979], в которых содержится пептидный гормон, т.н. предсердный натрийуретический пептид (ANP) или натрийуретический фактор (ANF) [Cantin et al., 1984].

Ранее было известно, что ANP содержится в легочной ткани. Однако клетки, которые его синтезируют в легких, не были установлены. Целым рядом научных групп было показано, что кардиомиоциты легочных вен, как и миоциты предсердий, содержат мРНК, синтезируют и продуцируют ANP.

В кардиомиоцитах преимущественно проксимальных отделов легочных вен нескольких видов животных (крысы, морские свинки, бык) были обнаружены специфические гранулы, в которых, как предполагается, и накапливается ANP [Endo et al., 1992]. Важно, отметить, что количество ANP в кардиомиоцитах стенки вен грызунов было сопоставимо с таковым в кардиомиоцитах предсердий, а также существенно выше количества, содержащегося в альвеолярной ткани. Показано, что у крыс специфические гранулы и ANP содержатся в 20-30% кардиомиоцитов исключительно внутреннего слоя внелегочных участков миокардиальной ткани ЛВ, т.е. в кардиомиоцитах слоя, прилегающего к эндотелию и наиболее близкого к просвету сосудов [Toshimori et al., 1988]. Такая локализация ANP-продуцирующих миоцитов сходна с наблюдаемой в предсердиях и указывает на функциональную секреторную активность данных клеток. Перегрузка объемом левого предсердия и легочных вен в результате недостаточности, вызванной экспериментальным инфарктом левожелудочкового миокарда, приводит к увеличению количества ANP-позитивных кардиомиоцитов в ЛВ [Larsen et al., 1987a]. Важно, что ANP не был обнаружен в стенке легочных артерий ни у одного из видов животных. Важно также, что в гранулах кардиомиоцитов ЛВ содержится γ -ANP, что указывает на синтез пептида именно в данных клетках.

Поскольку ANP долгое время рассматривался как ключевой маркер предсердных кардиомиоцитов, было сделано предположение, что миокардиальная ткань ЛВ и левого предсердия идентична и, вероятно имеет сходное происхождение [Asai et al., 1987; Larsen et al. 1987a, 1987b; Springall et al., 1988; Toshimori et al., 1988]. Впоследствии, результаты этих работ лишь позволили исключить венозный синус как эмбриональный источник предшественников кардиомиоцитов легочных вен. В настоящее время предполагается, что миоциты левого предсердия и легочных вен происходят из двух независимых групп (клеточных клонов) клеток предшественников [Mommersteeg et al., 2007]. Строгая локализация ANP-позитивных кардиомиоцитов во внутреннем, периэндотелиальном слое

миокарда ЛВ, служит подтверждению гипотезы о гетерогенности популяции миоцитов стенки вен.

Экспрессия молекулярных маркеров кардиомиоцитов в ткани легочных вен

В 1990-2000-х годов было показано, что кардиомиоциты легочных вен экспрессируют типичные маркеры, характерные для миоцитов, а также кардиомиоцитов – тяжелые и легкие цепи миозина (MLC1A, продукт гена *Myh1*) [Lyons et al., 1990; Subramaniam et al., 1991], сердечную изоформу тропонина I (сТNI) [Millino et al., 2000]. Было установлено, что кардиомиоциты ЛВ экспрессируют «преимущественно» предсердный паттерн кардио-специфических генов [Jones et al., 1994]. В частности, в легочных венах как на пренатальных, так и на постнатальных этапах развития экспрессируются транскрипты предсердной α -изоформы (α -МНС), но не желудочковой β -изоформы тяжелых цепей миозина II (т.е. продукты гена *Myh6*). Экспрессия α -МНС в кардиомиоцитах легочных вен также была подтверждена с помощью β -галактозидазного анализа у трансгенных мышей (α МНСр-lacZ-hgh) с использованием репортерного гена LacZ [Mueller-Hoecker et al., 2008].

Экспрессия α -МНС в стенке формирующихся легочных вен в ходе эмбрионального развития возрастает, наблюдаясь в начале в проксимальных отделах венозного русла, а в перинатальный и постнатальный период обнаруживается и усиливается в его дистальных, внутрилегочных участках.

Таким образом, в результате исследований, проводившихся на протяжении почти 150 лет (Табл. 2) миокардиальная природа «мышечных» волокон легочных вен была доказана на клеточном, молекулярном и ультраструктурном уровнях. Было установлено, что кардиомиоциты в стенке легочных вен формируют именно ткань, которая имеет сложную, многослойную организацию и морфологически связана с миокардом предсердий.

Таблица 2. Ключевые этапы (и работы) изучения гисто-морфологической организации миокардиальной ткани легочных вен

N	год(ы)	автор(ы)	
1	1641	Walaeus Johannes	первые упоминания мышечных волокон в проксимальной части стенки полых вен
2	1668	Meibomi H.	сообщения о способности полых вен к независимой «пульсации»
3	1747, 1757	Haller A	описание независимого сокращения полых вен за счет «мышечных» волокон
4	1774	Senac M.	описание «мышечных» волокон в полых венах

5	1792	von Soemmerring S. Th.	описание сложной организации «мышечных» волокон в полых венах
6	1836	Rauschel F.	«De arteriarum et venarum structura» - диссертация о мышечных волокнах в легочных венах (ЛВ)
7	1843	Muller J.	описание «волн сокращений» в легочных венах
9	1854-1868	Kölliker A; Peaslee E; Henle J	распространение представления о мышечной ткани торакальных вен в руководствах по анатомии, гистологии, физиологии
10	1869	Elischer J.	мышечные волокна в легочных и полых венах человека, связь с предсердным миокардом, слои и неоднородность мышечных волокон
11	1877	Stieda L.	выявление мышечных волокон с поперечно-полосатой исчерченностью в стенке ЛВ крыс
12	1877	Arnstein C. (Арштейн С.)	мышечные волокна в в стенке ЛВ крыс; выявление интеркалярных дисков между кардиомиоцитами
13	1893	Piana G.P.	особая организации слоев мышечных волокон в ЛВ
14	1907	Keith, Flack	переоткрытие миокардиальной ткани в ЛВ при исследовании САУ
15	1910	Favaro D.	гистологическое исследование миокардиальной ткани в ЛВ, подтверждение связи миокарда ЛВ и предсердий; термин – «пульмонарный миокард»
16	1921	Granel F.	Цитологическое исследование кардиомиоцитов ЛВ. Выявление миокардиальной ткани во внутрилегочных ветвях ЛВ крыс и мышей
17	1933	Amano S	изучение миокардиальной ткани в ЛВ человека
18	1933-1934	Takino M.	выявление и изучение вегетативной иннервации миокардиальной ткани легочных вен
19	1940	Bucciante L.	Исследование тканевой организации миокардиальной ткани в ЛВ
20	1941	Fekete E.	гистологическое исследование миокардиальной ткани ЛВ у линейных мышей
21	1957,1959, 1960	Karrer H.E.	изучение ультраструктуры и иннервации кардиомиоцитов в ЛВ грызунов
22	1961	Best PV, Heath D	строение внутрилегочных участков вен; миокардиальные слои во внутрилегочных венах крыс и мышей
23	1963	Klavins JV	гистологическое и ультраструктурное доказательство миокардиального типа мышечных клеток в стенке ЛВ крыс Спрэг-Дуули
24	1964	Carrow, R	гистологическое и ультраструктурное подтверждение миокардиальной ткани в стенке ЛВ разных пород собак
25	1965	Kramer AW.Jr.	доказательство наличия протяженных миокардиальных рукавов ЛВ у всех <i>Rodentia</i>

26	1966, 1970	Nathan H, Eliakim M	детальное морфогистологическое исследование миокарда устьев легочных вен человека и крупных животных
27	1968	Ludatscher RM	Выявление интрекалярных дисков между кардиомиоцитами стенки ЛВ крыс. Доказательство тканевой организации кардиомиоцитов в ЛВ
28	1986	Masani F	обнаружение в ЛВ крыс пейсмекероподобных миоцитов (P-клеток)
29	1987-1988	Asai J Larsen T.H., Toshimori, H	обнаружение экспрессии натрийуретического пептида в кардиомиоцитах ЛВ
30	1990	Lyons G	обнаружение молекулярных маркеров (α -MHC, MLC1, ANP)предсердных кардиомиоцитов в ткани ЛВ
31	1994	Jones WK	молекулярные маркеры предсердных миоцитов в ЛВ (α -MHC)
32	1992-1997	Endo H	миокардиальная ткань в стенке ЛВ некоторых птиц; млекопитающих разных филогенетических групп
33	1998	Hashizume H	изучение цитоархетектоники миокардиальной стенки ЛВ крысы
34	2008	Mueller- Hoecker J	миокардиальная ткань в ЛВ мышей линий C57Bl/6, BALBc

2.2. Гипотезы происхождения, эмбриональное развитие и морфогенез миокардиальной ткани легочных вен

Существование функциональной миокардиальной ткани вне камер сердца, более того, на достаточном отдалении от устьев в стенке различных грудных сосудов неочевидно, контринтуитивно и представляется неестественным с физиологической точки зрения. Тем не менее, наличие миокардиальных обкладок в торакальных венах оказывается логичным при рассмотрении эмбриогенеза миокарда и кардиогенеза в целом.

Возможно, что, обнаружив миокардиальные клетки в стенке косой вены левого предсердия, которая является производной левой общей кардинальной вены, персистирующей у человека в пренатальном периоде развития, Дж. Маршалл впервые выявил эмбриональную основу экстракардиальной мышечной ткани стенки торакальных вен [Marshall, 1850]. Основываясь на его наблюдении, позже было сделано предположение, что весь «экстракардиальный» миокард является производным стенки эмбриональных кардинальных вен и венозного синуса (ВС).

Происхождение миокардиальной ткани легочных вен у позвоночных животных в ходе пренатального развития было изучено сотрудником лаборатории нормальной анатомии академии медицинских наук (проф. Я. Шавловский) в Санкт-Петербурге Федоровым В. В работе, опубликованной в 1908 г., Федоров, будучи очевидно знакомым с работами Маршалла, делает предположение об эмбриональном происхождении легочных вен, а также их миокардиальной обкладки: в работе сообщается, что у амфибий (лягушка, тритон) и млекопитающих источником клеточного материала, формирующего общую легочную вену, является дорсальная стенка венозного синуса, а еще более ранним источником – «дорсальный мезокард» (см. ниже) [Federow V. 1908]. Согласно гипотезе, предложенной Брауном в 1913 году, предшественниками миокардиальной ткани легочных и полых вен служат отдельные (т.е. различные) участки стенки эмбрионального венозного синуса [Brown, 1913].

В ряде работ начала XX века было продемонстрировано, что эмбриогенез различных отделов суправентрикулярного миокарда у птиц [Squier, 1916], рептилий, млекопитающих [Flint, 1906] и человека [Auer, 1941, 1948] может сильно различаться. Тем не менее, касательно происхождения самих торакальных вен, а также миокарда легочных вен господствовала гипотеза венозного синуса. Идея о происхождении миокарда легочных вен из участков венозного синуса оставалась распространенной до 1990-х годов [Los, 1978; DeRuiter et al., 1995].

Начиная с 1910-х появляется целый ряд работ, направленных на исследование нормального и патологического эмбрионального развития легочного сосудистого русла

человека [Brown, 1913; Davies and Mac Conaill, 1937]. В ряде исследований было установлено, что строение легочных вен, а также организация дренажа легочных вен в левом предсердии у человека крайне переменны. Однако, уже в работе 1931 года показано, что при всей изменчивости и при всех нарушениях морфогенеза легочных вен их эмбриональное развитие всегда сопровождается формированием миокардиальных рукавов [Schornstein, 1931]. Выявление патологических изменений легочных сосудов, в том числе и изменения миокардиального слоя в их стенке, позволило предположить связь миокардиальной ткани с рядом заболеваний ССС [Brenner, 1935].

В настоящее время очевидно, что при рассмотрении вопроса происхождения миокарда торакальных вен следует различать (1) морфогенез структур, (2) источники (пулы) мезенхимального клеточного материала для структур, а также (3) профиль экспрессии ключевых морфогенетических факторов в пулах мезенхимальных клеток (3). Миокардиальная ткань легочных вен «анатомически» действительно формируется в связи с левой частью венозного синуса. Однако пул прокардиогенных клеток венозного синуса и легочных вен различен, как и судьба этих клеток в онтогенезе. Ниже приведены современные сведения касательно морфогенеза легочных вен как сосудов, сведения о ранних этапах кардиогенеза, которые делают возможным понимание возникновения экстракардиального миокарда в целом, и миокарда легочных вен в частности.

2.2.1. Ранние этапы кардиогенеза

Сердечно-сосудистая система и сердце у всех позвоночных животных имеет мезодермальное происхождение. Мультипотентные клетки-предшественники тканей сердца идентифицируются на самых ранних этапах эмбриогенеза. У всех амниот, и у млекопитающих, в частности, индукция и спецификация кардиогенных клеток происходят в разные сроки, но всегда на стадии формирования эпибласта («зародышевого щитка»). Клетки, являющиеся предшественниками как кардиомиоцитов, так и гладкомышечных клеток и эндотелиоцитов под действием продуктов генов «заднего конца тела» — *Nodal* и *Vg1* и т. д. [Cai et al., 2012], сигнальных каскадов, активируемых белками семейства *Wnt* [Mazzotta et al., 2016, Steinhart and Angers, 2018], BMP [Zaffran and Frasch, 2002], ряда других морфогенетических факторов (FGF-1, 2, 8) [Ciruna and Rossant, 2001], мигрируют из двух симметричных, билатерально расположенных участков эпибласта через стенки первичной бороздки и гензеновского узелка в пространство над формирующейся энтодермой, где становятся кардиогенной частью мезодермы. Важно, что выселение и миграция кардиогенных клеток сопровождается утратой ими целого спектра белков, формирующих клеточные контакты (например, E-кадгерин) и необходимых для образования ткани

[Burdal et al., 1993]. Таким образом, самые ранние этапы кардиогенеза, сопровождаются процессами, напоминающими эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), а мигрирующие кардиогенные клетки являются профилированными мезенхимальными клетками. При дальнейшем развитии кардиогенные клетки локализуются в передней части висцерального листка бокового (латерального) отдела мезодермы.

У человека билатерально симметричные кардиогенные участки мезодермы слиты по срединной линии в серпообразную структуру — «сердечный полумесяц», или «кардиогенный серп» (*cardiac crescent*) [Moorman et al., 2007]. После миграции и образования кардиогенной мезодермы ее клетки остаются тесно сближенными с энтодермой, которая продуцирует «кардиогенные» факторы, и является, таким образом, важным фактором кардиогенеза. Вскоре после формирования висцеральной кардиогенной мезодермы в ней выделяются участки, которые являются источниками ткани различных отделов сердца - т.н. кардиогенные поля. Согласно классическим представлениям в кардиогенной мезодерме имеется *первое* и *второе* кардиогенное поле. Интенсивно пролиферирующие мезенхимальные и/или мезодермальные клетки, происходящие из билатеральных участков *первого* кардиогенного поля, формируют *первичную сердечную трубку*, характерную для всех позвоночных животных [Stalsberg and DeHaan, 1969].

Образование первичной сердечной трубки происходит в результате слияния двух билатеральных мезодермальных зачатков. У позвоночных животных объединение билатеральных зачатков приводит к тому, что сердечная трубка оказывается окружена перикардальной (целомической) полостью. Сердечная трубка внутри перикардальной полости остается связана с дорзальной стороны с висцеральной мезодермой.

Удлинение и утолщение стенок сердечной трубки, как и последующее формирование отделов сердца происходят за счет пролиферации клеток стенки трубки, включения выселяющихся и дифференцирующихся мезенхимальных клеток из висцеральной мезодермы. Как и на более ранних этапах, миграция клеток мезодермы в стенку сердечной трубки становится возможной благодаря их «деэпителизации», индукции в мезодерме эпителиально-мезенхимального перехода. Рабочий миокард левого желудочка, трабекуляризированный миокард правого и левого ушка предсердий зрелого сердца, но не пейсмекерный миокард венозного синуса или синоатриального узла являются производными первичной сердечной трубки, и, соответственно, первого кардиогенного поля. Таким образом, первое кардиогенное поле служит источником рабочих кардиомиоцитов, формирующих стенку камер сердца.

2.2.2. Второе кардиогенное поле как источник прокардиогенных клеток-предшественников венозного полюса сердца

Одним из мезодермальных участков, служащих источником клеток-предшественников кардиомиоцитов, является второе кардиогенное поле (ВКП) [Moorman and Christoffels, 2003, 2007; Zhou et al., 2008]. Прокардиогенные клетки-предшественники мезодермы второго кардиогенного поля у млекопитающих идентифицируются уже в эпибласте. Мезодермальные билатерально симметричные участки ВКП располагаются медиальнее серповидной зоны первого кардиогенного поля [Buckingham et al., 2005]. Формирование кардиогенных мезенхимальных клеток из мезодермы ВКП за счет ЭМП, а также их миграция, пролиферация [Cai et al., 2003] и дифференцировка в кардиомиоциты в ходе онтогенеза происходят существенно дольше и позже, чем в первом кардиогенном поле. Мезенхимальные клетки выселяются из ВКП тогда, когда миграция клеток-предшественников первого поля уже закончена, они включены в стенку сердечной трубки и их дифференцировка направлена по миокардиальному пути.

Первичная сердечная трубка, располагаясь в целомической полости, остается связанной с висцеральной мезодермой посредством т.н. дорзальной кардиогенной мезодермы (или *дорзального мезокардия*) — продольного мезодермального тяжа, который формируется как результат преобразования второго кардиогенного поля. Позднее дорзальный мезодермальный тяж частично отделяется от сердечной трубки, сохраняя с ней связь только в области артериального и венозного концов (полюсов) и формируя, таким образом, передний и задний участки дорзальной мезодермы. Клетки этих двух зон активно делятся, мигрируют в область артериального и венозного полюсов сердечной трубки [Douglas et al., 2011]. Согласно классическим представлениям, формирование структур «венозного» и «артериального» полюсов эмбрионального сердца позвоночных происходит за счет переднего и заднего кардиогенных полей – отделов ВКП [Buckingham et al., 2005, Kelly et al., 2001]. Мезенхимальные клетки, выселяющиеся из заднего кардиогенного поля, начинают встраиваться в стенку первичной сердечной трубки позже, чем клетки переднего поля, поэтому структуры венозного полюса сердца, включая ВС, развиваются позже (у мышей – начиная с E9,5), чем структуры артериального полюса сердца [Groot et al., 2013].

Считалось, что заднее кардиогенное поле гомогенно и все его клетки служат источником для всех структур венозного полюса сердца, включая эмбриональный ВС и САУ [Van Den Berg et al., 2009]. В настоящее время показано, что висцеральная мезодерма до стадии выделения полей гетерогенна, и в ней уже присутствуют отдельные группы прокардиогенных клеток, являющиеся предшественниками кардиомиоцитов только ВС или только САУ [Mommersteeg et al., 2010]. Таким образом, формирование новых отделов

сердца, включая ВС, синоатриальный клапан, атриовентрикулярное соединение, часть правого желудочка и желудочковую перегородку, часть предсердий, предсердную перегородку, происходит за счет иммиграции клеток ВКП, а по времени соответствует началу фазы петлеобразного искривления сердечной трубки. К настоящему времени показано, что миокардиальная ткань стенки легочных вен формируется за счет мезенхимальных предшественников заднего отдела второго кардиогенного поля [Snarr et al., 2007, Galli et al., 2008].

Таким образом, кардиомиоциты легочных вен не имеют отношения к миокардиальной ткани сердечной трубки (к первому кардиогенному полю). Важно также отметить, что кардиомиоциты легочных вен не происходят из стенки эмбрионального венозного синуса или его производных (кардинальных вен), как это предполагалось на заре эмбриологии кардиогенеза [Moorman and Anderson, 2011]. Хотя следует отметить, что все структуры венозного полюса сердца (венозный синус, САУ, миокардиальная ткань *полых* и легочных вен) имеют «родственное» происхождение, являясь производными второго кардиогенного поля.

2.2.3. Молекулярные маркеры мезодермы кардиогенных полей

В настоящее время MesP1 рассматривается как ключевой фактор кардиогенной спецификации и пролиферации мезодермы (Рис. 2.1) [Bondue and Blanpain, 2010]. Предполагается, что именно MesP1 управляет группой регуляторных факторов, необходимых для раннего кардиогенеза. К MesP1-управляемым транскрипционным факторам и регуляторным белкам относятся FGF8, FGF10, Isl1 (Islet-1 – транскрипционный фактор, содержащий LIM-домен), Id2, GATA4/6, Mef2c, подоплантин, транскрипционные факторы семейства TBX [Groot et al., 2007]. Клетки как первого, так и второго кардиогенного поля экспрессируют MesP1 и трансмиссионные факторы (ТФ) семейства GATA [Stefanovic and Christoffels, 2015].

Множество факторов участвуют в транскрипционном контроле пролиферации и дифференцировки мезенхимальных клеток кардиогенной мезодермы. Однако ключевыми ТФ в определении судьбы кардиогенных клеток и их электрофизиологического фенотипа являются гомеодоменные транскрипционные факторы Nkx2.5; GATA-связывающие ТФ, например, GATA4; Isl1, а также транскрипционные факторы семейства T-box (TBX) -TBX2, 3, 5, 18, 20. В настоящее время установлено, что исходно все кардиогенные клетки висцеральной мезодермы экспрессируют Nkx2.5 [Mommersteeg et al., 2010]. Маркером всех мезенхимальных предшественников кардиомиоцитов является также Isl1 [Mommersteeg et al., 2007, Cai et al., 2003, Snarr et al., 2007]. Таким образом, все прокардиогенные клетки всех

кардиогенных полей изначально являются *Isl1*- и *Nkx2.5*-позитивными [Ma et al., 2008]. Поэтому, кардиомиоциты первичной сердечной трубки экспрессируют *Nkx2.5*, *Isl1*, *GATA4*, а также *TBX5*. Ранее предполагалось, что клетки второго поля и, соответственно, клетки-предшественники ВС и легочных вен являются исходно *Nkx2.5*-негативными [Wiese et al., 2009], однако, эти данные оказались неверными.

Еще до формирования сердечной трубки кардиогенная мезодерма разделяется на субпопуляции клеток, т.е. подвергается «паттернингу», по набору экспрессируемых ТФ. Мезодерма первого кардиогенного поля сохраняет экспрессию *Isl1* и *Nkx2.5* (однако после окончания формирования первичной сердечной трубки экспрессия *Isl1* в кардиомиоцитах – «наследниках» первого поля – пропадает). Мезодерма второго кардиогенного поля сохраняет экспрессию только *Isl1*, однако перед дифференцировкой клетки второго поля заново начинают экспрессировать *Nkx2.5*, а уровень *Isl1*, наоборот, снижается. Таким образом, классификация кардиогенных полей является весьма условной, и они могут быть рассмотрены как домены мезодермы с меняющимся сложным образом в ходе эмбрионального развития профилем ТФ [Mommersteeg et al., 2010]. Именно паттерн экспрессии ТФ обуславливает спецификацию мезодермальных клеток как предшественников пейсмекерных кардиомиоцитов САУ, рабочих кардиомиоцитов предсердий и желудочков, кардиомиоцитов легочных вен. В первом приближении, кардиомиоциты легочных вен, являясь производными второго кардиогенного поля, как и кардиомиоциты предсердий должны являться *Isl1*-негативными и *Nkx2.5*-позитивными клетками.

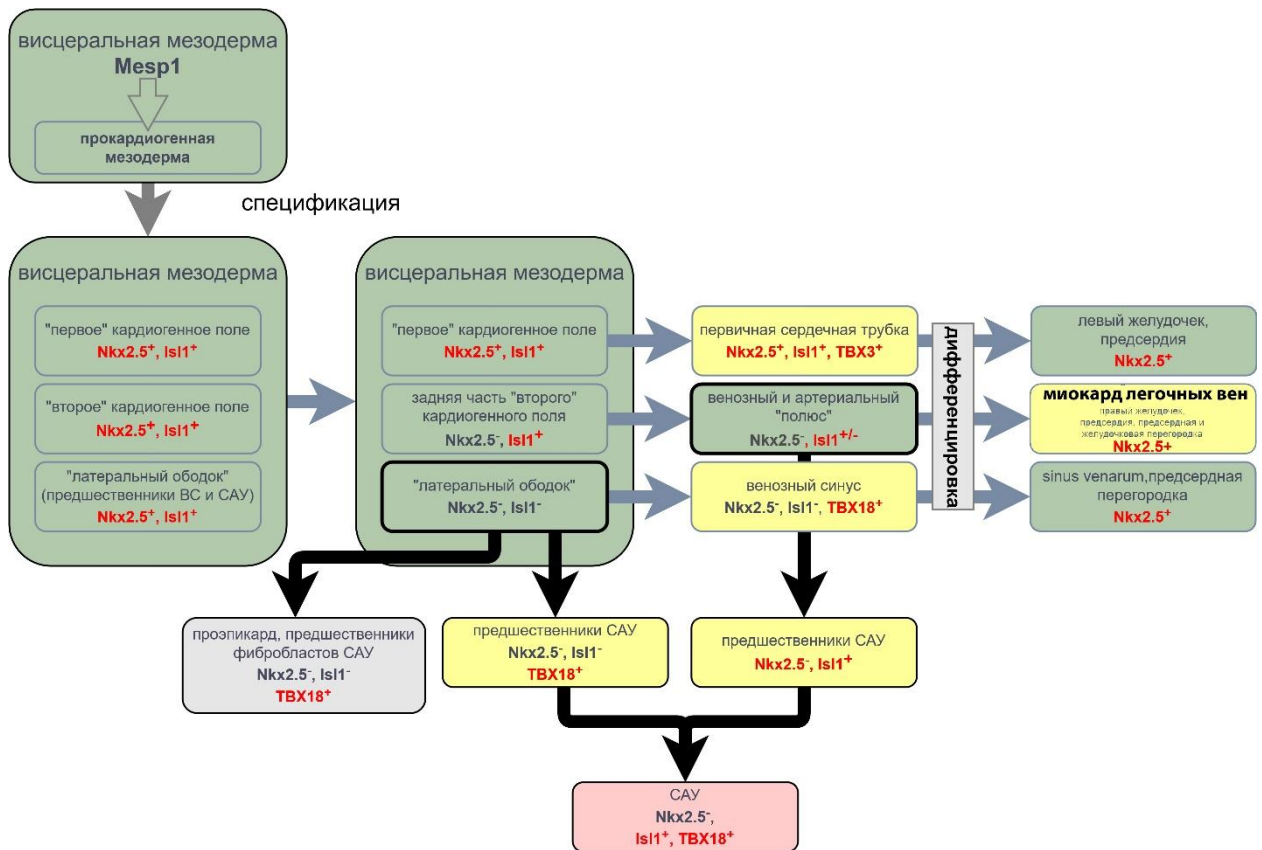


Рис.2.1. Происхождение миокардиальной ткани различных отделов сердца из мезодермальных кардиогенных полей в ходе эмбрионального развития, а также паттерн экспрессии ключевых транскрипционных факторов (ТФ: *Mesp1*, *Nkx2.5*, *Isl1*, *TBX18*, *TBX3*) в мезодермальных кардиогенных полях на разных этапах кардиогенеза. Мезенхимальные предшественники, зрелые кардиомиоциты легочных вен, вероятно, происходят из пула *Isl1⁺-Nkx2.5*-негативных мезодермальных клеток второго кардиогенного поля.

Желтым и красным цветом показаны структуры, демонстрирующие автоматическую или пейсмекерную активность на разных этапах кардиогенеза. Экспрессируемый ТФ показан красным шрифтом; отсутствие экспрессии ТФ показано темным шрифтом.

2.2.4. Морфогенез легочных вен как сосудистой структуры

Легочные вены, как сосудистые структуры, образуются из общего предшественника – первичной или «примитивной» легочной вены. Первичная легочная вена закладывается, по крайней мере у млекопитающих, внекардиально – она происходит из проэпителиальных клеток, расположенных дорзально относительно сердца, в пределах *дорзального мезокардия* в составе так называемого мидфаренгиального эндокардиального тяжа [DeRuiter et al., 1993]. Эндокардиальный тяж, т.е. структура, состоящая только из (про)эндотелиальных клеток и окруженная мезенхимой, на основании которого сформируется первичная легочная вена, изначально связан с «эндокардиальными конгломератами» сердечных закладок. В экспериментах с идентификацией молекулярных маркеров клеточных пулов показано, что клетки-предшественники легочной вены

предопределены в дорзальном мезокардии на крайне ранних стадиях кардиогенеза [DeRuiter et al., 1995].

Соединение будущей легочной вены с полостью предсердия, т.е. формирование ее устья, возможно только благодаря тому, что мезенхимальная ткань, окружающая вену, пронизывает стенку сердца. В результате разрастания и дифференцировки мезенхимальных клеток в тяже легочной вены образуется канал, который соединится с эндокардом и полостью камеры формирующегося предсердия [Snarr et al., 2007]. Следует отметить, что первичная ЛВ не обладает никакой миокардиальной обкладкой, её канал сформирован проэндотелиальными клетками и окружен мезенхимой. Миокардиальные рукава в легочных венах появляются существенно позже, на этапе развития, соответствующим формированию межпредсердной перегородки [Mommersteeg et al., 2009].

Ранее предполагалось, что первичная легочная вена открывается в левую часть венозного синуса в непосредственной близости от сино-атриального соединения [DeRuiter et al., 1993, 1995, Douglas et al., 2011]. В ходе развития левая часть стенки венозного синуса может включаться в стенку левого предсердия. Формирование устья легочной вены и трансформация венозного синуса у млекопитающих происходит практически одновременно. Поэтому, точное местоположение устья первичной ЛВ идентифицировать сложно. Согласно более поздним исследованиям, первичная легочная вена открывается не в венозный синус, а в левую часть стенки общего эмбрионального предсердия [Van den Berg and Moorman, 2011]. В любом случае, место слияния первичной легочной вены и камеры сердца определено заранее. В стенке сердечной трубки имеется выпячивание, именуемое «пульмонарным» или «каудальным» бугорком, которое соответствует положению будущего устья первичной ЛВ. В некоторых работах выделяют правый и левый легочные бугорки [Douglas et al., 2006]. Первичная межпредсердная перегородка формируется справа от устья легочной вены с участием правого легочного бугорка. Интересно, что у тех позвоночных, у которых отсутствует предсердная перегородка, например, у некоторых двоякодышащих рыб, легочная вена также впадает в левую часть общего предсердия [Jensen B., Boukens B., 2016].

Первичная ЛВ ветвится в области зачатков легких. Одновременно с формированием легочных вен развивается предсердие и предсердная перегородка. Формирующаяся предсердная перегородка, трансформирующийся венозный синус совместно с сино-атриальным клапаном смещают устье легочной вены в левую часть общего предсердия. В тот же самый период онтогенеза происходит локализация и латерализация САУ в правом предсердии. В настоящее время показано, что формирование ассиметричных структур в сердце позвоночных животных управляется сложными каскадами морфогенетических и

транскрипционных факторов. Более того, предполагается, что висцеральная кардиогенная мезодерма уже на стадии выделения кардиогенных полей является билатерально асимметричной [Domínguez et al., 2012]. Одной из причин правостороннего расположения дефинитивного САУ является асимметричная миграция мезенхимальных клеток-предшественников из кардиогенных полей.

Известно, что у млекопитающих в процессе атриализации ВС часть предшественников кардиомиоцитов САУ может оказаться в основании левой кардинальной вены и затем – в составе стенки левого предсердия. Такие клетки могут являться основой для патологического «левостороннего» пейсмекера сердца, сохраняющегося в эмбриональный период, либо даже в постнатальной жизни. В норме формирование «левостороннего» пейсмекера подавляется, и роль естественного дефинитивного ритмоводителя сердца берет на себя САУ в стенке правого предсердия. Ключевым ТФ, подавляющим развитие пейсмекерного миокарда в левой части венозного синуса и в левом предсердии, является транскрипционный фактор Pitx2c. Именно этот ТФ управляет формированием билатеральной асимметрии и является элементом сигнального пути Nodal/Lefty/Pitx2 [Christoffels V.M., Franco D., 2003], необходимого для формирования многих ассиметричных структур. Pitx2 в левом предсердии является прямым репрессором «пропейсмекерного» TBX3, а также Shox2 [Wang et al., 2010]. В целом ряде работ установлено, что Pitx2 экспрессируется в развивающихся легочных венах, их миокардиальной обкладке. Он необходим для их развития и левосторонней инкорпорации в предсердие [Mommersteeg et al., 2007]. Поскольку Pitx2 подавляет экспрессию «пропейсмекерных» ТФ в кардиомиоцитах, то «левостороннее» положение легочных вен определяет, по меньшей мере в раннем онтогенезе, рабочий (предсердный) фенотип кардиомиоцитов их стенки.

2.2.5. Миграция, рекрутинг и трансдифференцировка прокардиогенных клеток при формировании миокарда легочных вен

Существует несколько гипотез касательно клеточных механизмов формирования миокардиальной ткани стенки легочных вен. Согласно первой гипотезе, предшественники кардиомиоцитов (миобласты), происходящие из задней части второго кардиогенного поля, накапливаются в левой части стенки общего предсердия, а затем мигрируют из предсердия вдоль общей легочной вены в дистальные участки ее мезенхимальной стенки [Millino et al., 2000]. Вторая гипотеза предполагает «рекрутинг», в результате которого, мезенхимальные клетки второго кардиогенного поля [Douglas et al., 2009, 2011] мигрируют в периферию эндотелиального тяжа общей легочной вены, где дифференцируются в кардиомиоциты.

Третья гипотеза, в наибольшей степени подтвержденная и комбинирующая первые две, предполагает, что мезенхимальные клетки ВКП мигрируют в основание первичной легочной вены (через дорзальный мезокард), там профилируются в предшественники кардиомиоцитов, затем пролиферируют, в результате чего миокардиальная ткань разрастается в направлении дистальных участков вен [Mommersteeg et al., 2007]. Предполагается, что в формировании миокарда ЛВ участвует несколько волн дифференциации/пролиферации клеток, демонстрирующих несколько различные свойства. Показано, что в миокардиальную обкладку ЛВ клетки рекрутируются преимущественно из левосторонней части второго кардиогенного поля.

В ряде работы было показано, что проэндотелиальные клетки или эмбриональные эндотелиальные клетки могут трансдифференцироваться в т.н. субэндотелиальные мезенхимальные клетки, которые, в свою очередь могут служить предшественниками других клеток сосудистой стенки. Показано, что субэндотелиальная мезенхима служит локальным источником ГМК в аорте птиц (перепелки) [DeRuiter et al., 1997]. Возможно, что одним из источников кардиомиоцитов легочных вен являются упомянутые субэндотелиальные мезенхимальные клетки. В пользу данного предположения указывает тот факт, что в эмбриональных кардиомиоцитах обнаруживается кратковременная (транзиторная) экспрессия α -актин гладкомышечного типа [Woodcock-Mitchell et al., 1988]. К настоящему времени остается неизвестным, насколько велик вклад мезенхимальных клеток, происходящих из проэндотелия первичной легочной вены, в миокардиальную обкладку сосуда.

2.2.6. Связь электрофизиологического фенотипа кардиомиоцитов и паттерна экспрессии транскрипционных факторов

Хорошо известно, что первичная сердечная трубка обладает автоматией – т.е. эмбриональные кардиомиоциты в ее стенке спонтанно, ритмически возбуждаются и развивают сокращение, способствуя проталкиванию крови по «перистальтическому» типу. С электрофизиологической точки зрения кардиомиоциты первичной трубки обладают *пейсмекерными* свойствами. Тем не менее, автоматия рабочего миокарда предсердий и желудочков (т.е. производных сердечной трубки) зрелого здорового сердца подавлена, что является залогом реализации его гемодинамической функции. Такое противоречие объясняется существованием сложного механизма онтогенетического контроля и переключения молекулярного фенотипа кардиомиоцитов, определяющего их электрофизиологические свойства.

Комплекс ТФ Nkx2.5/TBX5/GATA4 является ключевым для активации транскрипции генов, определяющих сократительные и электрофизиологические свойства, характерные для «рабочего» миокарда. Nkx2.5/TBX5/GATA4 вызывают подавление экспрессии каналов семейства HCN, обуславливающих т.н. пейсмекерный ток *I_f*. Этот комплекс ТФ стимулирует экспрессию генов белков сократительного аппарата, а также генов коннексинов высокой проводимости Cx43 (*Gja5*), потенциал-чувствительных натриевых каналов NaV1.5 (*Scn5a*), генов калиевых каналов Kir2.x (*Kcnj2*, *Kcnj12*). Предполагается, что в первичной сердечной трубке репрессоры транскрипции TBX2, TBX3 до определенного момента кардиогенеза препятствуют работе комплекса Nkx2.5/TBX5/GATA4, а экспрессию HCN4 поддерживает *Isl1* [Mommersteeg et al., 2007], что делает возможной автоматическую активность. В определенный момент кардиогенеза уровень TBX2, TBX3 снижается, что приводит к «разрешению» экспрессии ТФ комплекса Nkx2.5/TBX5/GATA4 и кардиомиоциты, происходящие из сердечной трубки, теряют способность к автоматии, приобретая «рабочий» сократительный фенотип. Таким образом, свойства кардиомиоцитов не определены жестко клеточным клоном мезэнхимальных клеток из которого они происходят. Электрофизиологический и сократительный фенотип может меняться в ходе онтогенеза в результате изменения паттерна экспрессии ТФ.

Показано, что в кардиомиоциты ЛВ, происходящие из второго кардиогенного поля, являются Nkx2-5 позитивными и должны демонстрировать рабочий, сократительный фенотип. Кардиомиоциты зрелых легочных вен экспрессируют и другие трансактивационные факторы, характерные для рабочего предсердного миокарда - Tbx5, Tbx20, Gata4 [Postma et al., 2009; Sizarov et al., 2010]. Как указано выше, при наличии этой группы ТФ в кардиомиоцитах наблюдается экспрессия белков – ионных каналов и переносчиков – характерных для рабочего миокарда (Cx43, Kir2.x, Nav1.5), а также других «маркеров» предсердного миокарда. Например, под контролем Nkx2.5/GATA4/TBX5 находится ген предсердного натрийуретического пептида *Nppa* [Habets et al., 2002].

Однако, как будет показано далее, кардиомиоциты ЛВ демонстрируют «эктопическую» (внеузловую) автоматию в определенных условиях, которая характерна для кардиомиоцитов, экспрессирующих пейсмекерный «набор» транскрипционных факторов (*Shox2*, TBX2, TBX3). Переключение фенотипа за счет изменения паттерна экспрессии ТФ, но протекающее в обратном «направлении» (от рабочего, сократительного к «пейсмекероподобному», проаритмическому), по-видимому, определяет особые электрофизиологические свойства зрелой ткани легочных вен. Было показано, что слабое изменение баланса «пропейсмекерных» и «рабочих» транскрипционных факторов может приводить к существенному изменению гистологического, электрофизиологического

фенотипа кардиомиоцитов, профиля экспрессии мембранных белков, белков, участвующих в круговороте внутриклеточного кальция [Mommersteeg et al. 2007, 2009;]. Снижение уровня, например, *Nkx2-5* *Pitx2* и увеличение уровня *Shox2* в миокарде легочных вен может являться причиной проявления в них автоматической активности [Ye et al., 2015]. Известно, что *Shox2* находится на вершине иерархии ТФ, запускающих «пропейсмекерное» (эпи)генетическое профилирование кардиомиоцитов [Espinoza-lewis et al., 2009]. Что служит причиной изменения баланса ТФ, в какой момент онтогенеза происходит смещение и как меняется этот баланс в ЛВ с самых ранних этапов развития, остается неизвестным.

Изменение паттерна экспрессии ТФ происходит в онтогенезе и при формировании естественного ритмоводителя сердца – синоатриального узла (Рис.2.1). Происхождение пейсмекера сердца можно установить, проследив профиль экспрессии транскрипционных факторов в кардиомиоцитах зрелого САУ и в клетках-предшественниках кардиогенной мезодермы. Установлено, что небольшая клеточная субпопуляция из периферии мезодермы сердечного полумесяца (т.н. латерального ободка) теряет экспрессию как *Isl1*, так и *Nkx2.5* до начала ЭМП и пролиферации мезенхимальных клеток, но начинает экспрессировать *TBX18*. Такие *Nkx2.5*-, *Isl1*-негативные, но *TBX18*-позитивные (*Nkx2.5*-/*Isl1*-/*TBX18*+) клетки являются предшественниками ВС и, возможно, предшественниками пейсмекера всех позвоночных животных. Показано, что у млекопитающих миокард САУ образован клетками, происходящими из двух разных субпопуляций: (1) *Isl1*-позитивными и *Nkx2.5*-негативными (*Isl1*+/*Nkx2.5*-) клетками второго (заднего) кардиогенного поля; (2) *Nkx2.5*-/*Isl1*-/*TBX18*+ -клетками «латерального ободка» [Mommersteeg et al., 2010]. Важно, что клетки дефинитивного САУ сохраняют экспрессию ТФ *Isl1*, который, необходим для поддержания пейсмекерного фенотипа и экспрессии *HCN4*. Кроме того, *Nkx2.5*-/*Isl1*-/*TBX18*+ -клетки являются также предшественниками эпикарда, ткани коронарных сосудов, а также фибробластов сердца, которые играют важную роль в реализации функции САУ.

В настоящее время экспериментально подтверждено, что именно та часть мезенхимальных клеток, которая экспрессирует *TBX18*, мигрирует, пролиферирует и дифференцируется в кардиомиоциты примордиального САУ и составляет большую часть (75% клеток) зрелого САУ [Christoffels et al., 2006] млекопитающих, а удаление этих клеток на ранних эмбриональных этапах приводит к тому, что САУ не формируется.

2.2.7. Динамика формирования миокардиальных рукавов легочных вен

Как указано выше, гладкомышечные клетки располагаются с внутренней стороны миокардиального рукава и выстилают все участки вен, начиная от внутрилегочных венул

вплоть до устьев сосудов в левом предсердии. Изучение динамики формирования в эмбриогенезе показало, что рост миокардиальной и гладкомышечной обкладки происходит частично в противоположных направлениях, а также в разные периоды пренатального развития. В первом приближении, миокардиальная ткань формируется за счет дифференцировки мезенхимальных предшественников [Mommersteeg et al., 2007] и миграции миобластов (или предшественников кардиомиоцитов) из устья вены в направлении ее дистальных участков. Миокардиальные клетки накапливаются вокруг эндотелиальной выстилки примитивных венозных трубок еще до формирования гладкомышечной оболочки. У грызунов кардиомиоциты и их предшественники обнаруживаются на всем протяжении вен вплоть до самых мелких венул. Гладкомышечная ткань формируется ранее всего в эмбриогенезе во внутрилегочных венулах и лишь к концу пренатальной жизни за счет рекрутинга мезенхимальных клеток и миграции предшественников ГМК достигает проксимального (внелегочного) участка вен и их устьев, а также стенки левого предсердия [Millino et al., 2000].

После формирования предсердной перегородки и миокардиальной ткани легочных вен размеры выделившегося левого предсердия начинают увеличиваться. Отчасти, увеличение площади задне-верхней стенки левого предсердия происходит за счет встраивания (ретракции) проксимальной части ствола ЛВ. Таким образом, на определенном этапе онтогенеза исходная миграция миобластов из устья в дистальном направлении вдоль стенки ЛВ сменяется обратным перемещением кардиомиоцитов в стенку левого предсердия. Во взрослом сердце задне-верхняя часть стенки левого предсердия имеет «легочно-венозное» происхождение и морфологически отличается от «аурикулярной» части (т.е. ушка предсердия). Благодаря вращению общего ствола легочной вены части левого предсердия имеет гладкую, нетрабекуляризованную внутреннюю поверхность и, по крайней мере у некоторых животных, содержит компоненты сосудистой стенки: гладкомышечные клетки и эластическую пластинку, снаружи от которой располагается миокардиальная ткань [Douglas et al., 2006, Hosoyamada et al., 2010]. Согласно некоторым исследованиям, в гладкостенной части левого предсердия миокардиальный слой может быть сильно редуцирован или вовсе отсутствовать. Легочная вена «врастает» в стенку предсердия у разных млекопитающих в разной степени. У человека, вследствие длительного гестационного периода, ретракция вены происходит вплоть до бифуркаций ветвей второго порядка, которые в итоге формируют четыре или более отдельных устья в дефинитивном левом предсердии [Lacomis et al., 2007].

Таблица 3. Ключевые этапы (и работы) изучения эмбрионального происхождения миокардиальной ткани легочных вен

N	год	автор(ы)	
1	1850	Marshall J.	Детальное исследование эмбрионального и пренатального развития торакальных (кардинальных и полых) и коронарных вен у млекопитающих животных и человека
2	1908	Federow W (Федоров В)	Первое эмбриологическое исследование происхождения легочных вен
3	1933	Amano S	Изучение миокардиальной ткани в ЛВ человека; обнаружение миокардиальной ткани в ЛВ плода
4	1931	Schorstein T.	Описание эмбрионального развития ЛВ и миокардиальной ткани ЛВ у человека в пренатальном развитии
5	1938	Otterbach K	Уточнение эмбрионального происхождения миокардиальной ткани ЛВ
6	2000	Millino C	Изучение динамики эмбрионального развития миокардиальной и гладкомышечной обкладки стенки ЛВ

2.3. Гипотезы о функциональной роли миокардиальной ткани в стенке легочных вен млекопитающих животных

Как указано выше, миокардиальная ткань торакальных вен является функциональной. Миокардиальная ткань как легочных вен, так и полых вен способна к возбуждению и ритмическому сокращению с достаточно высокой частотой, не характерной для гладкой мускулатуры [Hooker et al., 1964; Macleod and Hunter, 1967].

Как это не удивительно, но феномен самопроизвольной «пульсации» торакальных вен млекопитающих был обнаружен анатомами несколько столетий назад. Анатом Генрих Мейбом описывал сокращения полых вен у разных животных [Meibom, 1668]. Уже Альбрехтом фон Галлером [Haller, 1757], «отцом физиологии» в его труде 1757 года «*Elementa physiologiae corporis humani*» (раздел «*motus cordis*» - движения сердца) указано, что легочные и полые вены пульсируют значительное время после остановки сокращений камер сердца. Немецкий натуралист Йоханс Мюллер в труде *Elements of Physiology* [Muller, 1843] сообщал, что «сократительные волны» в полых, и особенно в легочных венах наблюдаются так далеко от устьев, насколько возможно проследить сосуды в долях легких.

Более 140 лет назад Лаудером Брантоном и его коллегами было проведено, возможно, первое, экспериментальное исследование автоматической сократительной активности торакальных вен. В его работах было показано, что полые и легочные вены млекопитающих (кроликов, кошек), после подавления спонтанных сокращений желудочков и предсердий, а также подавления активности блуждающих нервов (с помощью атропинизации) демонстрируют самостоятельную способность к «пульсации». В серии его работ было установлено, что вышеуказанная сократительная активность проявляется независимо от возбуждения, возникающего в предсердном миокарде и синусном узле [Lauder T. Brunton, 1874, 1876], и более того, сохраняется после полного прекращения автоматической активности в суправентрикулярном миокарде. В этих работах также было обнаружено, что волна сокращения в передних полых венах может возникать в дистальных участках и распространяться в направлении предсердия. Интересно, что частота пульсаций легочных вен у кошек наблюдаемая Брантоном составляла 46 уд/мин, что относительно близко к величине синусного ритма у этих животных (составляет 25-35%).

Уже Хеллером, Мюллером было высказано предположение, что с функциональной точки зрения, сократительная активность торакальных вен способствует предотвращению обратного тока крови (рефлюксу) в центральном венозном пространстве и устье левого предсердия при сокращении предсердий.

Противоположная идея была сформулирована Франклином (1937) и повторена Циони [Cioni, 1939], Бурчем и Ромни в 1954 г., которые, основываясь на структуре

ветвления легочных вен и сведениях о «мышечной» ткани вен, применили термин «дроссельный клапан» (throttle valve) для образного обозначения функции сократимой стенки вен [Burch and Romney, 1954], а также роли легочных вен в развитии ряда патологий [Innes, 1956]. Согласно данной идее, менее или более выраженные сокращения стенки легочных вен приводят к уменьшению их среднего просвета и ограничивают приток крови к левому предсердию и левому желудочку, соответственно, что ограничивает сердечный выброс. Takino в 1930-х также предположил, что у человека миокардализированные участки легочных вен могут выступать в роли «дроссельного клапана» для кровотока [Takino, 1933]. Следует отметить, что вплоть до XX века самопроизвольную сократительную активность торакальных вен не связывали с миокардиальными элементами данных структур.

К настоящему времени установлено, что у крыс кардиомиоциты обнаруживаются во внутрилегочных участках в стенке венул, имеющих диаметр от 25 мкм [Ludatscher, 1968]. Известно, что крупные легочные вены не имеют клапанных структур. Однако у грызунов в венах, имеющих диаметр менее 100 мкм, обнаруживаются «сфинктерные структуры» - кольцевые утолщения гладкой мускулатуры (группы гладкомышечных клеток, продольная ось которых перпендикулярна оси сосуда) [Jarkovska, 1985]. Вероятно, эти гладкомышечные «муфты» служат для регуляции оттока крови и регуляции давления в перикапиллярном русле малого круга кровообращения [Ohtani, 1980; Aharinejad et al., 1991, Hashizume et al., 1998; Hosoyamada et al., 2010]. Такие же структуры обнаружены в легочных венах крупных животных [Rhodin, 1978]. Важно, что в ветвях легочных вен диаметром >100 мкм слой гладкомышечный крайне тонкий и может лишь частично окружать сосуды [Paes de Almeida et al., 1975]. Возможно, что вены легких грызунов разделены на два отдела с разной функциональной реализацией однонаправленного тока крови. В первом отделе – отделе мелких венул - однонаправленный ток крови обеспечивается за счет гладкомышечных «сфинктеров». Во втором отделе – отделе венул с диаметром около 100 мкм и выше, отток крови обеспечивается за счет ритмического сокращения миокардиальной обкладки вен. Таким образом, миокардиальная обкладка в лёгочных венах может являться функциональным аналогом венозных клапанов [Benninghoff, 1930; Otterbach, 1938; Klika and Jarkovska, 1976].

Известно, что для наименьших представителей Muridae характерна экстремально высокая частота сердечных сокращений (более 600 уд/мин или 10 Гц). Некоторыми авторами [Kramer and Marks, 1965] сделано предположение, что развитость и протяженность миокардиальных рукавов ЛВ коррелирует с ЧСС. Известно также, что для мелких грызунов характерен малый конечно-диастолический объем, а длительность

электрической и механической систолы (при высокой ЧСС) низка. Предполагается, что у таких животных наполнение левого желудочка за счет пассивного притока крови во время диастолы недостаточно, и сокращающийся миокард легочных вен способствует его активному наполнению совместно с левым предсердием. Следует упомянуть, что еще Фаваро [Favaro, 1910] сделал предположение о наибольшей развитости экстракардиального миокарда у млекопитающих, имеющих наименьшую массу тела.

Помимо высокой ЧСС для мелких млекопитающих животных характерна малая общая площадь поперечного сечения как в артериальной, так и в венозной части сосудистого русла малого круга кровообращения. При малой площади сечения, скорость кровотока, а также сосудистое сопротивление в легочном кругу являются высокими. Сокращающиеся миокардиальные рукава, особенно в мелких легочных венах, могут способствовать преодолению вышеуказанного высокого сосудистого сопротивления. Таким образом, миокардиальная ткань ЛВ является у грызунов подобием «периферического сердца», характерным для некоторых беспозвоночных животных. Интересно, что данная гипотеза о физиологической роли миокардиальной ткани в ЛВ уже была высказана Аршнтейном, впервые выявившим чрезвычайно развитую миокардиальную ткань вен у крыс в 1877 году [Arnstein, 1877].

Активация симпатических нервных окончаний в легочных венах может приводить к увеличению сосудистого сопротивления, избыточной фильтрации плазмы и отеку легких [Eliakim and Aviado, 1961]. «Насосная» функция миокардиальных рукавов, помимо наполнения предсердия и желудочка кровью, может уменьшать фильтрацию через стенку сосудов и накопление жидкости в ткани легких, предотвращая их отек.

Тем не менее, до сих пор остается неизвестным происходят ли *in vivo* сокращения стенки легочных вен той же частотой, что и сокращения предсердий, а также происходят ли эти сокращения синхронно с предсердиями, особенно в дистальных участках вен. Возможно, что способность миокардиальной ткани ЛВ отвечать возбуждением и сокращением на ритм САУ различается значительно на разных стадиях онтогенеза [Hooker et al., 1964].

Ранее было показано, что высотная гипоксия вызывает ремоделирование артериальной и венозной части сосудистого русла в малом круге кровообращения, рост сопротивления в легочных венах и легочную гипертензию у грызунов [James and Thomas, 1968]. Ремоделирование стенки вен у крыс включает увеличение толщины стенки миокардиальных обкладок за счет гипертрофии и пролиферации кардиомиоцитов [Jarkovska and Ostadal, 1980, 1983]. Вероятно, миокард ЛВ у грызунов играет роль в адаптации легочного кровообращения к гипоксии и изменениям трансторакального

давления. Как указано выше, в миокардиальной ткани ЛВ присутствует множество клеток, продуцирующих ANP. Возможно, что гипертрофия миокардиальных рукавов, индуцированная гипоксией, приводит к росту синтеза и продукции ANP, который в свою очередь предотвращает гипоксическую вазоконстрикцию в легочных сосудах и рост тонуса ГМК вен.

Наконец, миокардиальные рукава легочных вен помимо гемодинамической функции могут играть роль паракринного регулятора в малом круге кровообращения. Продуцируемый и секретируемый кардиомиоцитами внутреннего слоя миокардиальной обкладки, натрийуретический пептид может связываться с рецепторами ГМК, и, что не менее важно, с рецепторами эндотелиальных клеток вен [Toshimori et al., 1988]. Локально высвобождаемый ANP может модулировать способность эндотелиоцитов продуцировать оксид азота, участвовать в сопряжении функций миокарда и тонуса сосудов.

2.4. Миокардиальная ткань легочных вен как источник предсердных тахикардий

2.4.1. Механизмы фибрилляции предсердий

Прежде, чем перейти к обсуждению связи миокардиальной ткани с возникновением предсердных тахикардий, необходимо дать краткую характеристику основной форме такой аритмии – фибрилляции предсердий (ФП), а также ее электрофизиологическим механизмам. Предсердная тахикардия и ФП характеризуется высокочастотным (400-600 импульсов/мин), несинхронным возбуждением и сокращением отдельных участков суправентрикулярного миокарда (в т.ч. предсердий), в результате чего предсердия теряют способность изгонять кровь и наполнять желудочки.

На протяжении всего XX века представление о возникновении и поддержании ФП менялось. Исторически наиболее раннюю концепцию механизма ФП предложил Винтерберг в 1906 году [Winterberg., 1906]. Согласно данной концепции в предсердиях должен существовать один или несколько очагов, активность которых приводит к возникновению внеочередных экстрасистол предсердий, трепетанию предсердий и ФП. На протяжении всего XX века представление об очаге с патологической активностью, как о механизме ФП, продолжало оставаться актуальным [Scherf, 1947]. Концепция патологического очага подразумевает, что в нем возникают возбуждения с частотой, более высокой, чем частота возбуждений в нормальном ритмоводителе сердца – САУ. Вышеуказанные очаги активности называют «фокальными центрами», «фокальными триггерами», «фокусами», «гетерогенными центрами», «гетеротопическими центрами», что акцентирует внеузловую (внесиноузовую) локализацию генератора ритма [Schotten et al., 2011].

В 1913 году было показано, что возбуждение может быть самоподдерживающимся в миокарде за счет непрерывной циркуляции вокруг анатомического препятствия [Mines, 1913]. Используя новый, на то время, метод электрокардиографии Томас Льюис («основатель клинической электрофизиологии») и анализируя записи электрической активности при ФП, пришел к выводу, что тахикардия обусловлена образованием в предсердиях одного или нескольких контуров циркуляции возбуждения. Гипотеза «круговой циркуляции возбуждения» в 1914-1920-х годах стала основной [Lewis and Schleiter, 1912; Lewis et al., 1921]. Впоследствии, разнообразные типы (контур) циркуляции возбуждения стали обозначать термином - *re-entry* (повторный вход, «замкнутые пути»). Концепция циркуляции возбуждения привела к появлению в электрофизиологии таких параметров как «длина волны возбуждения» (произведение скорости распространения возбуждения и рефрактерного периода), «критическая масса

ткани» (минимальное количество ткани, в которой способна возникнуть циркуляция) и «блок проведения» (затухание волны возбуждения в ткани) [Garrey, 1914].

В 1946 году математиком Норбертом Винером и мексиканским физиологом Артуром Розенблютом, «пионерами» кибернетики была впервые предложена математическая модель, описывающая условия возникновения и существования циркуляции возбуждения в двумерной возбудимой среде с аксиоматически заданными параметрами (т.е. в среде, имитирующей ткань сердца) [Wiener and Rosenblueth, 1946]. Математическая модель Винера – Розенблюта позволила теоретически описать условия возникновения и существования циркулирующих волн в миокарде, являющихся основой ФП [Rosenblueth and Ramos, 1947]. Подход, предложенный Винером, был исследован и развит в работах участников семинара, организованного в 60-х годах советским математиком И.М. Гельфандом. Эти работы дали толчок теоретическим и практическим исследованиям механизмов ФП, развитию отечественной математической электрофизиологии [Соловьева, 2006]. В 1960-х годах Гордоном Моу и коллегами [Moe et al., 1964] была высказана гипотеза, согласно которой, в пределах суправентрикулярного миокарда при ФП сосуществует множество распространяющихся хаотически волн re-entry. Многоволновая гипотеза ФП Г. Моу была подтверждена с помощью компьютерного моделирования, впервые примененного для исследования электрофизиологических процессов в сердце.

В дальнейшем было показано, что в ФП может представлять собой одновременное существование нескольких стабильных контуров циркуляции возбуждения (концепция «ведущего контура re-entry», leading circle re-entry [Allessie et al., 1990; 2001]. В одной из модификаций данной гипотезы предполагается существование в предсердиях исходного «материнского источника» циркуляции возбуждения или «ротора», который служит генератором дочерних «роторов» или, в определенных условиях, способен распадаться на множество хаотических волн re-entry [Jalife et al., 2002].

В настоящее время известно несколько механизмов инициации ФП: re-entry может возникать при прохождении волны возбуждения через границу между участками ткани, обладающими разными биоэлектрическими свойствами, в частности, обладающими разной рефрактерностью [Allessie et al., 1990]; re-entry также возникает при «столкновении» волн возбуждения с невозбудимым участком миокарда [Rosenshtraukh et al., 2004]. Для инициации ФП важна активация парасимпатических интрамуральных волокон и выброс ацетилхолина (АЦХ) нервными окончаниями. Поскольку экспрессия М-холинорецепторов в миокарде предсердий неравномерна, АЦХ приводит к неравномерному укорочению потенциалов действия (ПД) и снижению рефрактерности в разных участках предсердий.

Укорочение ПД и рефрактерности приводит к уменьшению длины волны re-entry и снижению «критической массы ткани», в которой циркуляция может возникнуть, а усиление электрофизиологической гетерогенности ткани облегчает инициацию re-entry. Таким образом, патологическая активность парасимпатических нервов может служить причиной возникновения ФП [Anyukhovskiy and Rosenshtraukh, 1999]. Помимо вышеперечисленных, целый ряд тканевых механизмов может приводить к инициации ФП. Однако, в наибольшем количестве случаев ФП возникает при участии активности эктопического очага и тканевых факторов. Потенциалы действия, возникающие в эктопическом очаге, являются внеочередными. Вызванная ими волна возбуждения медленно распространяется по ткани, неоднородной по электрофизиологическим показателям. В таких условиях, с высокой вероятностью, в миокарде возникает re-entry или ротор, десинхронизирующий активацию предсердного миокарда, и, соответственно, приводящий к ФП. Согласно классическим представлениям триггеры Винера и Розенлбюта, являются необходимым условием инициации циркуляции возбуждения и тахикардий.

Следует отметить, что некоторые участки суправентрикулярного миокарда предрасположены к фокальной, эктопической активности [Dobrzynski et al., 2013]. В одних работах указывается, что наиболее часто эктопический фокус обнаруживается в межвенной области в правом предсердии за пределами САУ [Sharifov et al., 2000]. В других работах сообщается, что наиболее часто источником ФП является эктопическая активность в устье верхней полой вены либо область пограничного гребешка в правом предсердии [Hsieh et al., 2001]. В последнее время, основным источником фокальной активности, приводящей к ФП, рассматривается миокардиальная ткань легочных вен. Установлению данного факта способствовала разработка интервенционных методов терапии ФП.

2.4.2. Идентификация миокарда легочных вен, как основного источника эктопической, профибрилляторной активности

Одной из первых процедур, направленных на подавление пароксизмов фибрилляции предсердий являлась т.н. операция «лабиринт» [Cox et al., 1991]. В ходе данной хирургической процедуры наносили серию коротких, пересекающихся надрезов на поверхность правого и левого предсердия. В анатомически разобщенном предсердном миокарде циркуляция фибрилляторных волн оказывалась невозможной, что приводило к прекращению фибрилляции предсердий. Поскольку данная процедура проводилась при открытой грудной клетке и являлась высокоинвазивной, то вскоре была разработана эндокардиальная модификация операции «лабиринт», основанная на использовании т.н. абляционных катетеров. С помощью вышеуказанных катетеров, вводимых в полость камер

сердца через вены, наносят не механические разрезы, а осуществляют крио- или радиочастотное разрушение ткани. В 1990-х годах было обнаружено, что в ходе процедуры аблации по мере приближения «аблационных линий» (бороздок разрушенной ткани) к устьям легочных вен частота фибрилляторных волн, определяемая по предсердным электрограммам, снижается, электрическая активность предсердий становится более организованной, и фибрилляция предсердий, в конце концов, прекращается [Swartz et al., 1994]. В нескольких клинических работах было показано, что избирательная, целенаправленная аблация устьев легочных вен приводит к прекращению фибрилляции предсердий [Walsh et al., 1992; Jais et al., 1997]. Это наблюдение позволило предполагать, что эктопические очаги, приводящие к ФП, располагаются и в легочных венах. Впоследствии, появилось множество работ, которые были направлены на исследование миокарда легочных вен как ткани, в которой происходит инициация ФП.

Вероятно, что впервые потенциальная способность миокарда легочных вен являться источником эктопической активности, приводящей к тахикардиям, была предположена в начале 1980-х годов. Профессором Чеунгом из университета в Монаше (Австралия) было опубликовано всего две работы, одна из которых в журнале Nature [Cheung, 1980; 1981], касательно биоэлектрических свойств ткани стенки ЛВ. Чеунгом было показано, что миокардиальная ткань ЛВ способна самопроизвольно и независимо от САУ генерировать потенциалы действия, а также, что миокард лёгочных вен электрически связан с предсердным миокардом. Чеунг предположил, что способность легочных вен к автоматии обусловлена наличием в дистальных участках пейсмекеро-подобных кардиомиоцитов, сходных с таковыми в сино-атриальном узле и демонстрирующих медленную диастолическую деполяризацию. Как указано выше, такие клетки (Р-клетки) были найдены в ЛВ лишь в одном исследовании [Masani, 1986]. Чеунгом было выдвинуто предположение, что миокард легочных вен может быть рассмотрен как латентный или «субсидиарный» пейсмекер, поскольку в естественных условиях частота спонтанных возбуждений низка и автоматия подавляется ритмическими волнами возбуждения, поступающими из САУ. Кроме того, в работах Чеунга было получено подтверждение того, что гладкомышечные клетки ЛВ не могут индуцировать генерацию ПД в кардиомиоцитах и служить причиной автоматической активности.

Впервые в работах 1980–1981 года было установлено, что миокард легочных вен, как и волокна Пуркинье [Ferrier et al., 1973; Ferrier, 1977] чувствителен к убаину, в присутствии которого в ткани возникают осцилляторные постпотенциалы (иначе - постдеполяризации). Поскольку было известно, что постпотенциалы, возникающие в определенных условиях в волокнах Пуркинье, могут являться триггером фибрилляции

желудочков, Чеунг предположил, что легочные вены, могут посредством такого же механизма приводить к фибрилляции предсердий.

Вероятно, что первым, кто систематически рассмотрел легочные вены, как источник ФП с клинической и эпидемиологической точки зрения был Майкл Хайсаггер (Michel Haïssaguerre) и сотрудники его научной группы из кардиологического госпиталя и Университета Бордо (Франция) [Haïssaguerre et al., 1998]. Установлению данного факта предшествовала серия работ, касающихся выяснения источников и разработки методов абляционной терапии ФП [Jais et al., 1997; Haïssaguerre et al., 1994a; 1994b]. Авторами было показано, что в преобладающем количестве случаев (от 50% до 95% в разных клинических группах) источником ФП у человека является “эктопический фокус”, расположенный в области устьев легочных вен (Рис.2.2). Спустя 5 лет после выхода данной работы процедура абляции (радиочастотной изоляции) легочных вен с использованием эндокардиальных катетеров и компьютеризированных систем электро-анатомического картирования становится рутинным способом лечения фибрилляции предсердий [Arentz et al., 2003]. В этот же период появляется огромное количество клинических публикаций, описывающих особенности активности фокальных очагов в ЛВ и клинические аспекты процедуры абляции.

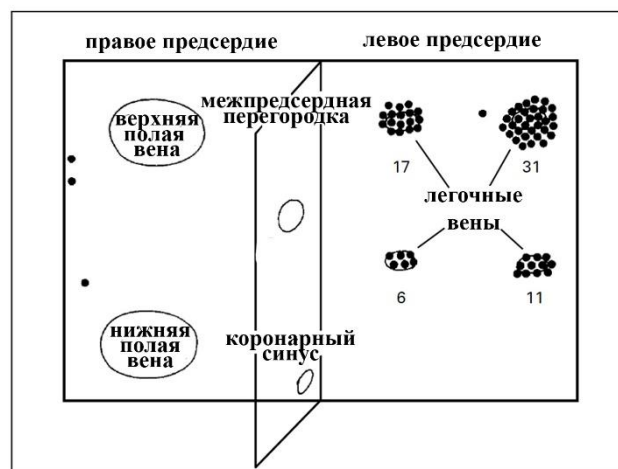


Рис. 2.2. Диаграмма распределения эктопических фокальных очагов в суправентрикулярной области сердца человека (69 пациентов). Приведено с изменениями по Haïssaguerre M. et al., N. Engl. J. Med. 1998.

В 1990-х годах в экспериментальную и клиническую практику входят эндокардиальные корзинчатые («basket»-катетеры) многополюсные катетеры (Constellation™, FIRMap™), позволяющие одновременно регистрировать локальные электрограммы (точечные эндограммы) с эндокардиальной поверхности левого предсердия и устьев легочных вен [Triedman et al., 1997; Schmitt et al., 1999]. Регистрация электрической активности с помощью корзинчатых катетеров позволила локализовать фокальные очаги, а

также на основе эндограмм реконструировать последовательность и паттерн активации, определить пространственно-временные характеристики фронтов деполяризации миокарда в легочных венах, левом предсердии при ФП [Zrenner et al., 2000; Barbaro et al., 2002]. При картировании очагов профибрилляторной активности с помощью мультиполюсных катетеров впервые было продемонстрировано, что эктопическая волна возбуждения, происходящая из ЛВ, действительно «захватывает» предсердный миокард [Haissaguerre et al., 2000].

Через 10 лет после первой работы, сотрудниками группы Хайсаггера была опубликована клиническая работа, в которой с помощью мультикатетерного картирования было подтверждено, что спонтанная эктопическая (фокальная) активность небольших, локализуемых очагов в легочных венах, действительно инициирует фибрилляцию предсердий у человека [Arentz et al., 2007]. В этой и других работах авторами было установлено, что волна возбуждения, имеющая фокальное происхождение, может индуцировать re-entry в самих миокардиальных рукавах, устьях ЛВ или прилегающем к устьям ЛВ предсердном миокарде. Авторы установили, что причиной установления re-entry является низкая скорость и блоки проведения возбуждения, искривление фронта волны возбуждения в устьях ЛВ [Kumagai et al., 2004]. Основываясь на гисто-морфологических исследованиях миокарда легочных вен, рядом авторов было сделано предположение, что аномальный характер проведения волны возбуждения в легочных венах крупных животных и человека обусловлен крайне сложной цитоархитектоникой, неоднородностью миокардиальной ткани [Nocini et al., 2002].

Таким образом, уже в 2000-х годах было сделано предположение, что в основе аритмогенности миокарда легочных вен может лежать сразу несколько механизмов, включая т.н. триггерную активность, аномальную автоматию, роторную активность и циркуляцию волн возбуждения (re-entry) [Chen et al., 2000; Po et al., 2005; Patterson et al., 2007]. К настоящему времени показано, что в разных случаях, аритмогенность легочных вен действительно может быть связана как с одним, так и с комбинацией нескольких вышеперечисленных явлений [Arora et al., 2003; Schneider et al., 2003].

2.5. Механические и электрофизиологические свойства миокардиальной ткани легочных вен

2.5.1. Сократимость миокардиальной ткани легочных вен

Несмотря на давнюю историю открытия, функциональные свойства миокарда в торакальных венах долгое время оставались не исследованными. Впервые способность миокардиальной ткани в торакальных венах развивать активное, быстрое сокращение, исследована Мак-Леодом и Хантером в 1967 [MacLeod and Hunter, 1967]. В экспериментах с тканевыми препаратами легочных и полых вен, полученных от крыс, вышеуказанные авторы показали, что механические свойства миокарда «в общих чертах», сходны с таковыми в предсердиях: тканевые препараты развивают сокращение в ответ на электрическую стимуляцию, а холинергическая или адренергическая стимуляция приводит к отрицательному и положительному инотропному эффекту в данной ткани, соответственно. Позже, были исследованы адренорецепторные механизмы контроля сократимости миокарда легочных вен с использованием тканевых полосок, полученных от крыс. Установлено, что как активация β_1 -, так и α_1 -адренорецепторов приводит к усилению сократимости миокардиальной ткани ЛВ, регистрируемой в изометрическом режиме [Mauroil et al., 2007].

Помимо сокращений, характерных для поперечнополосатой мускулатуры, легочные вены способны изменять свой тонус за счет наличия в стенке тонкого слоя гладкомышечных клеток. Установлено, что стенка легочных вен крыс демонстрирует типичные вазомоторные реакции: в кольцевых препаратах сосудов развивается констрикция в ответ на фенилэфрин и ангиотензин II. Доноры оксида азота вызывают релаксацию ГМК обкладки легочных вен. Изопротеренол в ЛВ вызывает вазоконстрикцию и этот эффект опосредован адренорецепторами β_2 -типа [Bronquard et al., 2005; 2007]. Норадреналин, адреналин, серотонин вызывают сократительные ответы в тканевых препаратах различных сегментов легочных вен человека и собаки [Smith et al., 1970].

2.5.2. Электрофизиологические свойства миокардиальной ткани легочных и полых вен

Электрически вызванные потенциалы действия предсердного типа в тканевых полосках, полученных из легочных (и полых) вен, впервые были зарегистрированы в 1967, 1968 г [Tasaki H., 1968; MacLeod and Hunter, 1967]. Вышеуказанные авторы, видимо, впервые установили, что ПД легочных вен, хоть и имеет отличную длительность, но их конфигурация сходна с таковой в предсердном миокарде – т.е. электрически вызванные ПД имеют быстрый фронт деполяризации, амплитуду порядка 100 мВ и короткую фазу плато.

В работе 1967 года было также показано, что ацетилхолин в ЛВ вызывает типичное для предсердного миокарда снижение длительности ПД, а эффект АЦХ подавляется атропином. Используя препараты легочных вен морской свинки, Тасаки показал, что адреналин и изопротеренол вызывают изменение конфигурации ПД и «пейсмекерную» активность [Tasaki H., 1968].

В работе 1975 года было установлено, что электрически вызванные ПД с быстрым фронтом (200-600 В/с) обнаруживаются в устьях, проксимальных и дистальных отделах легочных вен крысы. Опираясь на расчёты, полученные при регистрации электрической активности с помощью микроэлектродов, было установлено, что скорость проведения возбуждения в ЛВ крысы приблизительно соответствует таковой в предсердном миокарде (0,5-1,2 м/с) [Paes de Almeida et al., 1975]. Однако в ЛВ морской свинки скорость проведения возбуждения падает по мере удаления от устья [Tasaki H., 1968]. После выяснения в 1970-х гг. того факта, что миокардилальная ткань ЛВ электрофизиологически активна, эта структура оставалась вне поля зрения исследователей до 2000-х годов, когда стала очевидна ключевая роль этой структуры в индукции ФП.

Известно, что у различных низших млекопитающих животных (рыб, амфибий, рептилий) функцию ритмоводителя сердца выполняет миокард венозного синуса, а также, прилегающих к нему и имеющих общее эмбриональное происхождение, структур [Burke, 1957; Ju and Allen, 1999]. Биоэлектрические свойства миокардиальной ткани именно полых вен, а также их способность к пейсмекерной активности были изучены несколькими группами исследователей в 1960-70-х гг. в связи с изучением механизмов формирования и регуляции ритма сердца в классе позвоночных животных. Японскими авторами было показано, что электрически вызванные трансмембранные потенциалы действия в миокарде полых краниальных вен кролика отличаются по длительности и характеру реполяризации от таковых в предсердном миокарде, но в ответ на адренергические и холинергические воздействия изменяются так же, как в предсердиях [Arita et al., 1967; Saeki, 1967]. Было впервые установлено, что «импульсы», возникающие в САУ, распространяются в миокардиальную ткань краниальных полых вен кролика, а также, что в полых венах легко возникают блоки проведения возбуждения [Ito et al., 1964; Arita 1966; Arita et al., 1966]. Следует отметить, что авторы связывали особенности проведения возбуждения в полых венах с взаимодействием миокардиального и гладкомышечного компонента сосудистой стенки, что не подтверждается в настоящее время [Mashiba et al., 1963]. Установлено, что в полых венах кролика могут наблюдаться как ПД предсердного типа, так и ПД с диастолической деполяризацией, характерные для пейсмекерного миокарда: аппликация аконитина легко вызывает в полой вене спонтанные ПД пейсмекерного типа. Показано, что

спонтанно возникающие ПД в полой вене могут распространяться в направлении правого предсердия. Таким образом, было установлено, что полая вена может являться «эктопическим пейсмекером». В экспериментах *in situ* было показано, что «эктопическая активность» в полой вене может вызывать тахикардию [Yanaga et al., 1966]. На основании своих работ авторы предложили, что между САУ и миокардом полых вен имеет место особый тип проведения возбуждения - «синокавальный». Зоны с особым типом проведения возбуждения, согласно предположениям авторов, локализуются на границе между предсердиями и устьями полых вен. В этих участках скорость проведения возбуждения снижается до 10-25 см/с, хотя в более дистальных участках вен возрастает до 40-80 см/с. Именно эти участки миокардиальной ткани, названные «синокавальными зонами» (Рис.2.3), могут принимать функцию «эктопических пейсмекеров», и в этих зонах возникают блоки проведения возбуждения [Ito et al., 1967]. Авторы вышеперечисленных работ пришли к заключению, что именно миокард полых вен, благодаря особым электрофизиологическим свойствам может являться основным источником аритмогенной активности в сердце человека. Как известно в настоящее время, устья вен действительно служат наиболее частым источником проаритмической активности, но это утверждение справедливо для легочных вен [Haïssaguerre et al., 1998].

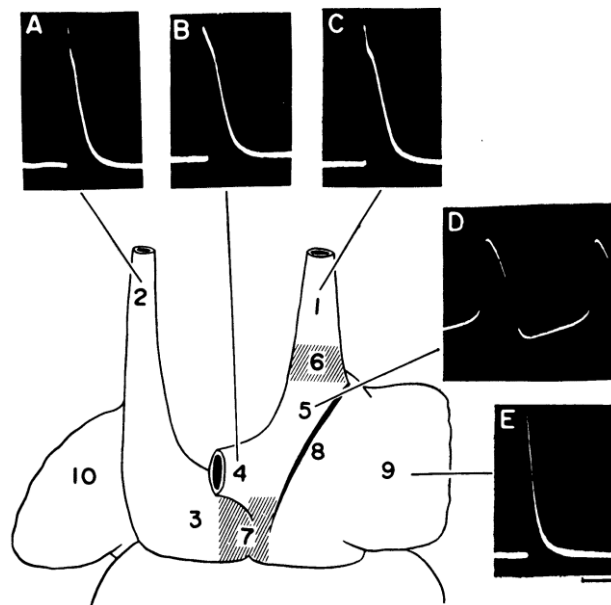


Рис.2.3. «Синокавальные зоны» в суправентрикулярной области сердца кролика. Показаны репрезентативные примеры ПД в ушке правого предсердия (E), САУ (D), правой краниальной (C), левой краниальной (A) и устье нижней полой вены (B). Приведено по *Ito et al., 1967*.

Отечественными авторами показано, что миокардиальная ткань передних полых вен не только у млекопитающих, но и у амфибий способна спонтанно генерировать ПД

пейсмерного типа, а также, в определенных условиях, являться основным ритмоводителем сердца. Холинергическая и адренергическая стимуляция вызывает в полых венах амфибий, как и в венозном синусе [Del Castilio and Katz, 1955], типичные эффекты: гиперполяризацию, снижение частоты спонтанных ПД и невозбудимость [Hutter and Trautwein, 1952, 1955], а также увеличение скорости диастолической деполяризации и усиление автоматии, соответственно [Чуканова, 1970; Сухова и др., 1973, 1977].

В 2000-х годах одновременно несколько научных групп из Японии, Тайваня, Франции и США в связи с появлением новых клинических сведений начаты экспериментальные фундаментальные исследования свойств миокарда легочных вен, именно источника аритмогенной активности, приводящей к фибрилляции предсердий.

Значительный вклад в изучение электрофизиологии миокардиальной ткани легочных вен внесли авторы из университета Того; университета Акито. Авторы этих работ были вдохновлены пионерскими работами по изучению свойств полых вен, проведенных в Японии в 1960—1970-х годах. Учеными двух вышеуказанных научных групп были изучены некоторые биоэлектрические особенности ЛВ с использованием грызунов (мышей, крыс и морских свинок) и кроликов.

В данных работах показано, что тканевые препараты легочных вен всех вышеперечисленных животных склонны к формированию эктопической активности в форме периодических залпов спонтанных ПД либо персистирующих спонтанных ПД [Namaguchi et al., 2015; Namekata et al., 2013]. Показано, что характеристики ПД легочных вен при эктопической активности крайне разнообразны: потенциалы действия могут иметь конфигурацию нормальных предсердных ПД, либо быть сходными с пейсмерными («медленными») потенциалами и обладать фазой «диастолической деполяризации»; ЛВ также могут демонстрировать спонтанные ПД с промежуточной конфигурацией. Установлено, что при спонтанной активности ПД часто сопровождаются постдеполяризациями, т.е. демонстрируют триггерную активность [Takahara et al., 2011; Tsuneoka et al., 2012]. Общим свойством для легочных вен всех видов животных является тканевая гетерогенность ПД [Miyachi et al., 2009], нестабильность потенциала покоя, а также то, что инициация автоматической активности сопровождается значительным сдвигом ПП, особенно при адренергической либо холинергической стимуляции [Tsuneoka et al., 2012]. Активация адренорецепторов как α -, так и β -типа приводит к значительным изменениям биоэлектрической активности в ЛВ и, видимо, необходима для индукции эктопической автоматии [Irie et al., 2017].

Авторами данных работ выполнены не только феноменологические исследования, но изучены некоторые электрофизиологические механизмы эктопической автоматии

легочных вен. Показано, что в основе автоматической активности в ЛВ грызунов могут лежать спонтанные выбросы ионов Ca^{2+} , обусловленные активацией IP₃-рецепторов, накоплением цАМФ в результате действия специфических Са-зависимых аденилатциклаз (АСЗ) [Namekata et al., 2010, 2013; Okamoto et al., 2012, 2022]. В частности, показано, что важным фактором эктопии ЛВ у морской свинки является деполяризующий ионный ток, генерируемый натрий-кальциевым обменником (NCX) [Tanaka et al., 2007; Namekata et al., 2009], а также «недостаток» реполяризующих ионных токов [Namekata et al., 2013]. Японскими авторами показано, что в кардиомиоцитах ЛВ морской свинки плотность основного ионного тока I_{K1} , поддерживающего ПП, значительно снижена по сравнению с уровнем в предсердных клетках [Tsuneoka et al., 2017].

Японским учеными впервые были изучены эффекты антиаритмических фармакологических соединений в миокардиальной ткани ЛВ. Выявлено, что антиаритмическое действие соединений (препаратом I, II, III, IV класса) может быть снижено или изменено в ЛВ вследствие локальных электрофизиологических особенностей [Takahara et al., 2012; 2014]. К таким особенностям, по крайней мере у морских свинок, может относиться интенсивный «поздний», неактивируемый Na^+ -ток ($\text{I}_{\text{Na,late}}$), обуславливающий отчасти, диастолическую деполяризацию и предрасположенность к спонтанной активности в ЛВ [Irie et al., 2019]. Показано, что только те препараты I класса, которые способны подавлять $\text{I}_{\text{Na,late}}$ (флекаинид, пропafenон), вызывают ослабление спонтанной автоматической активности в легочных венах [Irie et al., 2020].

В работе Hamaguchi впервые установлен патогенетический механизм, способствующий профибрилляторной активности в легочных венах: показано, что в кардиомиоцитах ЛВ при действии механического растяжения происходит индукция спонтанных потенциалов действия. Таким образом, перегрузка объемом левого предсердия и легочных вен может приводить к ФП [Hamaguchi et al., 2016]. Японскими авторами показано, что механочувствительность кардиомиоцитов ЛВ морских свинок и, возможно, крыс связана с экспрессией ими специфических, активируемых гиперполяризацией, хлорных каналов (CLCN2 с добавочной субъединицей HSPA8) и соответствующего тока ($\text{I}_{\text{Cl,h}}$) [Okamoto et al., 2014, 2019]. Активация данных ионных каналов, в различных условиях, усиливает диастолическую деполяризацию в кардиомиоцитах и делает возможной инициацию спонтанных ПД [Takagi et al., 2020].

Авторами из Франции (Университет Франсуа-Рабле, Тур) выявлены эффекты адренергических воздействий и показано, что как β_1 -, так и α_1 -адренорецепторы участвуют в контроле ПП и эктопической активности в миокарде легочных вен [Doisne et al., 2009].

В 2000-х годах в лаборатории Бенджамина Шерлага (Университет Оклахомы, США), изобретателя метода гисографии, для изучения особенностей вегетативной регуляции биоэлектрических свойств легочных вен использовали крупных животных (собака) [Patterson et al., 2005, 2007]. В этих работах было установлено, что стимуляция автономных нервов, активация как парасимпатических, так и симпатических интрамуральных нервных волокон, является одним из основных условий возникновения эктопической активности в миокарде ЛВ, индукции триггерной или аномальной автоматии в легочных венах.

В первой работе группы исследователей из Института клинической медицины Тайпейского госпиталя ветеранов (Тайвань) [Chen et al., 1999] подтверждены данные М. Хайсаггера о преимущественной локализации эктопических очагов в легочных венах, а также показано, что у человека бета-блокаторы, кальциевые антагонисты и антиаритмики I класса способны подавлять эктопию в ЛВ. В экспериментальных исследованиях Ю-Йена Чена (*Chen Y-J*) и коллег была продемонстрирована способность миокардиальных рукавов ЛВ собаки генерировать спонтанные ПД и локализованы эктопические очаги в устьях вен [Chen et al., 2000]; было установлено, что высокочастотная стимуляция ЛВ усиливает предрасположенность данной ткани к эктопической активности [Chen et al., 2001]; были охарактеризованы основные ионные токи (ICa,L, ICa,T, Ito, IK, IK1) в кардиомиоцитах ЛВ кролика [Chen et al., 2002, 2004]. В последующие полтора десятилетия сотрудниками данной группы (под руководством Ю-Йена Чена) опубликован ряд работ, который по сути является скринингом эффектов биологически активных соединений и фармакологических субстанций в миокардиальной ткани легочных вен. В качестве результата, в основном, в данных работах оценивается модуляция эктопической спонтанной и триггерной активности миокарда ЛВ исследуемыми соединениями. В частности, проведено исследование влияния доноров оксида азота [Lin et al., 2010], сероводорода [Chan et al., 2018], тестостерона [Tsai et al., 2014], ангиотензина 1-7 [Lu et al., 2018], аргинин-вазопрессина [Huang et al., 2019], предсердного натрийуретического фактора [Lu et al., 2020], ингибиторов факторов свертывания крови [Chang et al., 2018], эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF) [Chang et al., 2021], фактора роста фибробластов (FGF-23) [Lu et al., 2022], модификаторов проводимости щелевых контактов [Chang et al., 2016], ингибиторов фосфодиэстераз [Yugo et al., 2021], токсина латрункулина В [Lu et al., 2016], уремических токсинов [Chen et al., 2015], НПВСП [Chang et al., 2015] и прочего.

В последние годы появляются математические модели потенциалов действия и спонтанной активности в кардиомиоцитах легочных вен [Seol et al., 2008; Umehara et al., 2019].

2.5.3. Характеристики основных ионных токов кардиомиоцитов легочных вен, определяющих тип электрической активности

Данные о величине и кинетики основных ионных токов, формирующих ПД (как рабочего, так и пейсмекерного типа) в легочных венах крайне противоречивы. Противоречивость, вероятно, обусловлена разными видами животных, использованных в экспериментах, а также условиями самих экспериментов. На основе имеющихся в литературе данных крайне сложно сформировать целостное представление о электрофизиологическом «профиле» кардиомиоцитов ЛВ.

Уровень экспрессии каналов Nav1.5, переносящих натриевый деполярирующий ионный ток I_{Na} , параметры в миокарде ЛВ и предсердиях собак не различаются, однако у других животных могут различаться [Parrone et al., 2000]. Имеются сведения, согласно которым каналы Nav1.5 ионного тока I_{Na} в ЛВ у некоторых грызунов обладают особыми свойствами – постоянной проводимостью при мембранной потенциале, близким к потенциалу покоя ($I_{Na,late}$) [Irie et al., 2019; Malécot et al., 2015]. Ионный ток $I_{Ca,L}$ в миокардиальных рукавах собак снижен по сравнению с предсердиями [Patterson et al., 2007]. Однако в других работах показано, что в кардиомиоцитах рукавов ЛВ, демонстрирующих диастолическую деполяризацию, наблюдается ток $I_{Ca,T}$, а также экспрессия ионных каналов Cav3.1, характерных для пейсмекерных кардиомиоцитов САУ [Malécot, 2020]. Предполагается, что данный ток играет существенную роль в генерации автоматической и триггерной активности в ЛВ [Patterson et al., 2006; Bredeloux et al., 2021].

Для кардиомиоцитов ЛВ собаки характерно значительно более выраженная экспрессия каналов, переносящих токи I_{Kr} , I_{Ks} , по сравнению с предсердными кардиомиоцитами [Patterson et al., 2007]. Более выраженные токи задержанного выпрямления определяют низкую длительность ПД у этих животных. Однако длительность ПД в ЛВ у грызунов выше, чем в предсердиях.

У собак калиевый компонент транзитного тока I_{to} в кардиомиоцитах рукавов ЛВ выражен значительно меньше, чем в предсердиях. Отсутствуют данные о базальной составляющей тока $I_{K(Ach)}$ в миокардиальных рукавах ЛВ. Известно, что в условиях модели хронической ФП базальная составляющая тока $I_{K(Ach)}$ в предсердиях собак значительно увеличивалась [Pedrote et al., 2009].

Экспрессия каналов, переносящих ток аномального выпрямления I_{K1} , в кардиомиоцитах рукавов ЛВ значительно ниже, чем в кардиомиоцитах предсердий (58% от уровня в предсердиях у собаки) [64, 65]. Возможно, что из-за низкого уровня экспрессии каналов ($Kir2.x$) тока I_{K1} в кардиомиоцитах рукавов ЛВ потенциал покоя (ПП)

положительнее, чем ПП, наблюдающийся в левом предсердии [Parrone et al., 2000]. Помимо влияния на ПП, снижение базального уровня I_{K1} приводит к увеличению входного сопротивления клетки. В таких условиях небольшое изменение тока, протекающего через мембрану, будет приводить к значительному сдвигу мембранного потенциала. Например, небольшой деполяризующий ток, протекающий во время окончания фазы 2 ПД, начала фазы 3 ПД, может привести к развитию постдеполяризации и триггерной активности.

Ehrlich с коллегами в кардиомиоцитах ЛВ был обнаружен ток, активируемый гиперполяризацией. На основе фармакологического анализа и анализа кинетики было показано, что данный ток не является «пейсмекерным» током I_f . Авторами данный ток был обозначен как - ИКН [Perez-Lugones et al., 2003]. Для ИКН, как и для I_{K1} характерно аномальное выпрямление. Показано, что ток ИКН присутствует и в предсердиях, однако в кардиомиоцитах ЛВ он выражен гораздо сильнее. При значениях мембранного потенциала, близких к ПП, ток ИКН имеет выходящее направление, т.е. способствует реполяризации. Предполагается, что увеличенная экспрессия ИКН, наряду с I_{Kr} , I_{Ks} в дистальной области миокардиальных рукавов ЛВ определяет сниженную длительность ПД. Показано, что при хронической ФП экспрессия ИКН увеличивается, что снижает длину волны возбуждения в данной ткани и облегчает возникновение re-entry. Авторами сделано предположение, что ИКН участвует в функциональной перестройке миокарда при тахикардиях.

Согласно разным источникам, амплитуда тока Na/Ca -обменника в миокардиальных рукавах ЛВ ниже, либо не отличается от таковой в предсердном миокарде [Patterson et al., 2006]. Показано, что в кардиомиоцитах рукавов ЛВ собаки наблюдаются спонтанные выбросы кальция из саркоплазматического ретикулума [Mommersteeg et al., 2007]. В экспериментальных условиях в кардиомиоцитах рукавов ЛВ собаки увеличение уровня цитоплазматического кальция может приводить к росту деполяризующего компонента тока Na/Ca -обменника и развитию спонтанных ПД. Показано, что кардиомиоциты рукавов ЛВ кролика обладают меньшей способностью компенсировать колебания уровня цитоплазматического кальция по сравнению с предсердными кардиомиоцитами, вероятно, по причине менее развитого саркоплазматического ретикулума и меньшего уровня экспрессии Na/Ca -обменника [Po et al., 2005; 2006]. У мелких млекопитающих деполяризующая компонента тока NCX выше в ЛВ, чем в предсердиях [Pasqualin et al., 2018]. Клетки, обладающие такими свойствами, в условиях кальциевой перегрузки с большей вероятностью будут проявлять триггерную активность.

2.5.4. Проаритмические свойства миокардиальной ткани легочных вен

Совокупность накопленных сведений за несколько десятилетий позволяет предположить, что целый ряд свойств на молекулярном, клеточном, тканевом и системном уровне может лежать в основе «аритмогенности» легочных вен. В первом приближении, указанные свойства можно разделить на две группы по электрофизиологическому механизму: (1) «аритмогенность», связанная с нарушениями *проведения возбуждения*; (2) проаритмические эффекты, обусловленные *формированием эктопических импульсов*.

Под нарушением проведения возбуждения подразумевается формирование в миокардиальной ткани легочных вен одно- и двунаправленных блоков проведения возбуждения, снижение скорости проведения и длины волны возбуждения, формирование разного рода контуров циркуляции возбуждения [Iwasaki et al., 2011]. Циркуляция одной или нескольких волн возбуждения вокруг анатомических препятствий (macro re-entry), либо круговое движение волны возбуждения вокруг функционально невозбудимого центра (micro re-entry) являются «классическими» механизмами, поддерживающими мерцание или фибрилляцию предсердий [Heijman et al., 2014, Schotten et al., 2011]. Вероятно, миокард легочных вен является подходящим субстратом для re-entry, так как имеет сложную тканевую организацию [Saito et al., 2000].

Под патологическим формированием импульсов подразумевается тот факт, что миокард легочных вен способен к спонтанной активности. Кардиомиоциты легочных вен самостоятельно генерируют потенциалы действия [Iwasaki et al., 2011; Schotten et al., 2011]. Регистрируемая в экспериментальных условиях в кардиомиоцитах или многоклеточных препаратах легочных вен спонтанная активность имеет весьма разнообразный характер. Так, показано, что в ЛВ могут возникать серии спонтанных ПД, практически сходные с «нормальными» потенциалами рабочего миокарда [Miyachi et al., 2005]. В ряде работ продемонстрировано, что миокард легочных вен может характеризоваться низким уровнем потенциала покоя, диастолической деполяризацией и генерировать ПД, имеющие медленный фронт, т.е. электрической активностью, характерной для сино-атриального узла [Doisne et al., 2009, Park and Fishman, 2011]. В некоторых условиях миокардиальная ткань легочных вен может генерировать ПД с квази-постоянной периодичностью долгое время [Egorov et al., 2015]. С формальной точки зрения такую активность можно назвать «пейсмекерной», хотя фактически активный участок ткани не задает ритм работы всего сердца. Более подходящим термином, которым принято обозначать такого рода активность является «аномальная автоматия» или просто «автоматия».

В дополнение, для миокардиальной ткани легочных вен характерна триггерная активность (triggered activity) - то есть способность генерировать электрические «события»,

приводящие к возникновению внеочередных потенциалов действия в окружающей ткани или ткани предсердий [Chen et al., 1999, 2000]. Ранние и задержанные постдеполяризации (осцилляции мембранного потенциала в ходе 2-й и 3-й фазы ПД) являются триггерными событиями. Как показано выше, в экспериментальных условиях спонтанные потенциалы действия миокардиальной ткани легочных вен часто сопровождаются постдеполяризациями.

Несомненно, вышеописанное разнообразие характера регистрируемой электрической активности в ЛВ обусловлено разными экспериментальными условиями, типом препаратов (изолированные клетки, многоклеточные препараты), имеют видовую основу (т.е. связаны с тем, какое животное является источником миокардиальной ткани), а также связаны с тем, какой из участков миокардиальной обкладки используется в эксперименте. Преимущественный тип спонтанной активности в миокардиальной ткани легочных вен у человека остается неизвестным. Остается неизвестным, какой именно тип триггерной активности является приобщающим в ЛВ *in vivo*.

Каковы электрофизиологические причины способности легочных вен к автоматии? Основываясь на анализе литературы, особенности, которые могут делать миокардиальную ткань способной к спонтанной электрической активности, известны. Всего можно выделить три группы таких особенностей – это изменение мембранных ионных проводимостей; изменение внутриклеточной кальциевой динамики или внутриклеточных регуляторных (сигнальных) систем.

Характеристики целого ряда ионных мембранных проводимостей в миокарде легочных вен изменены по сравнению с нормальным рабочим миокардом аурикулярной части предсердий. Показано, что плотность реполяризирующих (калиевых) и деполяризирующих (кальциевых, хлорных) ионных токов отличается в легочных венах от таковой в рабочем миокарде у различных млекопитающих [Nathan and Gloobe, 1970]. Выявлены различия в работе ионных помп, например Na/K-АТФазы, а также ионных обменников, в первую очередь Na/Ca-обменника, в легочных венах и предсердиях [Jones et al., 2008, Melnyk et al., 2005].

Во-вторых, показано, что динамика внутриклеточного кальция в кардиомиоцитах легочных вен отлична от таковой в рабочем миокарде предсердий. Для легочных вен характерен более высокий уровень диастолического кальция, спонтанные выбросы кальция из депо саркоплазматического ретикулума [Logantha et al., 2010, Rietdorf et al., 2014]. Установлено, что работа ключевого фермента цитоплазматического круговорота кальция – кальциевой помпы саркоплазматического ретикулума в миокардиальной ткани легочных вен, имеет свои особенности [Jones et al., 2008].

Наконец, предполагается, что активность (базальная и стимулированная) внутриклеточных регуляторных молекул и каскадов существенно различается в миокардиальной ткани легочных вен и миокарде предсердий. Предполагается, что базальная активность мембранного фермента аденилатциклазы, регулирующего уровень цАМФ в клетке, выше в легочных венах, чем в предсердном миокарде [Goette et al., 2002]. Известно, что базальная активность аденилатциклазы высока в пейсмекерных клетках САУ [Younes et al., 2008]. Согласно одной из гипотез, именно данный фактор играет ключевую роль в автоматии сино-атриального узла [Larsson, 2010]. Повышение базальной активности АЦ и уровня цАМФ характерно для клеток, в которых снижен уровень экспрессии ТФ рабочего миокарда – Nkx2-5/TBX5/GATA4. Поэтому способность миокардиальной ткани к спонтанной активности, видимо, определяется на уровне молекулярно-генетических механизмов контроля фенотипа кардиомиоцитов.

Несмотря на обилие фактического материала, в настоящее время не описано какого-то конкретного универсального механизма, лежащего в основе способности легочных вен к спонтанной активности. Более того, появляющиеся в литературе результаты экспериментальных исследований зачастую противоречат друг другу, либо исключают предложенные ранее механизмы. Скорее всего, каждая из трех вышеперечисленных групп факторов (изменение мембранных ионных проводимостей, кальциевой динамики, активности внутриклеточных регуляторных молекул) вносит вклад в аритмогенность легочных вен. Все три группы вышеуказанных характеристик взаимосвязаны. Кроме того, все три группы характеристик взаимосвязано определяются «набором» или уровнем факторов транскрипции, имеющих в кардиомиоците.

Наиболее вероятно, что *in vivo* вышеперечисленные свойства клеточной электрофизиологии делают миокардиальную ткань ЛВ аритмогенной только в совокупности с тканевыми свойствами. Степень пространственной вариабельности, анизотропии тканевых свойств, видимо, сильно различается у крыс, кроликов, морских свинок, собак и человека. Например, связи пространственной дисперсии характеристик ПД и нарушений ритма посвящено большое количество работ (начиная с работ Гардона Моу) [Мое, 1974]. Считается, что увеличение разброса параметров ПД в ткани коррелирует с увеличением вероятности возникновения аритмий [Antzelevitch, 2008].

Ключевые факторы, обуславливающие тканевой разброс электрофизиологических параметров, а соответственно и нарушение нормального проведения возбуждения в ЛВ, остаются неизвестными.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Экспериментальные животные

В работе использованы тканевые препараты, полученные 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.

Для получения потомства крыс к половозрелым самкам подсаживали самцов в соотношении 3:2, через 14 дней самцов отсаживали, а самок помещали в индивидуальные клетки. После рождения и до 21-х суток жизни потомство содержали с самками в индивидуальных клетках, крысят отбирали из всех пометов равномерно, что позволяло получать в каждой возрастной группе животных сходной массы. В работе использовали препараты сердца, полученные от крыс в конце первых суток постнатального развития (P1), а также на 7-е, 14-е, 21-е сутки (P7, P14, P21) постнатальной жизни. Масса новорожденных крыс составила 6 ± 1 г 7-суточных крыс, 14 ± 2 г 14-суточных, 29 ± 4 г 21-суточных, 47 ± 8 г. Взрослыми считали крыс возрастом 60 суток. Тканевые препараты, полученные от взрослых крыс, относятся к группе P60.

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.

3.2. Получение тканевых препаратов предсердий и легочных вен

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.3.1). 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.

Однако 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.

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.

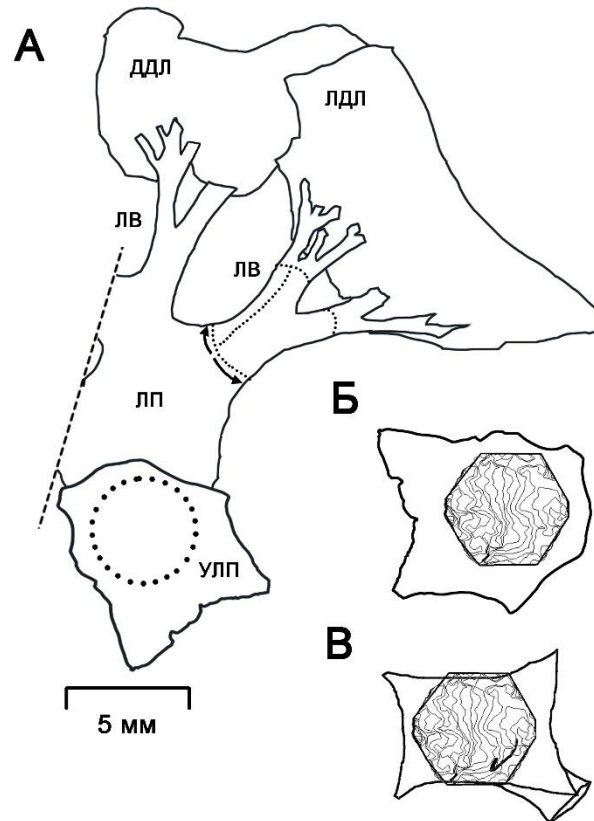


Рис. 3.1. Схематическое изображение препарата левого предсердия, легочных вен и долей легких крысы. **А.** общий вид изолируемой сердечно-легочной области крысы или мыши. Пунктиром показаны линии разрезов, наносимых для получения изолированного сегмента легочной вены. **Б.** изолированный тканевый препарат 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 кругом, 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.

3.3. Перфузия многоклеточных препаратов легочных вен

Изолированные препараты, включающие миокард левого предсердия и легочных вен, перфузировали при 37°C раствором Тирода с рН 7,2 – 7,4 следующего состава (ммоль/литр):

1. раствор для крыс: NaCl 129, KCl 4, NaH_2PO_4 20,9, MgSO_4 0,5, NaHCO_3 20, CaCl_2 1,2, глюкоза 5,0;

2. раствор для мышей: NaCl 118,0, KCl 4,7, NaH₂PO₄ 2,2, MgCl₂ 1,2, CaCl₂ 1,8, NaHCO₃ 25,0, глюкоза 11,0

3. раствор для морских свинок – соответствует составу для крыс;

4. раствор для кроликов: NaCl 130,0, KCl 4,7, NaHCO₃ 18,0, MgCl₂•6H₂O 1,05, CaCl₂ 1,8, NaH₂PO₄ 1,2, глюкоза – 11,0.

Перфузионный раствор непрерывно оксигенировали газовой смесью O₂ (95%) и CO₂ (5%). Скорость протока перфузионного раствора в экспериментах с тканевыми препаратами составляла 15 мл/мин при объеме перфузионной камеры 5 мл (3 объема экспериментальной камеры за 1 мин).

3.4. Регистрация биоэлектрической активности с помощью микроэлектродной техники

3.4.1. Экспериментальная установка для регистрации потенциала покоя и потенциалов действия

Для регистрации биоэлектрической активности использовали стеклянные микроэлектроды (сопротивлением 10-30 Мом и диаметром острия <1 мкм) заполненные 3М р-ром KCl 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.

3.4.2. Регистрация потенциала покоя, потенциалов действия и спонтанной автоматической активности

В различных участках предсердия и в различных отделах миокардиальных рукавов легочных вен конфигурация и длительность потенциалов действия различна. Значительная гетерогенность биоэлектрической активности характерна для крысы, мыши, так и человека. В частности, длительность ПД различается в области ушка предсердия (особенно в левом предсердии), трабекуляризированной части предсердия, в «свободной стенке» (гладкостенной части) предсердия, в переходной зоне между предсердием и венами, а также в миокардиальной «обкладке» легочных вен (Рис.3.2, Табл. 3.1.).

Таблица 3.1. Длительности ПД на уровне 90% реполяризации в различных отделах левого предсердия (ЛП) крысы (везде $n > 10$, n – количество животных и тканевых препаратов).

Отдел ЛП	ДПД 90% (ср±ст.ош.ср)
Ушко ЛП	35±5 мс
Трабекуляризованная часть ЛП	40±5мс
«Свободная стенка» ЛП	45±3 мс
Предсердно-венозный переход	74±4мс
Легочная вена (ЛВ)	72±4мс

Вышеуказанные различия обусловлены особенностями эмбриогенеза, разным соотношением ионных трансмембранных токов (в основном, калиевых), а у мышей, кроме того, особенностями кальциевой динамики кардиомиоцитов.

Изменение длительности ПД при действии агонистов мембранных рецепторов сильно зависит от зоны, в которой регистрируют потенциалы действия. Поэтому, при выполнении экспериментов учитывали место регистрации ПД. В качестве «контрольного» участка нами была выбрана зона «свободной стенки» левого предсердия. В экспериментах с легочными венами потенциалы действия регистрировали либо в устьях, либо в участке ствола вены, прилегающего к бифуркации первого порядка (если не указано иное для конкретной серии экспериментов), что позволило снизить разброс, обусловленный гетерогенностью электрофизиологических свойств ткани.

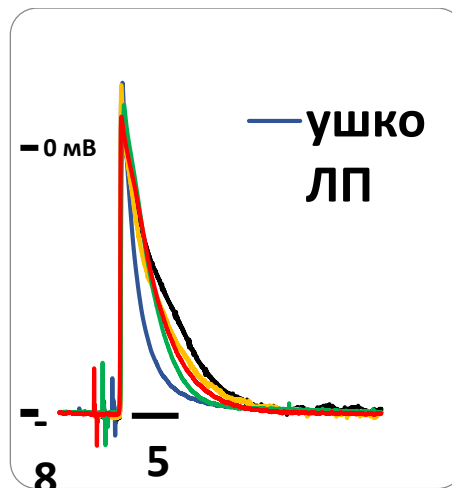


Рис. 3.2. Репрезентативные записи ПД, характерные для различных участков левого предсердия крысы.

3.4.3. Регистрируемые параметры

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/dt_{max}) по наибольшему значению производной сигнала.

Так как, миокард левого предсердия крысы не обладает собственной автоматией, ритм работы тканевых препаратов ЛП задавали с помощью стимулирующих электродов и регистрировали только электрически вызванные ПД. Для регистрации электрически-вызванных потенциалов действия осуществляли ритмическую непрерывную (*стационарную*) стимуляцию с помощью биполярных электродов (см. п. 3.2). 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 миокарде ЛВ могут быть зарегистрированы как электрически вызванные, так и автоматически возникающие - *спонтанные* – ПД (СПД). Для миокарда легочных вен крыс в *базальных* условиях, т.е. в условиях эксперимента, когда не осуществляли ритмическую

электрическую стимуляцию, а также когда на ткань не действовали агонистами каких либо мембранных рецепторов, либо когда не осуществляли стимуляции постганглионарных интрамуральных нервов, характерна низкая предрасположенность к спонтанной (автоматической) активности. В базальных условиях в миокарде ЛВ крысы возникают только единичные (спонтанные) ПД, следующие с интервалами 5-20 с (Рис. 3.3). Такой миокард ЛВ называли *покоящимся*.

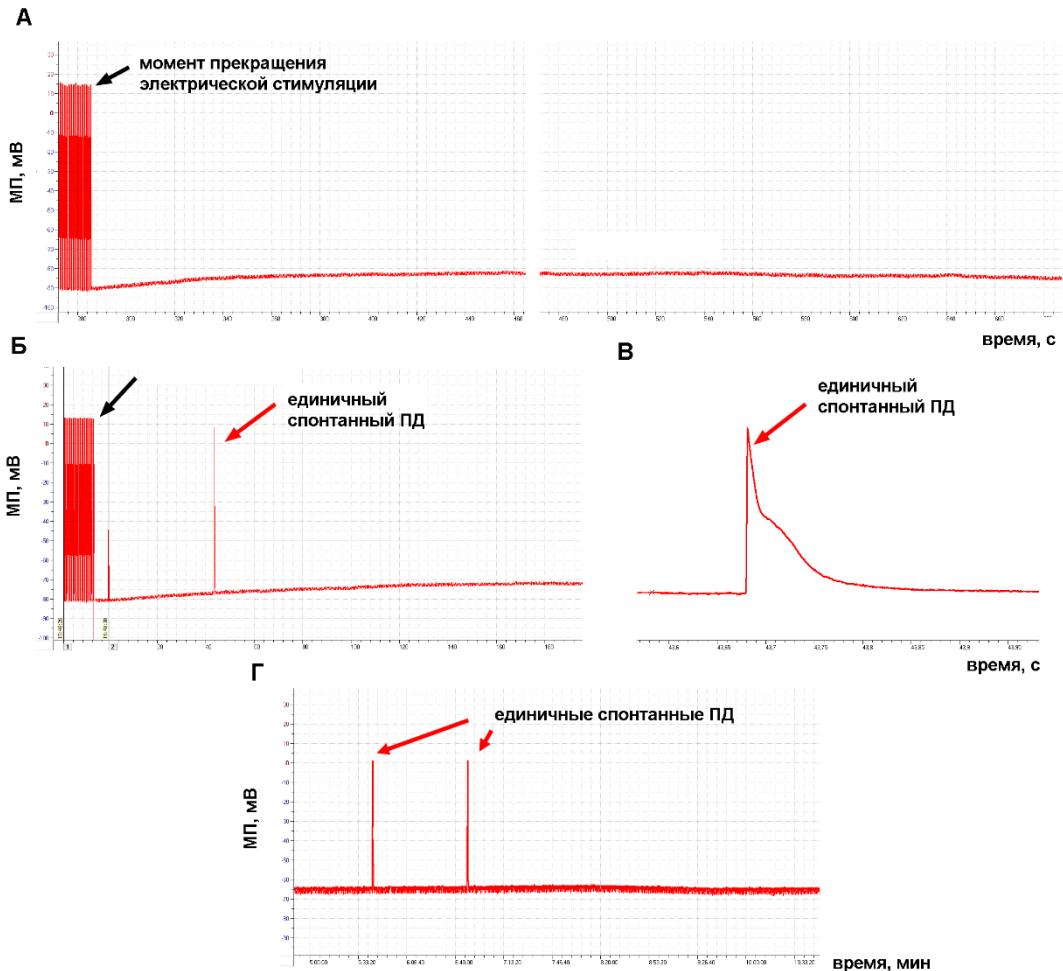


Рис.3.3. Единичные спонтанные ПД в покоящемся миокарде легочных вен крысы в базальных условиях.

В серии (n=8) контрольных экспериментов установлено, что, по крайней мере, в течение 3 ч после прекращения электрической стимуляции в базальных условиях в легочных венах не происходит появления залпов СПД – спонтанные ПД остаются крайне редкими и единичными. Если в ЛВ после прекращения электрической стимуляции не возникало ни одного СПД в течение 5 мин, то и в течение 3 ч такие препараты оставались полностью покоящимися (n=3).

Низкая предрасположенность к спонтанной активности характерна также для миокардиальной ткани ЛВ кроликов и морских свинок. Однако, у мышей некоторых линий в базальных условиях наблюдаются частые СПД.

В ответ на адренергические или иные стимулы спонтанная активность в покоем миокарде ЛВ может усиливаться. В таком случае оценивали характеристики самих СПД (ДПД50%, ДПД90%, dV/dt_{max}), 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 значение максимального диастолического потенциала (МДП).

Потенциал покоя в миокарде легочных вен не является стабильным и его уровень в покоем ткани значительно отличается от ПП, наблюдаемого при электрической стимуляции и ритмическом возбуждении. Иными словами, уровень ПП в миокардиальной обкладке легочных вен зависит от функционального состояния ткани. Самопроизвольное изменение значения ПП в легочных венах, возникающее после прекращения ритмической стимуляции/возбуждения при переходе миокарда в «покоем» состояние, называли или «спонтанным сдвигом ПП» или «спонтанной деполяризацией ПП». В покоем миокардиальной ткани легочных вен измеряли не только значение ПП, но и величину «спонтанного сдвига», а также изменение ПП при экспериментальных воздействиях. Спонтанный сдвиг ПП наблюдали в ЛВ мышей, крыс, морских свинок и кроликов.

Как и длительность ПД, уровень потенциала покоя в покоем миокарде легочных вен различен в проксимальном и дистальном участке вены. Для снижения разброса значений, обусловленных локальными электрофизиологическими свойствами ткани, регистрацию потенциала покоя производили 1-2 мм проксимальнее области первой бифуркации легочной вены (если не указано иное для конкретной серии экспериментов). В серии контрольных экспериментов ($n > 5$) установлено, что в покоем ЛВ крыс, кроликов и морских свинок после прекращения электрической стимуляции и спонтанного сдвига ПП, потенциал покоя остается на постоянном (деполяризованном) уровне по крайней мере в течение 3 ч.

В некоторых экспериментах оценивали длительность функционального рефрактерного периода (ФРП) в левом предсердии и миокарде легочных вен. ФРП определяли, уменьшая интервалы между последовательными возбуждающими стимулами (S1S1) до такого интервала, когда ПД прекращали возникать в ответ на каждый из

следующих друг за другом стимулов. Наиболее короткий межстимуляционный интервал, при котором сохранялся ответ на каждый последовательный стимул, считали длительностью ФРП (мс). Амплитуда всех стимулов всегда равнялась двум порогам раздражения.

3.4.4. Экспериментальные протоколы

Значимые детали экспериментальных протоколов, периоды и концентрации действующих фармакологических соединений или параметры электрической стимуляции ткани приведены при описании результатов для каждой серии экспериментов. Общим этапом для всех серий экспериментов была адаптация тканевых препаратов в перфузионной камере в течение 30 - 60 мин. В течение всего периода адаптации изолированные препараты работали в навязанном ритме (3,3-5 Гц). При тестировании способности генерировать залпы СПД в ответ на действие фармакологических субстанций эксперимент начинали не ранее чем через 5 мин после прекращения электрической стимуляции, т.е. после окончания спонтанного сдвига ПП и его стабилизации на новом уровне. В тех случаях, когда длительность эксперимента превышала 1 ч, каждый час возобновляли электрическую стимуляцию ЛВ на 5 мин для тестирования жизнеспособности ткани.

При работе с тканевыми препаратами легочных вен эксперимент проводили только в том случае, если к окончанию периода адаптации электрически вызванные ПД, регистрируемые при отведении с «внутренней» поверхности препарата (т.е. с «эндокардиальной» поверхности, поверхности обращенной к просвету сосуда) демонстрировали амплитуду не менее 90 мВ, овершут >5 мВ, скорость нарастания фронта ПД $dV/dt > 150$ мВ. Вышеуказанные значения параметров позволяют исключить возможность регистрации электрической активности от немиокардиальных элементов стенки легочной вены (фибробластов, гладкомышечных клеток, эндотелия).

3.5. Картирование хронотопографии возбуждения в миокарде легочных вен

3.5.1. Принцип метода «оптического» картирования электрической активности и соотношение оптических и электрических сигналов

Метод картирования электрической активности основан на применении потенциометрических (или потенциалчувствительных) флюоресцирующих зондов («красителей»), которые впервые были разработаны и применены в 1980-х годах. Как следует из названия, потенциометрические зонды после поглощения возбуждающего излучения и перехода в возбужденное состояние высвечивают поглощенную энергию в длинноволновой области спектра (Рис.3.4.а). Однако, специфическим свойством всех потенциометрических зондов является зависимость характеристик флюоресценции от заряда (потенциала) липидного бислоя, в котором они растворены (Рис.3.4.б). Как правило, потенциометрические зонды имеют одну или несколько углеводородных цепочек («якоря»), которые придают им амфифильные свойства, и способствуют их удержанию в липидных слоях и мембранах клеток. Хромофор потенциометрической молекулы связан с углеводородным «якорем» посредством моста и, тогда, когда краситель находится в липидном слое (т.е. интеркалирован между липидами мембраны), ориентирован перпендикулярно поверхности мембраны (Рис.3.4.в).

Потенциалзависимость флюоресценции зонда основана на следующем феномене: электрическое поле в мембране, создаваемое трансмембранной разницей в потенциалах, определенным образом распределяет заряд (т.е. электронную плотность) в возбужденной молекуле, поскольку хромофор зонда ориентирован «перпендикулярно» поверхности мембраны (и не параллелен линиям напряженности электрического поля). Изменение трансмембранного потенциала приводит к изменению распределения заряда и, соответственно, изменению спектральных свойств молекулы – в частности, сдвигу спектра флюоресценции. Благодаря сдвигу спектра флюоресценции интегральная эмиссия, регистрируемая в длинноволновой части спектра, пропорциональна трансмембранному потенциалу. Например, для di-4-ANEPPS изменение интегральной эмиссии при сдвиге мембранного потенциала на 100 мВ составляет $10 \pm 5\%$ (зависит от типа белково-липидной среды), хотя для разных диапазонов спектра эмиссии изменение интенсивности флюоресценции может варьировать от 0 до 60% (Рис.3.5.а). Кроме того, положение спектра поглощения некоторых потенциалчувствительных зондов зависит от значения трансмембранного потенциала (МП), что делает (в определенных условиях) возможным измерение абсолютного значения МП по интенсивности флюоресценции.

Поскольку времена релаксации молекул при изменении трансмембранного потенциала очень малы (нано- или микросекунды), то и сдвиг спектра флюоресценции

происходит крайне быстро. В ходе фаз деполяризации (и реполяризации) потенциала действия (ПД) суммарная эмиссия в длинноволновой части спектра флюоресценции зонда снижается (и восстанавливается) также быстро как развивается деполяризация и реполяризация (Рис.3.5.б). В результате оптический сигнал оказывается инвертирован, но пропорционален ПД по временным характеристикам. Благодаря свойствам потенциометрических зондов оказывается возможным регистрировать такие быстрые электрофизиологические процессы как фаза деполяризации потенциала действия и распространение волны возбуждения в нейрональной или миокардиальной ткани.

В настоящее время известно несколько групп потенциометрических красителей: (1) соединения группы АНЕП (ANEP), (2) фторированные производные соединений группы АРЕП, (3) эфиры тетраметилродамина (TMR), (4) соединения группы ANNINE (Рис.3.5.в).

В электрофизиологии уже более четверти века используют цвиттер-ионные красители семейства АНЕП (Амино-Нафтил-Етенил (винил) Пиридиный) для которых характерно «быстрое» (микросекунды) изменение спектральных свойств в ответ на сдвиг мембранного потенциала. К семейству АНЕП относятся такие красители как di-2-ANEPEQ, di-3-ANEPPDHQ, di-4-ANEPPS, di-8-ANEPPS, и прочие, где приставки di-2/di-3/di-4 характеризуют длину углеводородного «якоря». Распространенность зондов семейства АНЕП в физиологических исследованиях обусловлена их приемлемой растворимостью в водных средах, сочетающейся с высокой диффузионной способностью (при использовании тканей), хорошей способностью накапливаться и долгое время удерживаться в биологических мембранах, высокой чувствительностью к изменению трансмембранного потенциала, подходящими спектральными свойствами. В данной работе в качестве потенциалчувствительного зонда использован зонд di-4-ANEPPS. Максимум спектра поглощения этой молекулы, встроенной в липидный бислои, соответствует 470 нм, а эмиссии - 620 нм (хотя в некоторых экспериментальных условиях диапазон оптимальных длин волн возбуждающего света может лежать в области 510-530 нм).

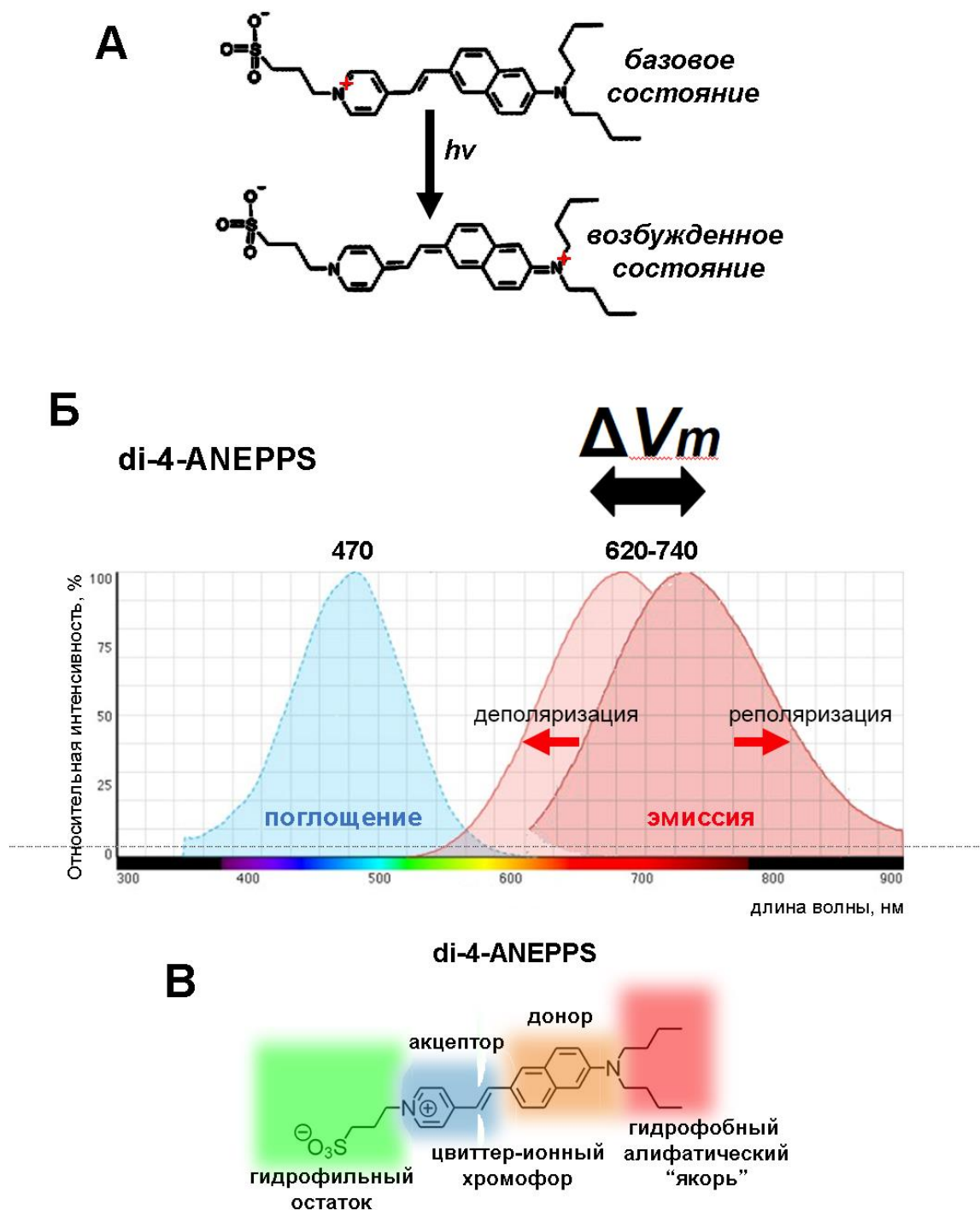


Рис. 3.4. Спектральные свойства потенциметрических зондов, используемых при оптическом картировании биоэлектрической активности, на примере зонда семейства АНЕП (АНЕР). **А.** Потенциметрический зонд di-4-ANEPPS в базальном и возбужденном состоянии. **Б.** Соотношение спектров поглощения и эмиссии, а также потенциалзависимость спектра эмиссии di-4-ANEPPS. **В.** Ключевые мотивы молекулы потенциметрического зонда di-4-ANEPPS. Гидрофобный алифатический «хвост» способствует интеркаляции зонда между липидами мембраны; цвиттер-ионный хромофор обеспечивает флуоресцентные свойства; гидрофильный остаток способствует растворимости молекул в водной среде.

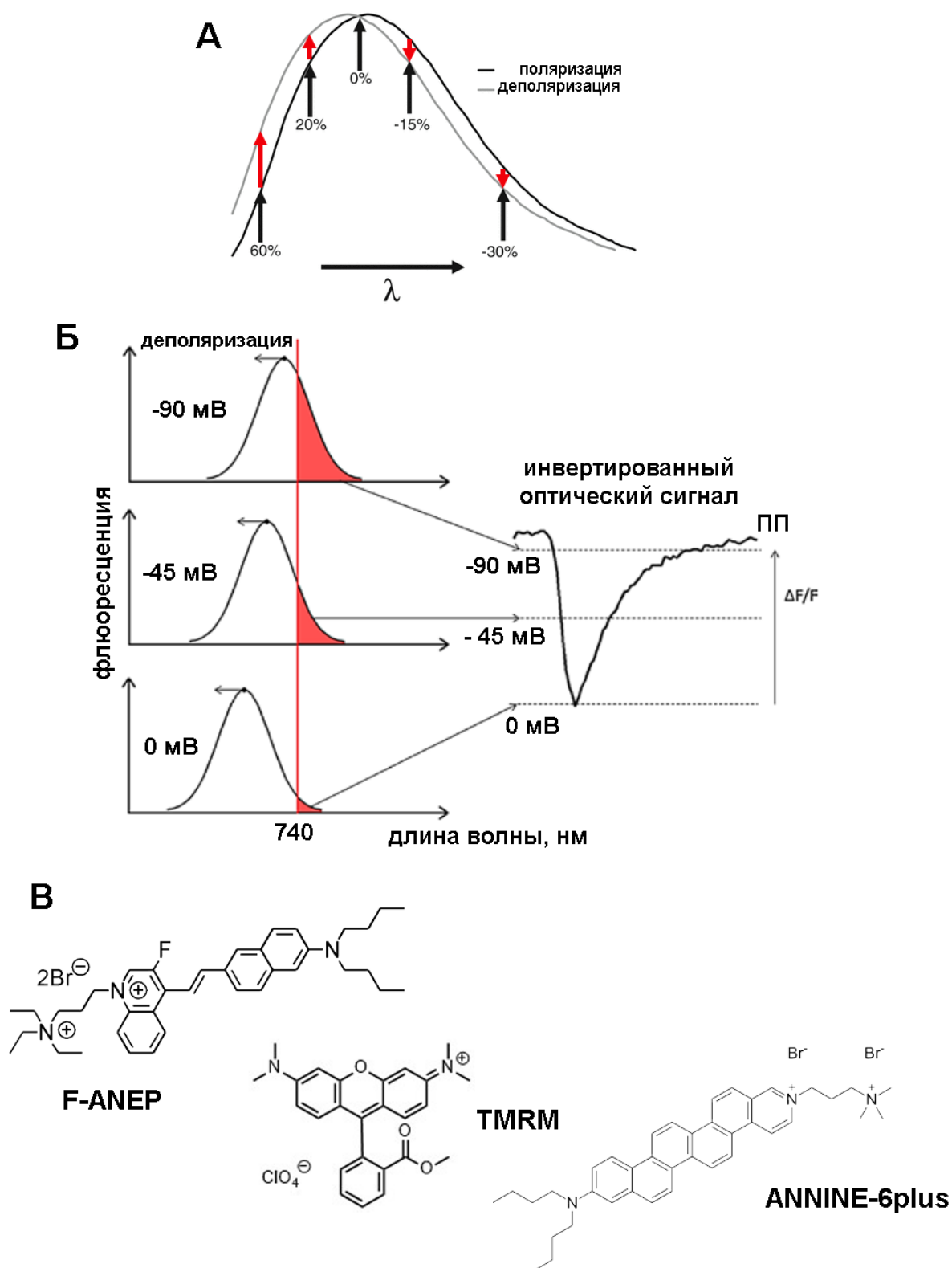


Рис. 3.5. Формирование оптических сигналов при потенциалзависимом сдвиге спектра флюоресценции потенциометрических зондов. **А.** Изменение интенсивности флюоресценции в разных областях спектра эмиссии di-4-ANEPPS при его потенциалзависимом сдвиге. **Б.** Формирование инвертированного оптического сигнала пропорционального потенциалу действия при регистрации флюоресценции di-4-ANEPPS в диапазоне от 740 до 800 нм. ПП – потенциал покоя. **В.** Примеры структур потенциометрических зондов разных групп.

3.5.2. Экспериментальная установка для оптического картирования

Флюоресцентные сигналы 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 флюоресцентных 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 флюоресценции 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 (Рис.3.6).

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 камены 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 флюоресценцию 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.3.6. а-б).

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 KC14 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.

Сигналы от всех фотодиодов матрицы, поступали на АЦП, регистрировали и обрабатывали с помощью программы Cardioplex (RedShirtImaging, США), а также программы анализа собственной разработки.

3.5.3. Подготовка образцов для картирования биоэлектрической активности в препаратах легочных вен и левого предсердия

Тканевые препараты легочных вен и левого предсердия мышей, крыс, морских свинок, кроликов получали также, как описано в предыдущих разделах. После диссекции препараты помещали в экспериментальную камеру и перфузировали раствором Тироде, соответствующего состава (см. раздел 3.3).

Как указано выше, для регистрации оптических сигналов в данной работе использовали потенциометрический зонд di-4-ANEPPS (Sigma-Aldrich, США), поскольку данный краситель хорошо проникает и удерживается в мембранах кардиомиоцитов тканевых препаратов (Рис.3.6).

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). После насыщения ткани красителем проводили эксперименты.

Следует указать, что насыщаемость миокардиальной ткани красителем и эффективность флюоресценции различных животных значительно различается. Этот феномен обусловлен разным липидным составом мембран. Кроме того, способность di-4-ANEPPS удерживаться в мембране миокардиальных клеток разных животных сильно различается. С наибольшей скоростью происходит удаление di-4-ANEPPS в цитоплазматические компартменты из мембран клеток мышей. В связи с вышесказанным в ряде экспериментов концентрацию di-4-ANEPPS увеличивали до 50 мкМ, либо осуществляли повторное насыщение.

Миокардиальные препараты обладают сократительной активностью, которая, обычно, следует за потенциалами действия. Поэтому, механические артефакты искажают оптические потенциалы действия в экспериментальных условиях. Эффект искажения выражен в разных тканевых препаратах в разной степени (Рис.3.6.Д) и, в наибольшей степени затрагивает фазу реполяризации ПД (Рис.3.7). 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).

Как указано выше длительность оптических сигналов (или оптических ПД) пропорциональна, но не равна длительности потенциалов действия (Рис.3.7). Для миокарда устьев легочных вен характерна большая длительность ПД чем для ушка левого предсердия. Однако, оптические сигналы в препаратах легочных вен, обработанных блеббистатином, оказываются короче, чем оптические ПД регистрируемые от предсердного миокарда (Рис.3.8). Такой эффект обусловлен взаимодействием нескольких факторов, включая разницу в массе (толщине слоя) миокарда, генерирующего флюоресценцию, разницу в количестве соединительной ткани и иных слоев, поглощающих и рассеивающих флюоресценцию, а также разницу в липидном составе мембран, влияющих на потенциалзависимый сдвиг спектра флюоресценции di-4-ANEPPS и его квантовую эффективность. Поэтому, в данной работе не оценивали длительности ПД (за исключением экспериментов с легочными венами мышей) и длину волны возбуждения на основе данных оптического картирования.

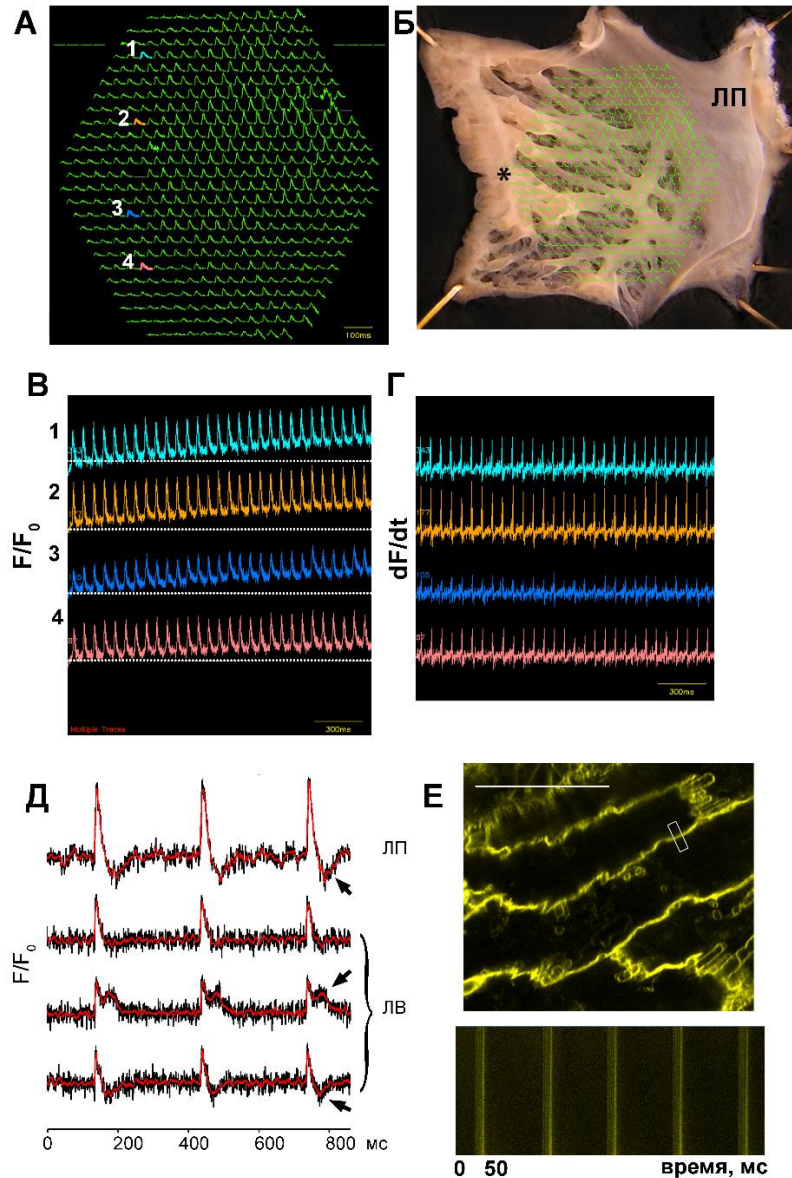


Рис.3.6. оптические сигналы (оптические ПД), регистрируемые в миокардиальной ткани с помощью гексагональной фотодиодной матрицы при использовании di-4-ANEPPS. **А.** Репрезентативные (инвертированные) оптические сигналы, регистрируемые каждым фотодиодом матрицы за 50 мс. **Б.** Область миокарда левого предсердия, в которой зарегистрированы оптические сигналы, показанные на А. **В.** Инвертированные 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 флуоресценция. **Е.** Накопление di-4-ANEPPS в мембранах кардиомиоцитов (*сверху*), а также инвертированные оптические сигналы от участка мембраны отдельного кардиомиоцита, реконструированные по суммарной флуоресценции в диапазоне 640-740 нм (*снизу*, значение мембранного потенциала пропорционально яркости псевдоцвета).

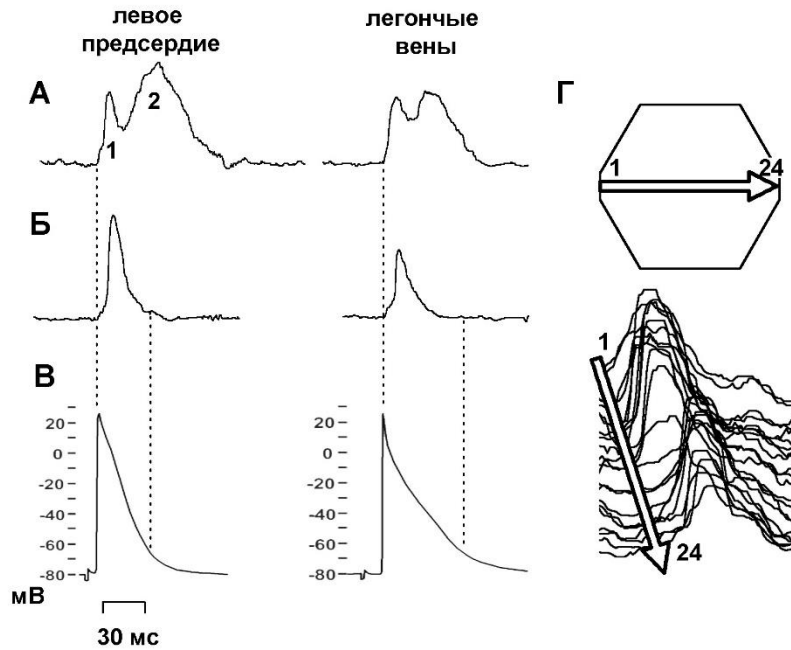


Рис.3.7. Соотношение конфигурации оптических сигналов - «оптических потенциалов действия», зарегистрированных с помощью микроэлектродной техники в предсердном миокарде и миокардиальной ткани легочной вены крысы. **А.** Оптические сигналы, получаемые в экспериментах без использования разобщителя механоэлектрического сопряжения, 1- потенциал действия, 2- артефакт, возникающий в результате сокращения и сдвига картируемого участка ткани относительно оптической регистрирующей системы. **Б.** Оптические сигналы, регистрируемые через 20 мин после начала обработки миокардиальных препаратов «разобщителем» электромеханического сопряжения BDM (1 г/л). **В.** Потенциалы действия, полученные с помощью микроэлектродной техники в тех же тканевых препаратах, в которых регистрировали оптические ПД. Пунктиром ограничена длительность потенциалов действия на уровне 90% реполяризации (ДПД90%). **Г.** Октагональная фотодиодная матрица и номера фотодиодов (1-24) в одном ряду матрицы (*сверху*). Внизу: соотношение моментов возникновения оптических сигналов (оптических ПД), регистрируемых фотодиодами матрицы с номерами 1 -24. Стрелкой указано направление распространения возбуждения в данном эксперименте.

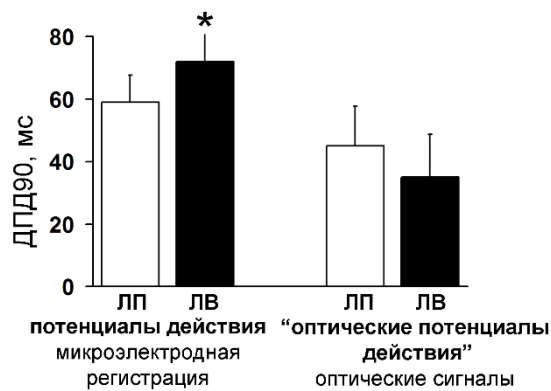


Рис.3.8. Соотношение длительности оптических ПД и потенциалов действия, зарегистрированных с помощью микроэлектродов в разных участках миокарда. ЛП - левое предсердие, ЛВ - легочные вены. ДПД90 – длительность на уровне 90% реполяризации. * - $p(T) < 0,05$ ($n > 10$).

3.5.4 Анализ данных оптического картирования

В результате инвертирования сигналов и прослеживания изменения уровня флюоресценции во времени по каждому фотодиоду матрицы получали оптические сигналы, соответствующие потенциалам действия (оптические ПД). Оптические сигналы подвергали следующей обработке.

Для удаления сдвига базовой линии, обусловленного фотоиндуцированным изменением электрических характеристик фотодиодов, проводили «детрендинг» используя метод линейной аппроксимации.

Далее применяли кластерный метод k -средних, позволяющий отделить фон в картируемой области, от области, занятой миокардиальной тканью и являющейся источником оптических сигналов (зоны интереса).

После удаления фона и выделения зоны интереса 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 использовали два подхода. В первом подходе 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 том случае, когда вышеуказанный подход давал неудовлетворительные результаты, использовали более сложный метод (разработан Ушениным К.С.): нормализованные оптические сигналы подвергали преобразованию Гилберта, в результате чего получали фазовые сигналы с величинами в диапазоне $\{-\pi, \pi\}$. Момент активации в каждом канале определяли как момент смены фазы (Рис.3.9).

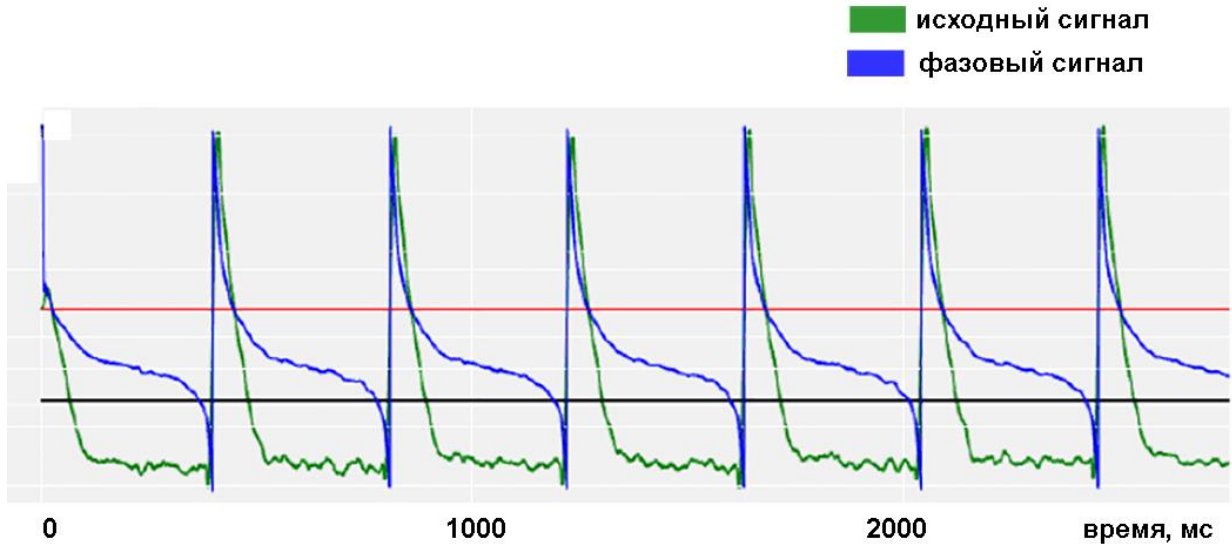


Рис.3.9. Примеры фазово преобразованных оптических сигналов.

В части экспериментов помимо изохронных карт активации строили карты длительности оптических ПД (в экспериментах с ЛВ мышей, так как механические артефакты не препятствовали определению моментов окончания реполяризации в данном типе препаратов) и векторные карты скорости проведения возбуждения (Рис.3.10).

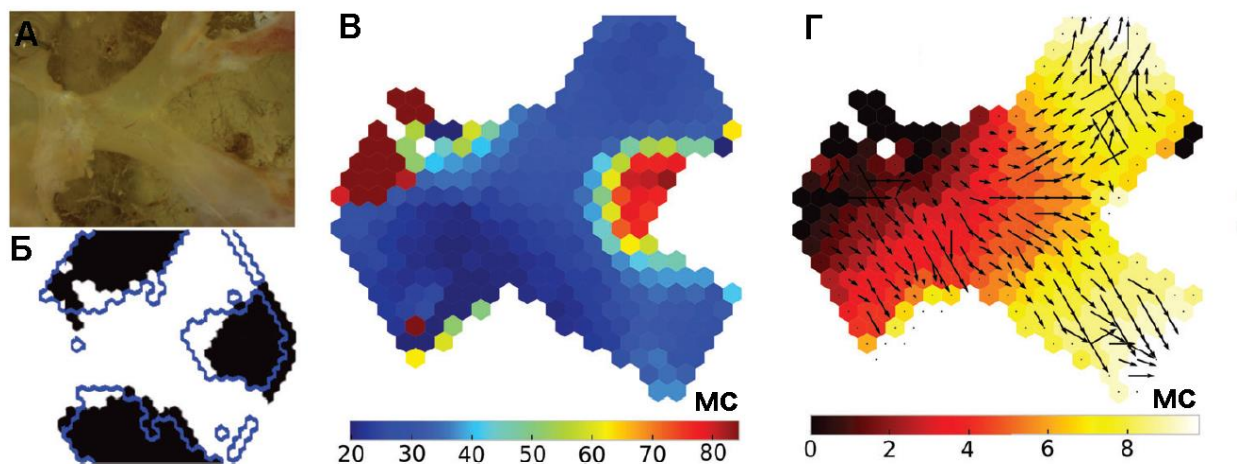


Рис.3.10. Анализ данных оптического картирования. А. Вид тканевого препарата легочных вен. Б. Результат работы алгоритма выделения фоновой области и зоны интереса. В, Репрезентативный пример карты длительности оптических ПД. Г. Изохронная карта активации и векторное поле скоростей проведения возбуждения.

Для построения карт длительности ПД использовали значения ДПД₉₀. Для построения векторного поля скорости проведения рассчитывали градиенты в картах активации, используя дискретный градиентный оператор вида:

$$S_{ij}/dx = \left(0 \quad -\frac{1}{6} \quad \frac{1}{6} \quad \frac{1}{3} \quad \frac{1}{6} \quad -\frac{1}{6} \quad -\frac{1}{3}\right)^T \text{neighbor}(S_{ij})$$

$$S_{ij}/dy = \left(0 \quad \frac{\sqrt{3}}{6} \quad \frac{\sqrt{3}}{6} \quad 0 \quad -\frac{\sqrt{3}}{6} \quad -\frac{\sqrt{3}}{6} \quad 0\right)^T \text{neighbor}(S_{ij})$$

При построении изохронных карт активации определяли наличие либо отсутствие частичных и полных блоков проведения, степень искривления фронта волны возбуждения.

В тех случаях, когда векторные карты скорости возбуждения построить было невозможно, определяли следующие параметры, используя изохронные карты активации: время активации ($t_{\text{акт}}$), максимальная (θ_m) и «расчетная» (θ_r) скорость проведения возбуждения. $t_{\text{акт}}$ определяли как время охвата возбуждением картируемой области препаратов предсердия или легочных вен. «Расчетная скорость» - отношение длины картируемой области к времени активации ($\theta_r, \text{см/с} = (5 \text{ мм}/t_{\text{акт}}, \text{мс}) * 100$). Следует отметить, что θ_r и $t_{\text{акт}}$ представляют собой макроскопические параметры, в большей степени отражающие среднее значение скорости проведения в ткани, а не локальное его значение. Максимальную скорость проведения θ_m рассчитывали как наибольшее расстояние между изохронами, отнесенное к времени между изохронами ($\theta_m = R, \text{мм}/0.61 \text{ мс}$).

Коэффициент неоднородности k рассчитывали как отношение θ_m/θ_r . Этот параметр позволяет в первом приближении оценить разброс значений скорости (или «анизотропию» по скорости) проведения возбуждения.

Длину волны возбуждения рассчитывали как произведение функционального рефрактерного периода (ФРП) и скорости проведения: $\lambda_r, \text{см} = \text{ФРП} * \theta_r$ и $\lambda_m, \text{см} = \text{ФРП} * \theta_m$.

3.6. Расчёт константы длины в миокардиальной ткани

Расчёт константы длины – величины, характеризующей пассивные электрические свойства ткани, проводили по методу предложенному М.Б. Беркенбитом и Л.М. Чайлахяном [9, 10]. Вышеуказанный метод позволяет оценить константу длины в ходе стандартного эксперимента на основе внутриклеточных отведений ПД и данных о скорости проведения возбуждения. Потенциал действия рассматривается как перемещающийся в ткани источник тока, впереди которого происходит пассивный электротонический сдвиг мембранного потенциала. При расчете постоянной длины используют упрощение, согласно которому миокардиальную ткань принимают за систему однородных линейных волокон. Также не учитывают емкостные свойства мембраны и значение константы времени (т.к. в синцитиальных структурах её оценка крайне затруднена). В таком случае постоянная длины определяется уравнением:

$$\lambda = \theta * t_k,$$

где λ – константа длины, θ – скорость проведения возбуждения (м/с), t_k – константа скорости пассивного изменения потенциала в точке регистрации.

Скорость проведения возбуждения θ в предсердии и легочных венах оценивали в экспериментах с оптическим картированием. t_k определяли исходя из скорости нарастания «допороговой» фазы распространяющегося ПД (**Рис.3.11**). t_k принимали равным времени (в с), в течение которого приращение значения потенциала (в ходе «допороговой» фазы) составляло e раз. Допороговую фазу ПД при этом определяли как интервал времени от момента начала изменения ПП до момента времени, когда вторая производная dV^2/d^2t приобретает максимальное значение.

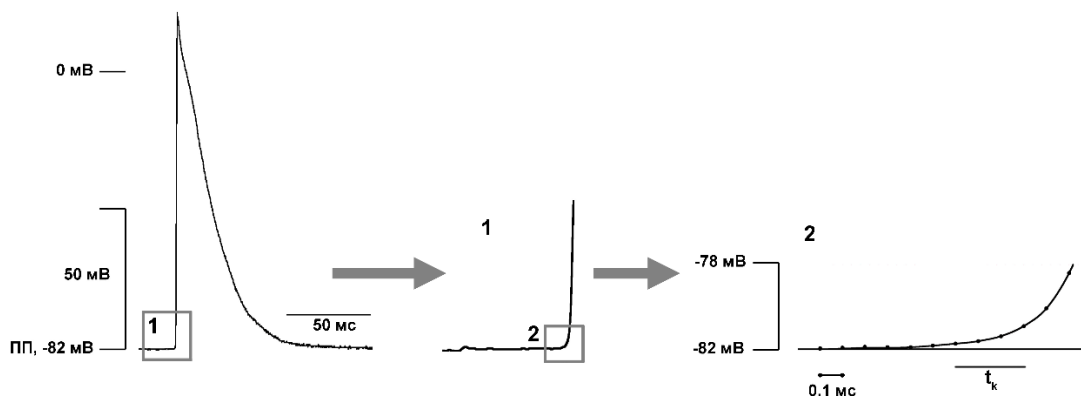


Рис.3.11. Способ определения постоянной длины. Слева – репрезентативный потенциал действия левого предсердия крысы. 1- момент перехода от потенциала покоя к фронту потенциала действия 2 – тоже, что и 1, но показано с большой разверткой по времени, что позволяет выделить пассивную фазу деполяризации. Допороговая фаза потенциала действия имеет экспоненциальный характер, что отражает пассивный сдвиг потенциала в ткани.

3.7. Иммунофлюоресцентный анализ экспрессии белков в миокарде легочных вен

3.7.1. Получение тканевых образцов и приготовление парафиновых блоков

Для иммунофлюоресцентного выявления десмина и белков щелевых контактов (Сх40, Сх43, Сх45) 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 и были выделены в соответствии с протоколом, описанным ранее в разделе 3.2. 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 (рН=7.2) в течение 24 часов при комнатной температуре. Затем образцы обезвоживали с помощью стандартного протокола проводки материала и заливали в парафин.

3.7.2. Иммунофлюоресцентное окрашивание

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

Подготовку срезов для окрашивания проводили по следующему протоколу: предметные стекла с парафиновыми срезами разогревали в термостате ($+60^{\circ}\text{C}$) в течение 30 минут (с целью расплавления парафина); депарафинизировали срезы в двух сменах 100% ксилола (по 10 минут); регидратировали в серии спиртов (этанол) убывающей концентрации (100%, 70%, 50%) по 5 минут в каждом; промывали в дистиллированной воде в течение 2 минут; инкубировали стекла со срезами в буфере (рН=9, ПраймБиоМед, Россия) в течение 10 мин при температуре 110°C для демаскировки антигенов. Срезы промывали в растворе PBS в течение 20 мин и дистиллированной водой (2 раза). Для ингибирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали в 3% перекиси водорода в течение 5-10 минут.

Далее, для блокировки неспецифических 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. 3.2). После инкубации с антителами срезы промывали в PBS-Т буфере в течение 2 минут (3 раза). Проводили инкубацию со вторичными антителами (Табл. 3.3), растворенными в PBS-Т (Jackson ImmunoResearch, США) и ядерным красителем DAPI (1:2000, Sigma-Aldrich, #D9542) в течение 1 или 2 часов. Промывали срезы в PBS-Т буфере в течение 2 минут (4 раза) и в дистиллированной воде 5 мин (для предотвращения образования кристаллов солей). В отдельных случаях проводили окраску ядер по Хегсту.

На последнем этапе монтировали препараты под покровное стекло в среду на водной основе для флюоресцентных препаратов (Dako (Agilent), США) либо в среду Vectashield Antifade Mounting Medium H-1000-10 (Vector Laboratories, США). Окрашенные срезы хранили в темноте при +4С.

Для двойного иммунофлюоресцентного исследования использовали два типа первичных антител (антитела получены в двух разных видах животных - мышь, кролик) в сочетании с двумя типами вторичных козьих антител («анти-мышь», «анти-кролик»), конъюгированных с флюорофорами Alexa Fluor 488 (максимум абсорбции/эмиссии - 488/519 нм) и Cy3 (максимум абсорбции/эмиссии – 550/570 нм).

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

Таблица 3.2. Первичные антитела, использованные для иммуногистохимического окрашивания.

	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	РА5-79311
3	Anti-Connexin 40 Antibody, поликлональные,	кролик	человек, крыса, мышь	1:40	ThermoFisher Scientific	36-4900

	верифицированные на нокаутах					
4	Anti-desmin, моноклональные, клон GM007	мышь	человек, крыса	1:100	Primebiomed (Россия)	GM007

Таблица 3.3. Вторичные антитела, использованные для иммуногистохимического окрашивания.

	вторичное антитело, реактивность	конъюгат, максимум поглощения, нм	хозяин	разведение	производитель	кат. номер
1	«Анти-мышь»	Alexa Fluor, 488	коза	1:500	Thermo Fisher Scientific	A-11029
2	«Анти-кролик»	Cy3, 550	коза	1:1000	Jackson ImmunoResearch	111-165-008
3	«Анти-кролик»	Alexa Fluor, 488	коза	1:500	Thermo Fisher Scientific	A-11008

3.7.3. Получение конфокальных изображений и анализ распределения коннексинов в миокарде легочных вен

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 стекковые изображения (4 стека, разрешение каждого стека 2048×2048 пикселей, 8 бит/пиксель) в конфокальном режиме (диаметр точечной диафрагмы – 1 мкм, интервал между стекковыми 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.

3.8. Флюоресцентная микроскопия катехоламин-содержащих волокон в миокарде легочных вен

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, 7-, 14-, 21-дневных и взрослых животных (P1-P60). Для визуализации симпатических нервных волокон использовали метод гистохимического окрашивания при помощи глиоксиловой кислоты, которая является альдегид-содержащим соединением, относящимся к ряду карбоксиловых кислот, а в организме животных является предшественником глиоксилата и глицина, синтезируемого в пероксисомах. Данный метод основан на способности катехоламинов последовательно взаимодействовать с двумя молекулами глиоксиловой кислоты в результате чего образуется дициклическое производное хинолина (производное 2-карбоксиметил-3,4-дигидроизохинолина, Рис.3.12) (Axelsson et al., 1972; De la Torre, 1980). Это соединение является интенсивно флюоресцирующим, максимум спектра поглощения приходится на 360 нм (при длине волны возбуждающего света 405 нм абсорбция составляет 70% от пикового значения), а максимум спектра эмиссии приходится на 480 нм.

Данный метод также применяли для оценки симпатической иннервации легочных вен у различных линий мышей.

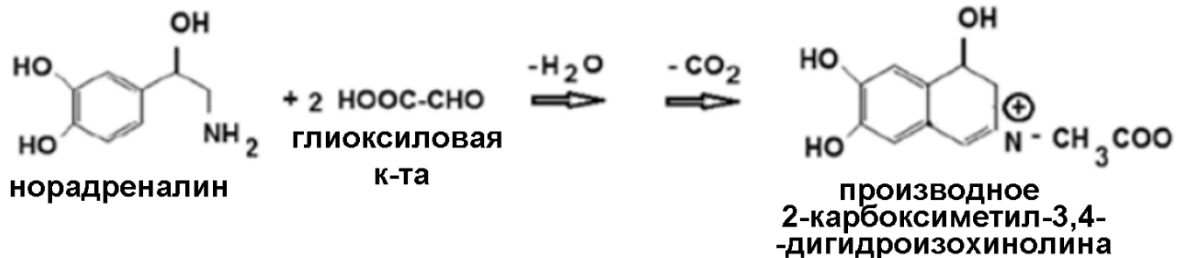


Рис.3.12. Образование флюоресцентного гетероциклического соединения при взаимодействии глиоксиловой кислоты с норадrenalином.

3.8.1. Приготовление и окрашивание тканевых образцов легочных вен

Венозно-легочные препараты крыс, мышей получали по методике, описанной в разделе 3.2. Затем тканевой препарат помещали в препаровальную ванночку, разрезали легочные вены вдоль продольной оси и промывали раствором Тироде. Далее препараты в течение 30 минут инкубировали в фосфатно-солевом растворе (NaCl 0,09 М; Na₂HPO₄×H₂O 0,01M) с добавлением глиоксиловой кислоты (2%), сахарозы (10%), pH доводили до 7,4 1 М р-ром NaOH. Затем препарат расправляли на предметном стекле «эндокардиальной» стороной вверх, сушили в течение 30 мин под струей теплого воздуха

(45С), а затем подвергали термофиксации в сушильном шкафу при температуре 100°С в течение 5 минут. Поскольку аддукты биогенных аминов и глиоксиловой кислоты деградируют при абсорбции атмосферной воды термофиксированные препараты заливали вазелиновым маслом, накрывали покровным стеклом. Все препараты были подготовлены в сходных условиях, а их анализ проводили спустя одинаковое время после изготовления.

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

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

Анализ распределения катехоламин-позитивных волокон в стековых изображениях осуществляли в программе ImageJ (ImageJ 1.50i) используя плагин Bio-Formats Explorer ImageJ. (imagej.net/Bio-Formats). После вычитания фона методом скользящего параболоидного усреднения осуществляли извлечение точек максимальной флюоресценции в каждом стеке и объединение стеков в однослойную картину. Для усиления контраста в репрезентативных изображениях в программе ImageJ проводили деконволюцию (три итерации) используя плагин Diffraction PSF 3D и Interactive deconvolve 3D (imagej.net/Bio-Formats).

Для дальнейшего количественного анализа проводили бинаризацию изображения. Используя стандартные процедуры ImageJ, рассчитывали процентное отношение общего количества флюоресцентных пикселей в бинарном изображении (**Рис. 3.13.А**) к общей площади препарата. Полученные значения рассматривали как показатель количества катехоламин-содержащих волокон в ткани легочных вен (или левого предсердия).

Для оценки протяженности катехоламин-позитивных волокон проводили «скелетонизацию» изображений, используя процедуру imagej.net/Skeletonize. На основе полученной карты волокон (**Рис. 3.13.Б**), рассчитывали их длину по отношению к общей площади изображения. Данный показатель считали пропорциональным плотности

симпатических нервных волокон в миокардиальных препаратах (Sathyanesan et al. 2012).

Все образцы были обработаны одинаковым способом.

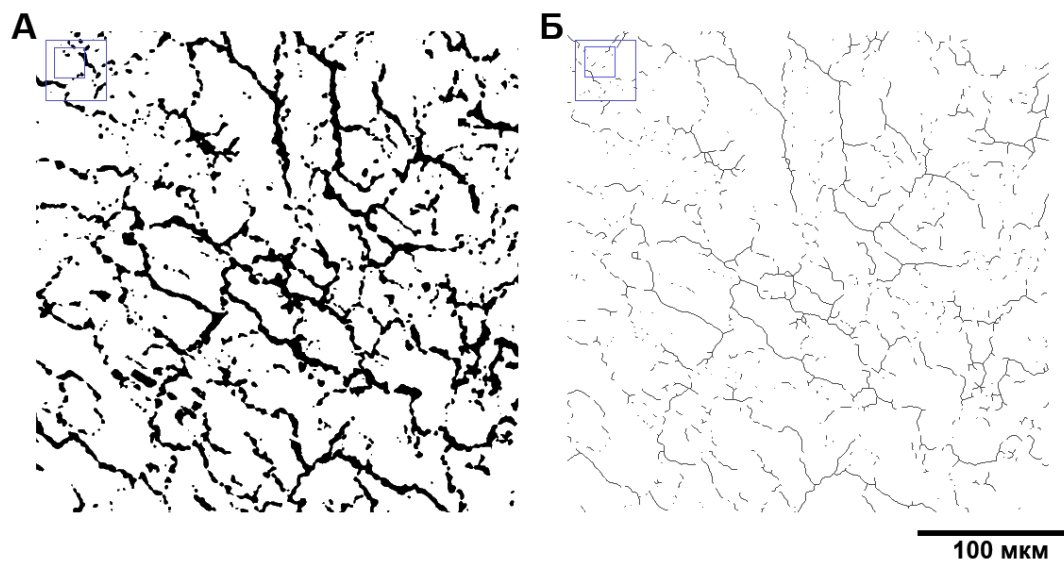


Рис.3.13 Примеры изображений катехоламин-положительных волокон в препаратах ЛВ взрослых крыс в процессе обработки в программе ImageJ. А – бинарное изображение, Б – изображение после процесса «скелетонизации».

3.9. Оценка уровня экспрессии транскриптов Nkx2-5 методом РВ-ПЦР

Для количественной оценки уровня экспрессии гена транскрипционного фактора Nkx2-5 миокардиальной ткани легочных вен неонатальных и взрослых крыс использовали метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (РВ-ПЦР).

3.9.1. Выделение РНК предсердного миокарда и миокарда легочных вен

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 из образцов тканей тотальную РНК. Молекулы РНК легко могут подвергнуться деградации вследствие загрязнения РНКазами. Чтобы избежать этого, все работы по выделению РНК выполнялись в соответствии с правилами проведения молекулярно-биологического эксперимента. В работе использовался свободный от РНКаз пластик, а также обработанная ингибитором РНКаз диэтилпиракарбонатом (ДЭПК) вода.

Согласно протоколу, образцы сутки выдерживали в холодильной камере при температуре 4°C. Перед выделением РНК образцы нагревали до комнатной температуры, затем переносили в пробирки, содержащие 300 мкл реагента ExtractRNA (Евроген, Россия, # BC032, фенол+гуанидин-изотиоцианат). Кусочки тканей гомогенизировали стерильным пестиком для пробирок (Axugen, USA, # PES-15-B-SI), после чего смывали остаточную ткань с пестика и стенок пробирки, добавляя 700 мкл реагента ExtractRNA. Затем гомогенат инкубировали в течение 15 минут в растворе при комнатной температуре для завершения клеточного лизиса и более полного выделения тотальной РНК. Далее образцы центрифугировали при 12000g при комнатной температуре в течение 10 минут с целью осаждения клеточного дэбриса. После центрифугирования из пробирок отбирали супернатант, к которому добавляли хлороформ в количестве 200 мкл, после чего пробирки встряхивали с высокой интенсивностью на протяжении 15 секунд. После этого пробирки с супернатантом выдерживали в течение 5 минут при комнатной температуре, при периодическом помешивании. После инкубации образцы вновь центрифугировали при 20000g, температуре 4°C в течение 15 минут. Супернатант с растворенной РНК отбирали в чистые пробирки, добавляли равный объем изопропанола для осаждения РНК и инкубировали 10 минут. После инкубации пробирки с образцами центрифугировали при 20000g на протяжении 20 минут при температуре 20°C. Затем из пробирок удаляли супернатант. В пробирки с осадком добавляли 1 мл 75% этанола, чтобы отмыть

осажденную РНК. После этого проводили итоговое центрифугирование раствора при 20000g, температуре 20°C, 10 минут. Из пробирок тщательно отбирали супернатант, а полученный осадок высушивали на воздухе в течение ~5 минут. Высушенный осадок РНК растворяли в 50 мкл воды с добавлением ДЭПК.

3.9.2. Обработка ДНКазой I, проверка качества выделения РНК

Раствор, полученный после экстракции РНК, обрабатывали ДНКазой I. Это необходимо для деградации геномной ДНК, остающейся в растворе. Полученный на предыдущем этапе раствор тотальной РНК (50 мкл) смешивали с 6,1 мкл 10-кратного реакционного буфера и добавляли 5 мкл раствора ДНКазы I (2000 е.а./мл, NEB, USA, # M0303S) и оставляли для инкубации в течение часа при температуре 37°C. По истечении этого времени раствор очищали от ДНКазы, добавляя смесь фенола и хлороформа в пропорции 1:1 (90 мкл воды и 150 мкл раствора фенола и хлороформа, pH=5,2) и экстрагируя таким образом РНК. После энергичного встряхивания пробирки со смесью центрифугировали на 20000 g, 20°C, 10 минут. Осаждали РНК из раствора по вышеописанной методике. Количество и качество осажденной РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA), абсорбцию измеряли при длине волны 260 нм, (260/280 нм).

Проводили электрофорез в 1% агарозном геле с целью выяснения целостности полученной РНК. Гель готовили на ТАЕ буфере (40 mM Трис, (pH=8,0), 40 mM ацетат натрия, 1mM ЭДТА), также добавляли флюоресцентный интеркалирующий краситель бромистый этидий в концентрации 0.5 мкг/мл (AppliChem, #1152,0025). К образцам РНК добавляли равный объем 2-кратного буфера для нанесения проб (95% формамида, 0,025% SDS, 0,025% бромфенолового синего, 0,025% ксиленцианола, 0,025% бромистого этидия, 0,5 mM EDTA), затем образцы нагревали 10 минут при 70°C, после чего быстро переносили на лед и охлаждали в течение трех минут. Электрофорез проводили в ТАЕ-буфере при напряжении 8-10 В/см. После завершения электрофореза гель с РНК визуализировали в ультрафиолетовом свете с длиной волны 312 нм.

3.9.3. Обратная транскрипция

После обработки ДНКазой I на РНК-матрице синтезировали библиотеку комплементарной ДНК (кДНК) с помощью вирусной обратной транскриптазы (MMLV ревертаза). Молекулы кДНК использовали для амплификации. Для получения точных результатов в работе использовались одинаковые количества РНК, для этого образцы брали в равных концентрациях.

Для обратной транскрипции использовали 500 нг РНК. Синтез первой цепи кДНК осуществлялся с помощью набора реагентов производства компании Евроген (#SK021, Россия). Реакционную смесь готовили в следующих соотношениях исходя из рекомендаций производителя: 2 мкл воды, 6 мкл РНК, 1 мкл смеси случайных декануклеотидных праймеров. В течение двух минут смесь инкубировали при 70°C до полного плавления вторичных структур РНК, затем для отжига праймеров ее помещали в лед на 2-3 минуты. Затем добавляли заранее приготовленную смесь следующего состава (на одну пробирку): 4 мкл 5-кратного буфера для реакции, 2 мкл DTT (дитиотретиола), 2 мкл смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов, 1 мкл воды, 1 мкл ингибитора РНКаз, 1 мкл MMLV ревертазы. Кроме того, готовили негативный контроль, в котором ревертазу заменяли на 1 мкл воды, обработанной ДЭПК (не содержащую РНКаз) для исключения загрязнения образцов геномной ДНК. После добавления всех компонентов, смесь инкубировали в течение 60 минут при температуре 42°C. По истечении этого времени реакцию останавливали, нагревая смесь до 70°C в течение 10 минут. Далее доводили суммарный объем смеси до 55 мкл и после этого разносили по аликвотам объемом 6,4 мкл для последующего хранения при -20°C.

3.9.4. Выделение геномной ДНК

Для построения калибровочных кривых проводили РВ-ПЦР четырех разведений геномной ДНК, выделенной из печени крысы. Образцы печени выделяли и замораживали в жидком азоте совместно с миокардиальными препаратами. Для выделения геномной ДНК из образцов использовали реагенты GeneJet Genomic DNA purification Kit (Thermo Scientific, USA, # K0722). Перед началом работы препараты печени размораживали при комнатной температуре, взвешивали 20 мг ткани и гомогенизировали ее с помощью пестика в 180 мкл Digestion Solution (рабочий раствор протеазы К), ресуспендировали гомогенат в полученной смеси, затем добавляли 20 мкл (400 мкг) протеазы К и тщательно перемешивали для деградации имеющихся в растворе белков. После проведения вышеуказанных манипуляций смесь оставляли на ночь в термостате при непрерывном перемешивании и температуре 56°C. После инкубации на следующий день в смесь добавляли 20 мкл раствора РНКазы А (содержание фермента в объеме – 200 мкг) и выдерживали при комнатной температуре 20 минут. Затем разрушали комплексы ДНК с белком, добавляя в раствор 200 мкл Lysis Solution, который интенсивно перемешивали в течение 15 секунд на вортексе, а затем добавляли 400 мкл 50% этанола. Далее сорбировали ДНК из смеси, перенося полученный раствор на спин-колонки (GeneJET Purification

Columns), которые центрифугировали при 8000g и 20°C в течение 1 минуты. Во время центрифугирования происходит сорбция ДНК на силиконовом фильтре колонки.

После сорбции промывали ДНК на фильтрах, для этого колонку помещали в чистую пробирку, заполненную 500 мкл Wash Buffer I и центрифугировали при условиях, указанных на предыдущем шаге. Затем добавляли 500 мкл Wash Buffer II и повторно центрифугировали при 20000g, 20°C, 3 минуты. Далее проводили элюцию ДНК с фильтров, для чего колонку помещали в эппендорф, заполненный 200 мкл Elution Buffer, инкубировали 2 минуты и центрифугировали на 8000g, 20°C в течение 1 минуты. Для повышения выхода ДНК последовательность действий повторили, добавив 100 мкл Elution Buffer. Содержание ДНК в пробах измеряли с помощью прибора Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, USA), после этого замораживали для дальнейшего хранения при -20°C.

3.9.5. Подбор праймеров

Праймеры для РВ-ПЦР подбирали при помощи программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, USA). При поиске праймеров предпочтительно выбирали те из них, которые находятся на стыке экзонов, это необходимо для обнаружения насцентных транскриптов, которые показывают интенсивность транскрипции искомого гена. Такие характеристики праймеров как 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 ниже. Синтез праймеров осуществлялся компанией Евроген, Россия. Оценивали эффективность праймеров – считали эффективностью приемлемой, если она находилась в диапазоне 95-105%.

Таблица. 3.4. 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	Tbp	<i>Tbp</i>	F: TAATCCCAAGCGGTTTGCTG; R: TTCTTCACTCTTGGTCCTGTG			
2	Nkx2-5	<i>Nkx2-5</i>	F: GGCGGATAAGAAAGAGCTGTGC	2.066	259	59.4
			R: АСАСТТGТАGCGGCGGTTCT	2.066	259	59.6

3.9.6. Проведение полимеразной цепной реакции

До начала полимеразной цепной реакции необходимо проведение оценки качества синтезированной на тотальной РНК библиотеки кДНК. В пробах не должна детектироваться геномная ДНК. С этой целью проводили ПЦР, матрицами в которой были полученные кДНК и отрицательные контроли. Если в ПЦР с отрицательным контролем не

накапливался продукт (или же накапливался в гораздо меньшем количестве по сравнению с количеством продукта в ПЦР с соответствующей библиотеки), то библиотека кДНК считалась пригодной для последующего синтеза.

Реакционная смесь для одной пробирки содержала: 10 мкл 2,5-кратной буфера для ПЦР (Синтол, Россия, # М-428), 0,1 мкл каждого из праймеров (концентрация 100 пмоль/мкл), 12,8 мкл воды, суммарный объем 23 мкл. В зависимости от образца, в пробирку добавляли 2 мкл кДНК, либо 2 мкл воды (в пробирку с негативным контролем). Для амплификации использовали Mastercycler Gradient (Eppendorf). Схема ПЦР и температурный режим показаны в табл. 3.5.

Таблица 3.5. Схема проведения качественной ПЦР.

Температура, °С	Время, минуты	Циклы
95	5	35 циклов
95	1	
60	0.5	
72	1	
72	10	

После завершения реакции проводили электрофорез в 1% агарозном геле с целью подтверждения наличия продукта ПЦР. Гель готовили с использованием ТАЕ буфера следующего состава: 40 мМ Трис (рН=8,0), 40 мМ ацетат натрия, 1мМ ЭДТА, в гель добавляли бромистый этидий (концентрация 0,5 мкг/мл, AppliChem, #1152,0025). Для приготовления образцов брали 2 мкл 6-кратного загрузочного буфера следующего состава: 0.05 % бромфеноловый синий, 30% сахароза добавляли к 10 мкл образца. Полученную смесь разносили по лункам в геле. Для определения молекулярной массы ДНК в опытных пробах использовали маркеры GeneRuler 1kb ladder (Fermentas). Электрофорез проходил в ТАЕ буфере и напряжении 8-10 В/см. Визуализацию геля проводили в ультрафиолетовом свете с длиной волны 312 нм.

При использовании метода РВ-ПЦР циклы амплификации повторяли 20-50 раз, в результате чего в реакционной смеси в геометрической прогрессии накапливаются продукты синтеза ДНК. Метод ПЦР в реальном времени позволяет оценивать количество продукта в течение всей реакции с помощью флюоресцентных красителей или ДНК-зондов. В данной работе использовались красители, флюоресценция которых возрастает в несколько раз после встраивания в цепь ДНК по сравнению со свободными формами. ПЦР-амплификатор регистрирует интенсивность флюоресценции после каждого цикла амплификации и в соответствии с полученными данными строит график зависимости уровня сигнала от цикла, имеющий s-образную форму. При снижении количества реагентов

в смеси на заключительных стадиях график выходит на плато. Начальная концентрация ДНК в образцах определяется по скорости роста графика (то есть по скорости возрастания флюоресценции).

Методика проведения РВ-ПЦР была аналогична вышеописанной, выполнялась с использованием амплификатора BioRad CFX96, но 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 « $\Delta\Delta Ct$ ».

3.10. 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). Экстремальные значения исследуемых параметров исключены из групп при обработке данных.

* - эффекта vs контроль.

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

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

4.РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1 СТРОЕНИЕ МИОКАРДИАЛЬНЫХ РУКАВОВ ЛЕГОЧНЫХ ВЕН МЛЕКОПИТАЮЩИХ

4.1.1. Общая анатомическая организация легочных вен некоторых млекопитающих животных

4.1.1.1. Легочные вены крысы

На Рис.4.1.1 показана структура суправентрикулярной области сердца и системы легочных вен крысы. Левое предсердие у крыс может быть анатомически разделено на две части: ушко левого предсердия и свободная (в противоположность стенке, формирующей предсердную перегородку) стенка предсердия. У крыс имеется четыре легочных вены, каждая из которых открывается отдельным, четко определяемым устьем в свободной стенке - «крыше» левого предсердия. Две вены доставляют кровь к правым долям легкого, одна вена – к добавочной легочной доле, одна вена – к левой легочной доле. Свободная стенка ЛП и периферия устьев легочных вен имеют гладкую поверхность с эндокардиальной стороны; устья ЛВ как у неонатальных, так и у взрослых животных не отделены от левого предсердия клапанными структурами, в отличие от полых вен. Основной ствол каждой из вен ветвится таким образом, что в области ворот («хилума») легочных долей в каждую из пяти легочных долей входит минимум две венозные ветви. Легочная вена левой (наибольшей у крыс) легочной доли имеет бифуркации первого и второго порядка. Легочная вена левой легочной доли имеет наибольший диаметр и длину внелегочного участка. Эта вена у крыс формирует бифуркацию первого порядка на расстоянии 3-4 мм от устья и является наиболее подходящим объектом для получения срезов или тканевых препаратов. В некоторых легочных долях хорошо прослеживаются внутрилегочные сегменты вен. Наиболее отчетливо внутрилегочный сегмент ЛВ в виде «аксиальной», «внутридолевой» вены прослеживается в задней правой легочной доле.

Следует отметить, что общая толщина стенки проксимальных сегментов (т.е. на участке от устья до первой бифуркации вены) ЛВ крысы меняется слабо и сопоставима с толщиной стенки «крыши» левого предсердия (0,5-0,7 мм). Общая толщина стенки дистальных сегментов вен (т.е. дистальнее бифуркации) меньше, чем проксимальных (0,3-0,5 мм).

При витальном окрашивании как в проксимальном, так и в дистальном участке стенки ЛВ обнаруживаются клетки, имеющие типичные для кардиомиоцитов контуры и размеры, а также поперечную исчерченность (Рис. 4.1.2). Размеры клеток в миокардиальной обкладке проксимального и дистального участка ЛВ различаются незначительно ($p > 0.1$):

их длина составляет 85 ± 9 ($n=30$) и 81 ± 10 мкм ($n=30$), а (наибольший) поперечный диаметр 17 ± 5 ($n=30$) и 14 ± 8 мкм ($n=30$), соответственно.

Строение системы легочных вен у морской свинки крайне сходно с таковым у крыс, за тем исключением, что общая толщина проксимальных и дистальных участков ЛВ больше, чем у крыс (0,9-1,1 мм).

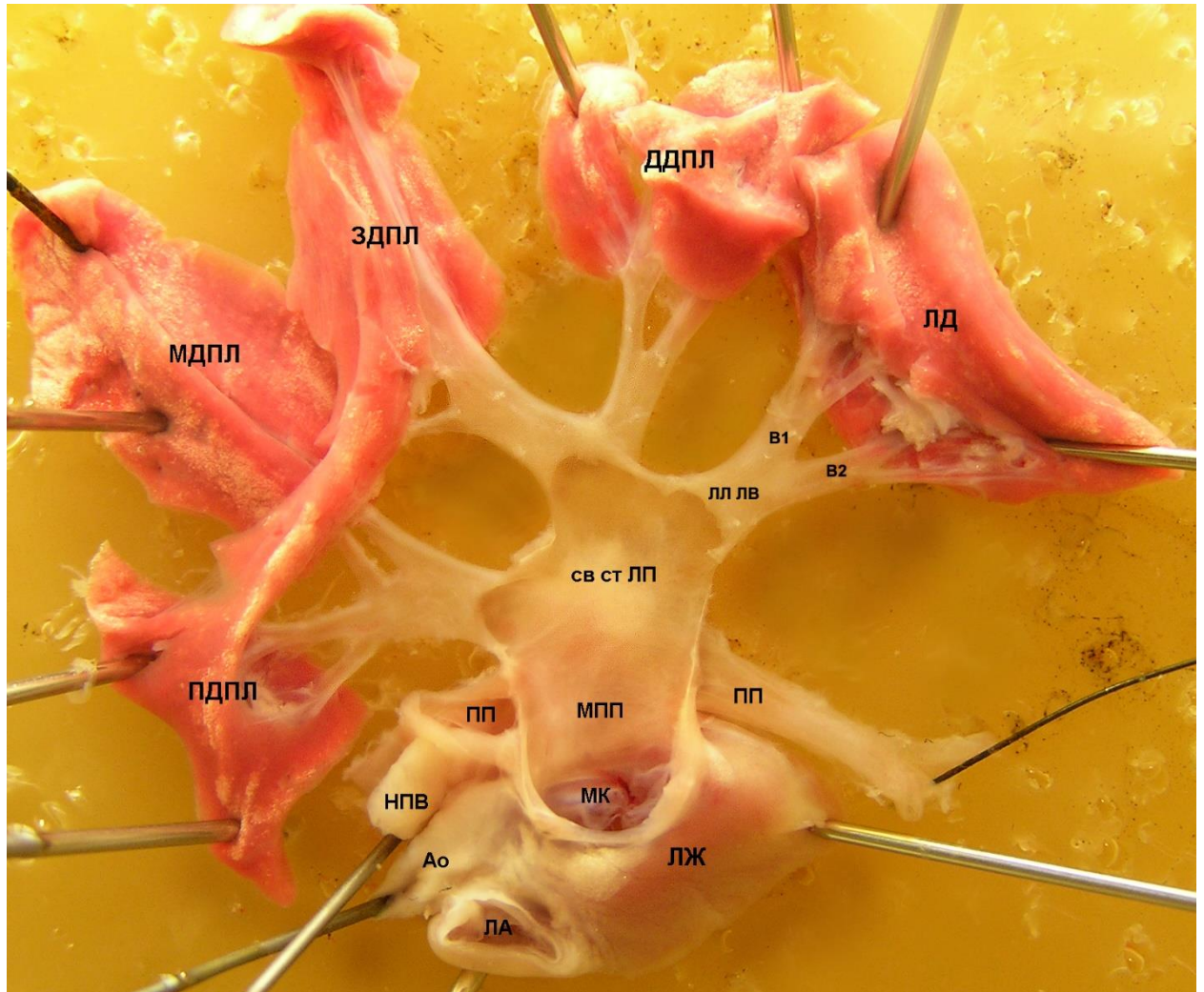


Рис. 4.1.1. Общий вид суправентрикулярной области сердца крысы, включая легочные вены. ЛД – левая доля легкого, ДДПЛ – добавочная доля правого легкого, ЗДПЛ – задняя доля правого легкого, МДПЛ – медиа́льная доля правого легкого и передняя доля правого легкого, ПП – правая краниальная полая вена, НПВ – нижняя полая вена, Ао – аорта, ЛА – легочная артерия, ЛЖ – левый желудочек, МК – митральный клапан, МПП – межпредсердная перегородка, св ст ЛП – свободная стенка левого предсердия, ЛВ – легочная вена, ЛЛ ЛВ – легочная вена левой доли легкого, В1, В2- ветви легочной вены левой доли легкого.

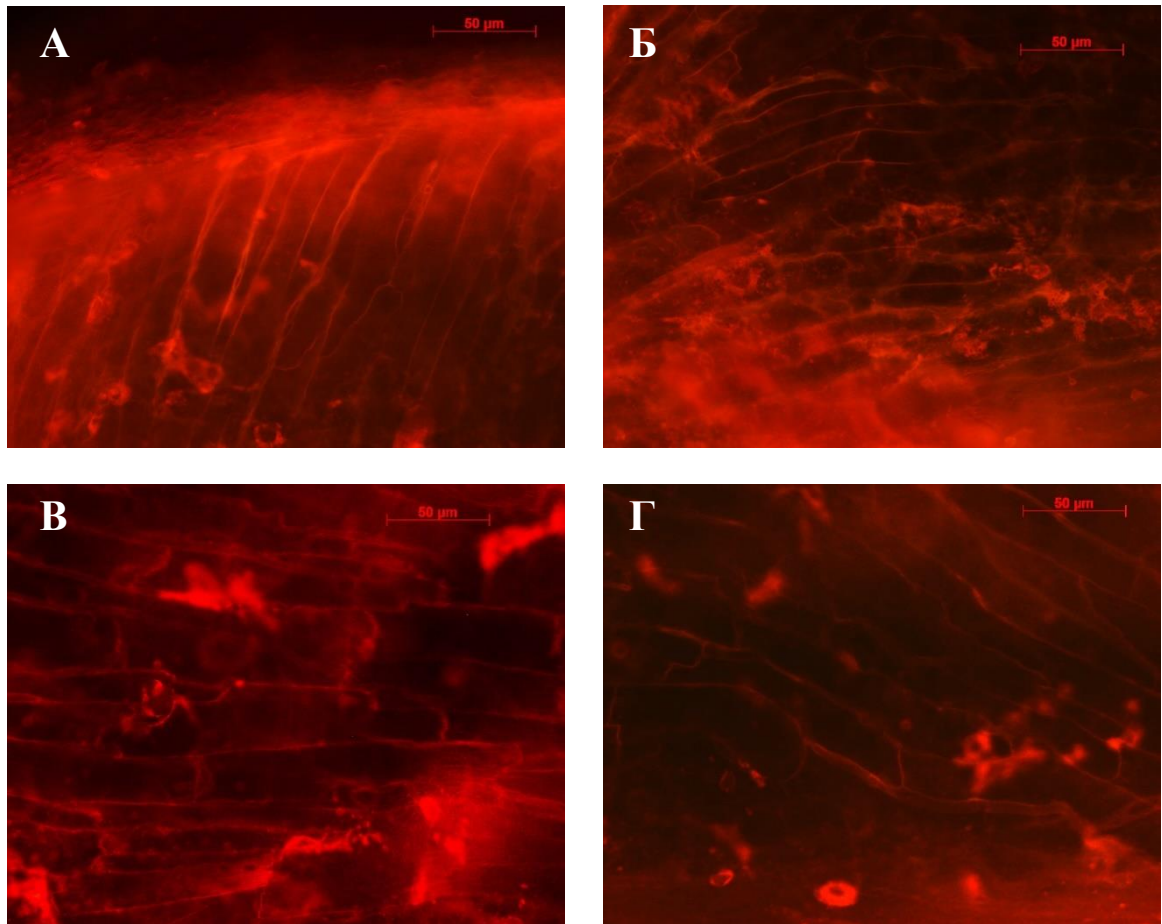


Рис. 4.1.2. Клеточная структура среднего слоя стенки легочной вены крысы. Видны цилиндрические клетки, соединенные в торцах структурами, имеющими вид интеркалярных дисков. Клетки имеют форму типичных кардиомиоцитов. **А, Б** – дистальный участок стенки легочной вены; **В** – проксимальный участок вены; **Г** – устье легочной вены. Флуоресцентная микроскопия; витальное окрашивание тканевых препаратов стенки вены мембранселективным красителем di-4-ANNEPS.

4.1.1.2. Легочные вены мыши

Система легочных вен мышей сходна с таковой у крыс, но имеет ряд особенностей. Левое предсердие, по мере удаления от ушка и предсердно-желудочковой границы, сужаясь, формирует вестибюль или «антрум». Вестибюль разделяется на три или четыре (в зависимости от линии животных) плавно сужающихся отдела. Таким образом, граница между левым предсердием и легочными венами у мышей трудно определима. Вестибюль левого предсердия у мышей можно рассматривать как общее устье единой, крупной, ветвящейся легочной вены. В таком случае общая ЛВ у мышей имеет бифуркации двух порядков, а каждая из пяти легочных долей получает несколько (от двух) мелких ветвей легочных вен. С другой стороны, отходящие от вестибюля предсердия сосуды можно рассматривать как отдельные легочные вены. В таком случае внелегочные сегменты вен имеют один уровень бифуркаций, а устья вен вплотную прилегают друг к другу в

вестибюле левого предсердия. В данной работе сосуды, отходящие от вестибюля предсердия, считали отдельным легочными венами легочных долей (Рис. 4.1.3.).

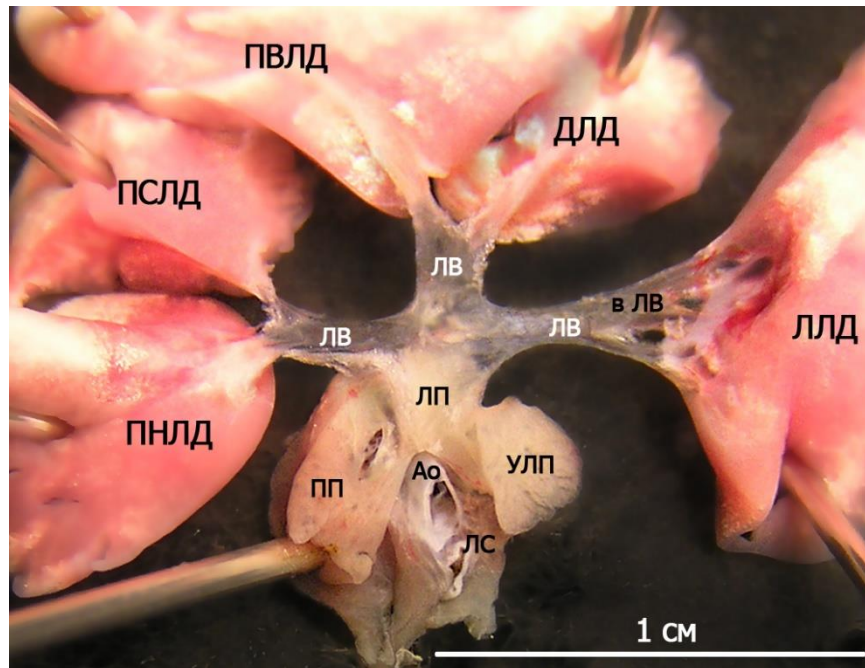


Рис. 4.1.3 Общий вид суправентрикулярной области сердца мыши, включая легочные вены. ЛЛД – левая легочная доля, ДЛД – добавочная доля легкого, ПНЛД – правая нижняя легочная доля, ПСЛД – правая средняя легочная доля, ПВД – правая верхняя легочная доля, ПП – правое предсердие, Ао – аорта, ЛС – ствол легочной артерии, ЛП – левое предсердие и его вестибюль («антрум»), УЛП – ушко левого предсердия, ЛВ – легочная вена, в ЛВ - ветвь легочной вены.

4.1.1.3. Легочные вены кролика

Левое предсердие у кроликов, как и у крыс, четко разделено на две части: ушко левого предсердия и т.н. свободная стенка левого предсердия, включающая его «крышу». Миокард ушка ЛВ имеет выраженную трабекуляризацию, в то время как свободная стенка ЛП имеет гладкую эндокардиальную поверхность. У кроликов имеется три легочные вены, которые открываются отдельными устьями в «крыше» левого предсердия. Наиболее крупной является вена левой легочной доли (Рис. 4.1.4.). Каждая из легочных вен ветвится перед входом в легочные доли. Следует отметить, что у кроликов толщина стенки ЛВ гораздо больше, чем у крыс и может достигать 3 мм. В отличие от крыс общая толщина стенки ЛВ существенно снижается в дистальном направлении: в области устьев толщина ЛВ равняется толщине стенки предсердия, а 3-4 мм дистальнее – в районе бифуркации – уменьшается до $1 \pm 0,2$ мм. При обзорном анатомировании очевидно, что такое уменьшение толщины является результатом истончения миокардиальной обкладки в среднем слое стенки вен. Миокардиальные рукава ЛВ, таким образом, у кроликов не охватывают всей длины вен и оканчиваются на расстоянии 3-4 мм от устьев, не достигая мест бифуркации вен. Ветви ЛВ и их внутрилегочные участки не имеют миокардиальной обкладки.

Отличительной особенностью легочных вен у кролика является наличие собственных кровеносных сосудов (*vasa vasorum*), питающих миокардиальные обкладки в проксимальных сегментах.

У кроликов миокардиальная обкладка охватывает весь периметр проксимальных сегментов ЛВ. Однако, миокардиальная обкладка не имеет четкой дистальной границы – отдельные миокардиальные тяжи залегают в стенке вен дистальнее (ближе к зоне бифуркации), чем основная масса миокардиальной ткани. Таким образом, у кроликов в стенке ЛВ можно выделить «переходную зону», в которой отдельные, изолированные, извитые миокардиальные тяжи формируют «сетчатый» миокардиальный рукав, неполностью охватывающий периметр вены (Рис. 4.1.5). Протяженность переходной зоны варьирует (в зависимости от массы животного) от 0,5 до 2 мм. Таким образом, на макроскопическом анатомическом уровне миокардиальные рукава ЛВ кролика имеют значительное сходство с таковыми у человека.

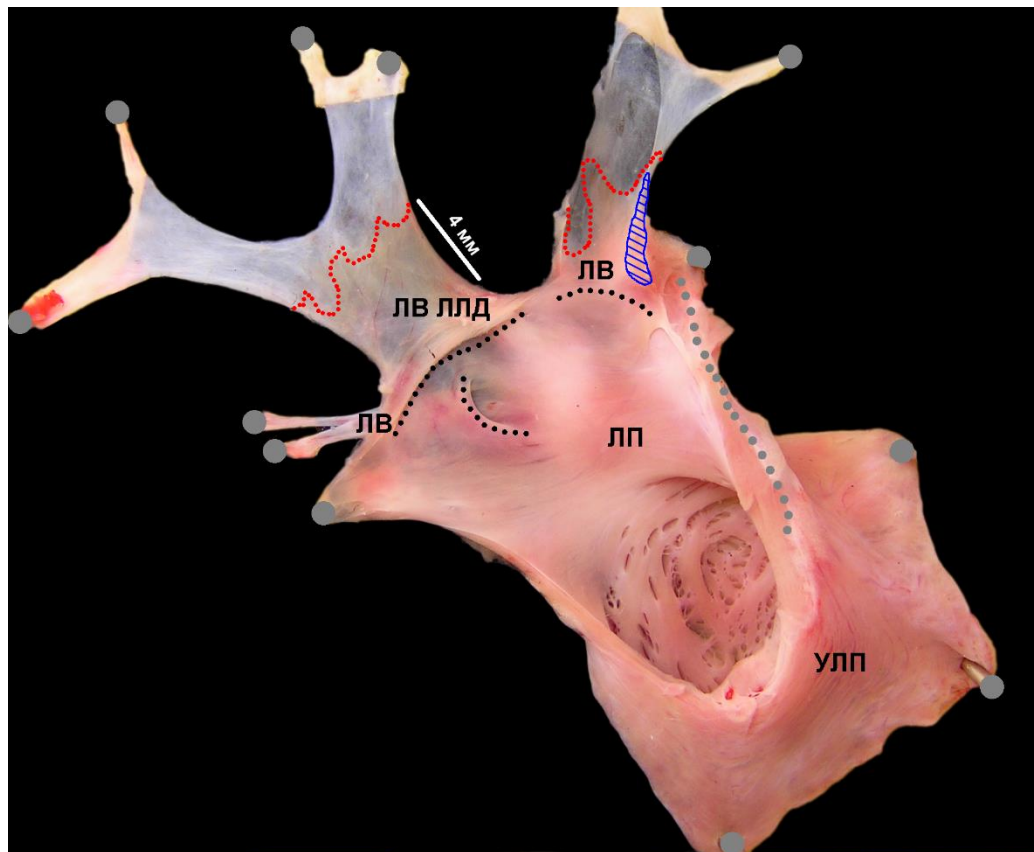


Рис. 4.1.4 Общий вид левого предсердия и легочных вен кролика. Видны трабекуляризованная и гладкостенная части левого предсердия. Черным пунктиром показаны устья легочных вен; серым пунктиром – предсердная перегородка; красным пунктиром показана дистальная граница миокардиальной обкладки, охватывающая весь периметр вены. ЛВ ЛЛД – легочная вена (наиболее крупная) левой легочной доли; ЛП – левое предсердие; УЛП- ушко левого предсердия.

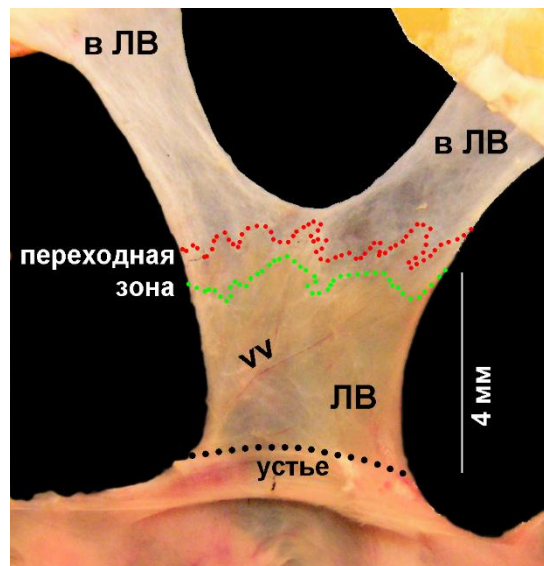


Рис. 4.1.5 Легочная вена левой легочной доли легкого у кролика. ЛВ – легочная вена; в ЛВ – ветвь легочной вены, vv – vasa vasorum. Зеленым пунктиром показана дистальная граница миокардиальной обкладки, охватывающая весь периметр вены; красным пунктиром показана дистальная граница отдельных миокардиальных волокон.

4.1.2. Формирование миокардиальной ткани легочных вен млекопитающих в ходе онтогенеза

Десмин является специфическим белком, экспрессируемым в миоцитах, а также считается наиболее ранним (в т.ч. эмбриональным) маркером мышечных клеток. Уровень экспрессии десмина сильно возрастает после терминальной дифференцировки кардиомиоцитов. Десмин является структурным белком саркомеров, интегрирующим Z-диски, миофибриллы и цитоскелет саркоплазмы.

В стенке легочных вен взрослых крыс во всех срезах (количество животных – 5, срезов > 20) наблюдается интенсивная флюоресценция, специфическая для десмина. Десмин-экспрессирующие клетки в стенке ЛВ являются поперечно-полосатыми, имеют типичный для кардиомиоцитов размер и контуры, связаны интеркалярными дисками друг с другом. Десмин-экспрессирующие клетки обнаруживаются снаружи от внутренней оболочки вены. Иммуноэкспрессия десмина подтверждает наличие кардиомиоцитов, миокардиальный тип ткани как в проксимальных, так и в дистальных сегментах ЛВ крыс. Экспрессия десмина выявляет наличие двух миокардиальных слоев (внутренний – продольный, внешний - радиальный) в стенке ЛВ, каждый из которых имеет толщину в 5-10 кардиомиоцитов (Рис. 4.1.6).

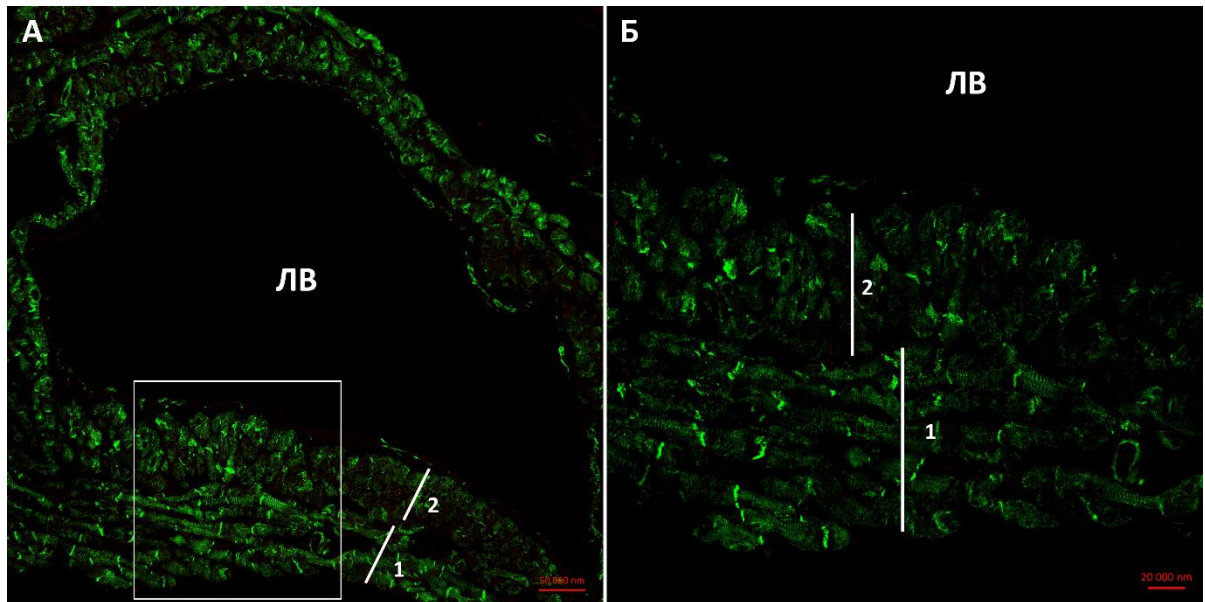


Рис.4.1.6. Иммуноэкспрессия десмина (зеленый псевдоцвет) в стенке легочных вен взрослых крыс при разном увеличении (А, Б). Репрезентативные изображения, полученные с помощью конфокальной микроскопии. А. Структура стенки легочной вены. 1 – внешний, радиальный слой десмин-экспрессирующих клеток (кардиомиоцитов); 2 – внутренний, продольный (коаксиальный) слой десмин-экспрессирующей ткани в стенке легочных вен. ЛВ – просвет легочной вены. На Б видна поперечная исчерченность клеток, а также интенсивная иммуноэкспрессия в области интеркалярных дисков между клетками.

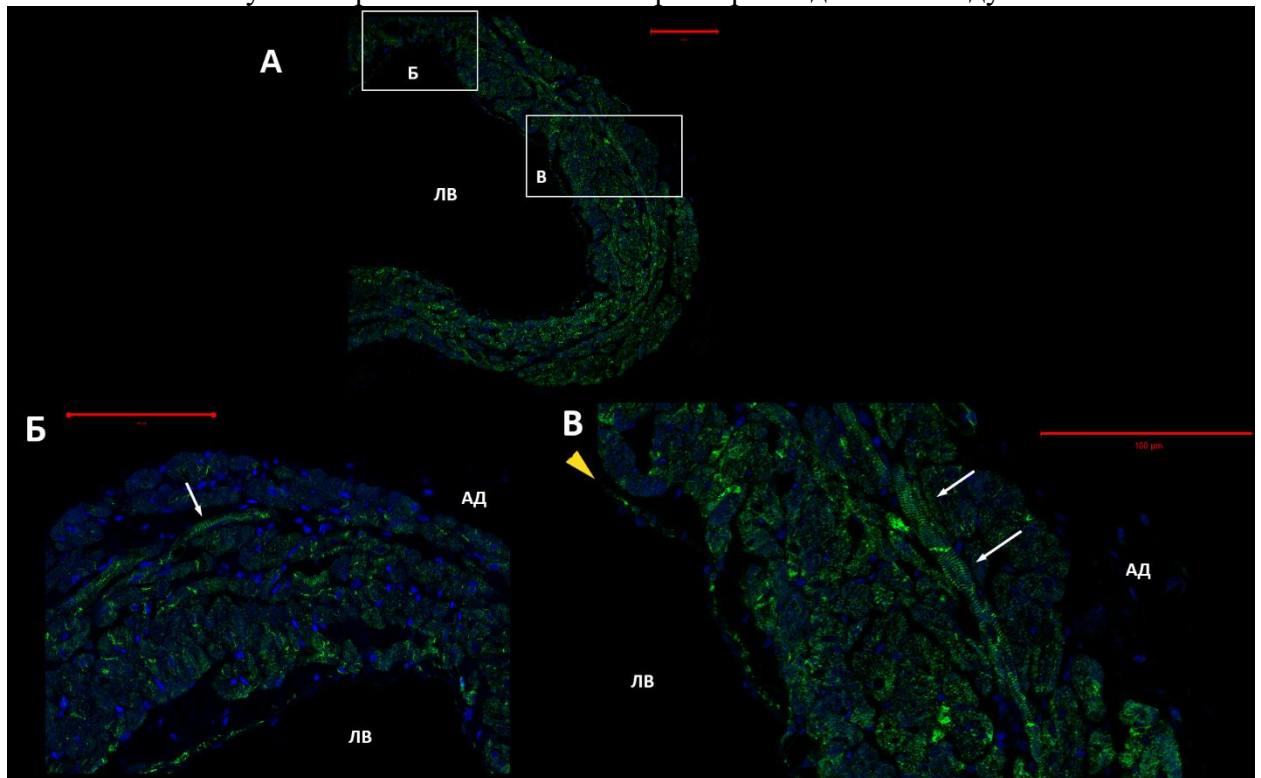


Рис. 4.1.7. Иммуноэкспрессия десмина (зеленый псевдоцвет) в стенке легочных вен крыс возрастом 14 сут при разном увеличении. Репрезентативные изображения, полученные с помощью конфокальной микроскопии. На Б и В показаны участки, ограниченные прямоугольниками на А. Стрелками показаны клетки, экспрессирующие десмин с типичной для кардиомиоцитов поперечной исчерченностью. На В желтой стрелкой показана внутренняя оболочка вены (интима). ЛВ – просвет легочной вены, АД – адвентиция. Клеточные ядра окрашены DAPI (синий псевдоцвет).

Десмин-экспрессирующие клетки с поперечной исчерченностью обнаруживаются не только в стенке ЛВ взрослых крыс, но и у животных возрастом 14 (n=5) и 7 (n=5) суток (Рис. 4.1.7, Рис. 4.1.2.8). Десмин также обнаруживается в клетках стенки ЛВ неонатальных крыс (1 сут постнатальной, n=3) жизни. У неонатальных крыс в стенке ЛВ десмин-экспрессирующие клетки имеют веретенообразную форму, а поперечная исчерченность выражена слабо, что характерно для неонатальных кардиомиоцитов (Рис. 4.1.9). Как и у взрослых животных, в стенке ЛВ неонатальных крыс обнаруживается несколько слоев десмин-экспрессирующих клеток. Таким образом, миокардиальная обкладка ЛВ у крыс формируется на пренатальных этапах развития, а увеличение миокардиального слоя, вероятнее всего, происходит за счет гипертрофического роста отдельных клеток, как и в предсердном миокарде.

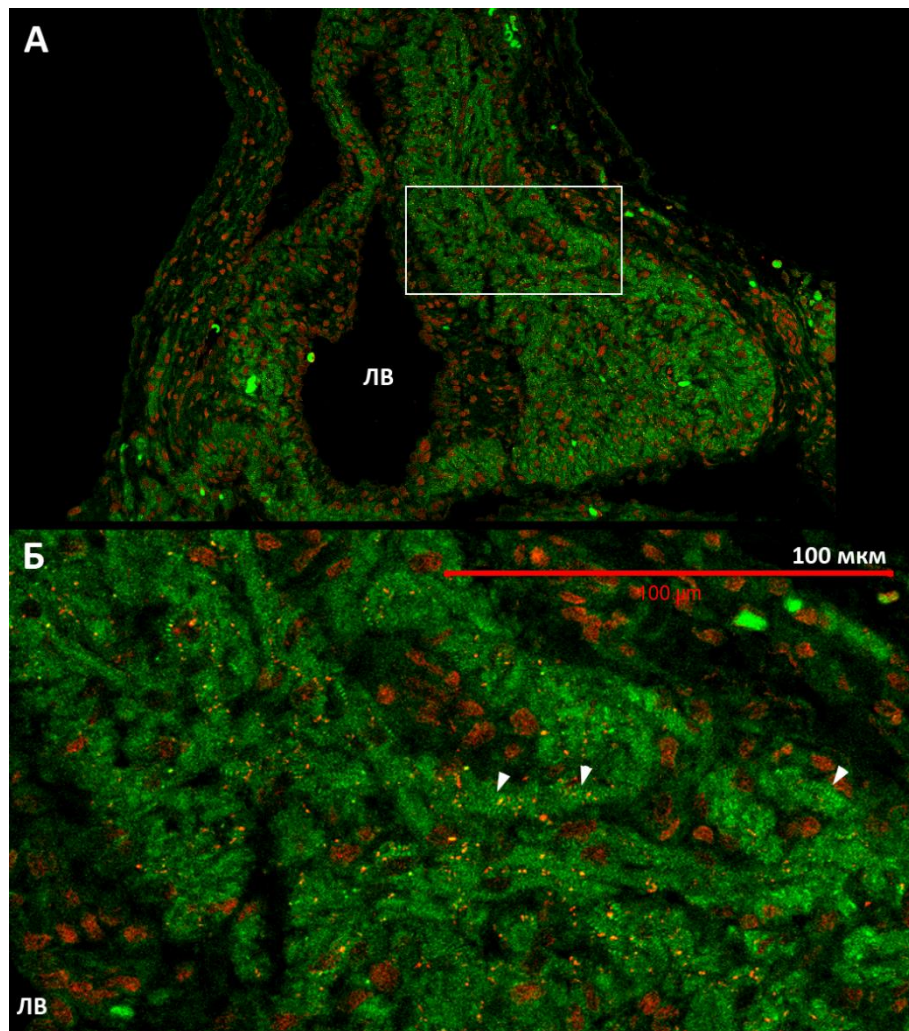


Рис. 4.1.8. Иммуноэкспрессия десмина (зеленый псевдоцвет) в стенке легочных вен крыс возрастом 7 сут при разном увеличении. Репрезентативные изображения, полученные с помощью конфокальной микроскопии. На **Б** показан участок, ограниченный прямоугольником на **А**. Стрелками показаны клетки, экспрессирующие десмин с типичной для неонатальных кардиомиоцитов веретенообразной формой и поперечной исчерченностью. ЛВ – просвет легочной вены. Клеточные ядра показаны красным псевдоцветом (Хегст).

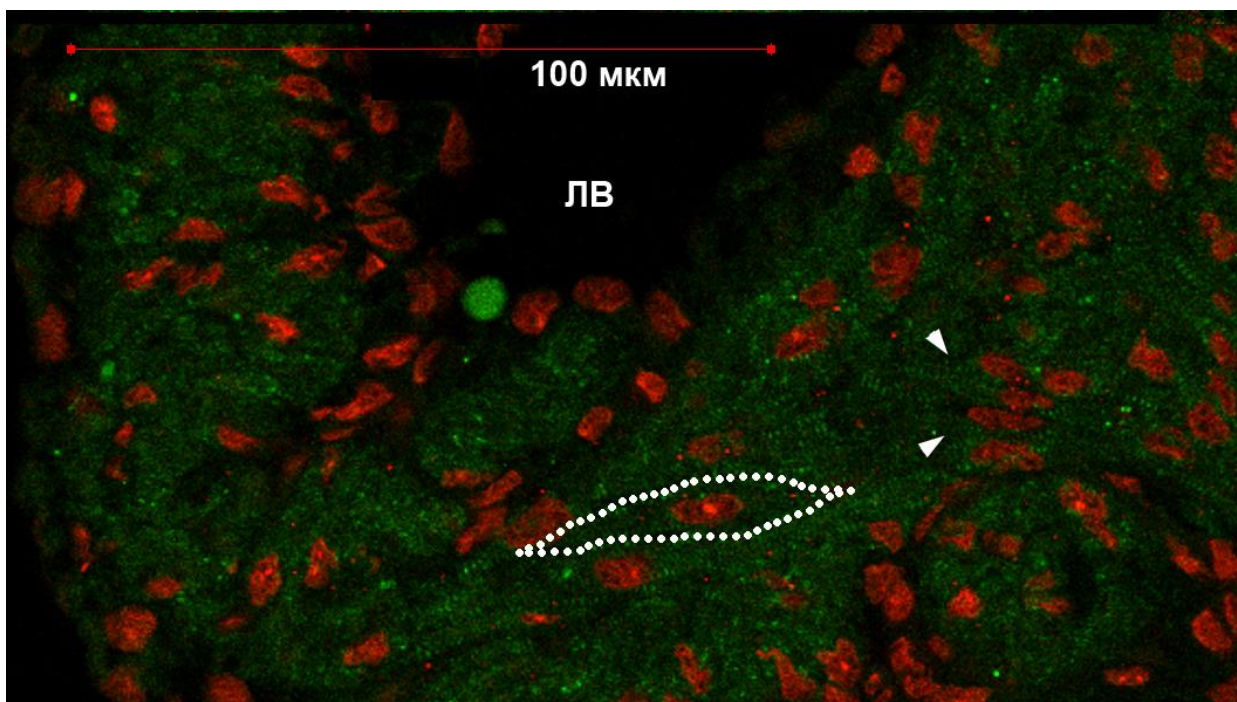


Рис. 4.1.9. Иммуноэкспрессия десмина (зеленый псевдоцвет) в стенке легочных вен неонатальных крыс (1 сут постнатальной жизни). Стрелками показаны клетки, экспрессирующие десмин с типичной для неонатальных кардиомиоцитов веретенообразной формой и поперечной исчерченностью. Пунктирной линией ограничена клетка, имеющая веретенообразную форму, характерную для неонатальных кардиомиоцитов. ЛВ – просвет легочной вены. Клеточные ядра показаны красным псевдоцветом (Хегст).

4.2. БИОЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МИОКАРДИАЛЬНОЙ ТКАНИ ЛЕГОЧНЫХ ВЕН МЛЕКОПИТАЮЩИХ

4.2.1. Биоэлектрическая активность миокардиальной ткани легочных вен крысы и ее регуляция

4.2.1.1. Потенциал покоя, потенциал действия и рефрактерность в легочных венах крысы

Вызванные потенциалы действия в миокардиальной ткани легочных вен крысы

Миокардиальная ткань в области устьев, проксимальных и дистальных участков легочных вен крысы генерирует ПД предсердного типа, в ответ на стационарную ритмическую электрическую стимуляцию ткани. Длительность ПД в миокарде легочных вен выше, чем в миокарде левого предсердия при одинаковой частоте стимуляции препаратов. Для проксимальной области и области устьев ЛВ крысы (при стимуляции с частотой 3 Гц) длительность ПД на уровне 90% реполяризации (ДПД90%) составляет 74 ± 2 мс ($n=10$, Рис. 4.2.1), 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 ($p < 0,05$). Разброс длительностей ПД при их регистрации в проксимальных и дистальных участках легочных вен достоверно выше, чем в предсердном миокарде. В условиях постоянной стационарной стимуляции значение потенциала покоя в различных участках легочных вен крысы несколько менее негативно, чем в предсердном миокарде (-75 ± 4 и $-82 \pm 3,5$ мВ, соответственно, $n=10$, $p < 0,05$).

Рефрактерность в миокардиальной ткани легочных вен

Значения функционального рефрактерного периода (ФРП) в проксимальном и дистальном отделах миокарда легочных вен крысы (60 ± 3 и 69 ± 3 мс, соответственно, $n=10$). ФРП в миокарде левого предсердия составил – 44 ± 3 мс ($n=8$). Максимальный навязываемый ритм в предсердном миокарде и миокарде ЛВ также значительно различался: $16,7 \pm 0,4$, $14,5 \pm 0,3$; $22,7 \pm 0,4$ Гц в проксимальной части, дистальной части ЛВ и предсердии, соответственно.

Спонтанный сдвиг потенциала покоя в миокардиальной ткани легочных вен крысы

Прекращение стационарной непрерывной электрической стимуляции и, соответственно, прекращение генерации ПД в ткани легочных вен приводит к изменениям потенциала покоя (Рис. 4.2.1). 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 покое 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 покое состояние – спонтанной деполяризации не наблюдается. Наоборот, в некоторых экспериментах прекращение генерации ПД и переход в покое состояние приводит к кратковременной, но значимой гиперполяризации (-3 мВ).

Следует отметить, что в отдельных случаях прекращение генерации ПД приводит к очень сильной 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. Таким образом, ПП в легочных венах у крыс 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.

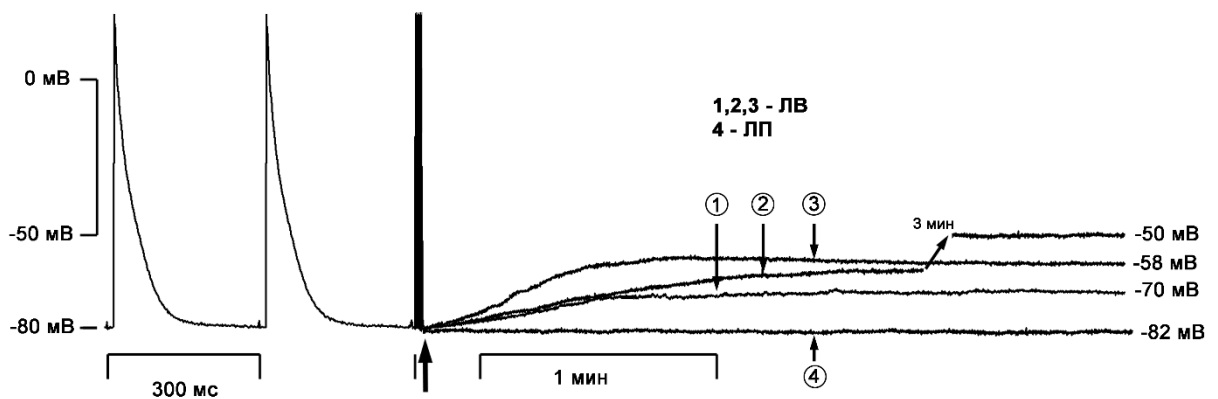


Рис. 4.2.1. Сдвиг потенциала покоя в миокарде ЛВ крысы при переходе препарата в покое состояние. 1, 2, 3 – варианты изменения ПП при прекращении стимуляции в легочных венах, 4 – в предсердной части препарата (ЛП). Стрелкой указан момент прекращения стимуляции.

Влияние режима возбуждения на биоэлектрическую активность в легочных венах

Длительное прекращение электрической стационарной стимуляции – на 60 мин и более – вызывает потерю возбудимости в части препаратов легочных вен (30%). В таком случае возобновление стимуляции не приводит к немедленному восстановлению способности легочных вен генерировать ПД «предсердного» типа в ответ на нанесение возбуждающих стимулов. Такой эффект не наблюдается в предсердном миокарде: возобновление стимуляции в этой ткани приводит к немедленной генерации ПД, имеющих типичную для рабочего миокарда конфигурацию.

Возобновление стимуляции в таких случаях приводит лишь к пассивным ответам, которые через 1-5 минут преобразуются в т.н. «медленные» ответы – длительные потенциалы действия с медленным фронтом, имеющие конфигурацию «пейсмекерных» ПД. Продолжение электрической стимуляции способствует прогрессирующему смещению потенциала покоя к более негативным значениям (-70, - 75 мВ), увеличению скорости нарастания переднего фронта ПД и уменьшению их длительности. Электрическая стимуляция в течение последующих 5-10 мин приводит к восстановлению способности легочных вен генерировать «быстрый» ответ, т.е. ПД, имеющие конфигурацию «предсердных» с быстрым фронтом ПД (150-300 В/с) и длительностью 75 ± 10 мс. Таким образом, поддержание режима стимуляции важно для способности легочных вен генерировать потенциалы действия (Рис. 4.2.2).

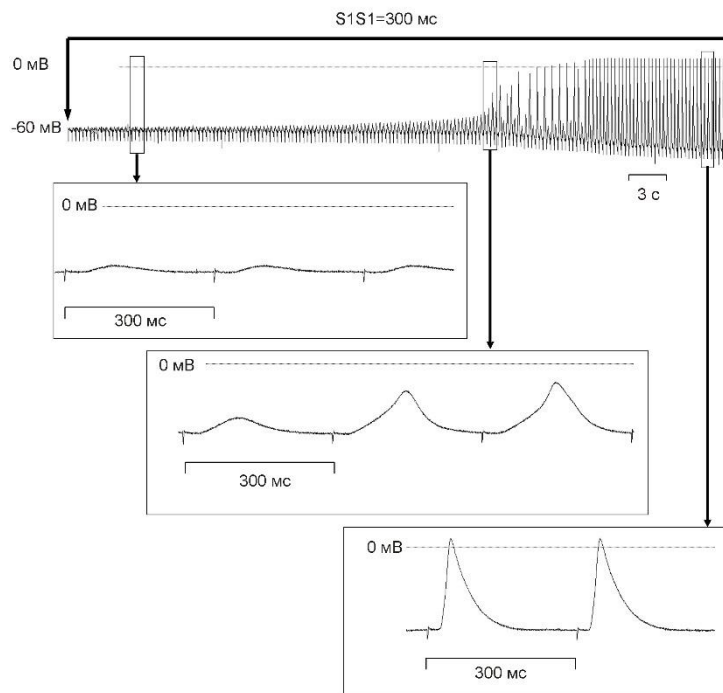


Рис. 4.2.2. Потенциалы действия «пейсмекерного» типа и постепенное восстановление возбудимости в миокарде легочных вен при возобновлении ритмической стимуляции после длительного периода покоя.

4.2.1.2. Влияние внеклеточного лития на биоэлектрическую активность легочных вен крысы

Частичная замена ионов натрия на ионы лития ($[Na^+]_o=90$ мМ, $[Li^+]_o=30$ мМ) в перфузионном растворе вызывает деполяризацию в покое миокарде легочных вен крысы. В присутствии 30 мМ лития ПП (Рис. 4.2.3) оказывался дополнительно деполяризован (до $-56\pm 2,5$, $n=7$) относительно того уровня, на котором ПП стабилизируется после прекращения электрической стимуляции (-67 ± 6 мВ). Таким образом, замена 25% ионов натрия на ионы лития приводит к деполяризации на $11\pm 2,5$ мВ. Деполяризация в присутствии лития развивается медленно; наименее негативное значение ПП достигается через 8 ± 2 мин после начала перфузии раствором, содержащим ионы Li^+ . В присутствии лития ПП в миокарде левого предсердия также смещается в сторону положительных значений. Однако, вызванная литием деполяризация в ЛП незначительна (до $-75\pm 2,5$ мВ, $n=5$).

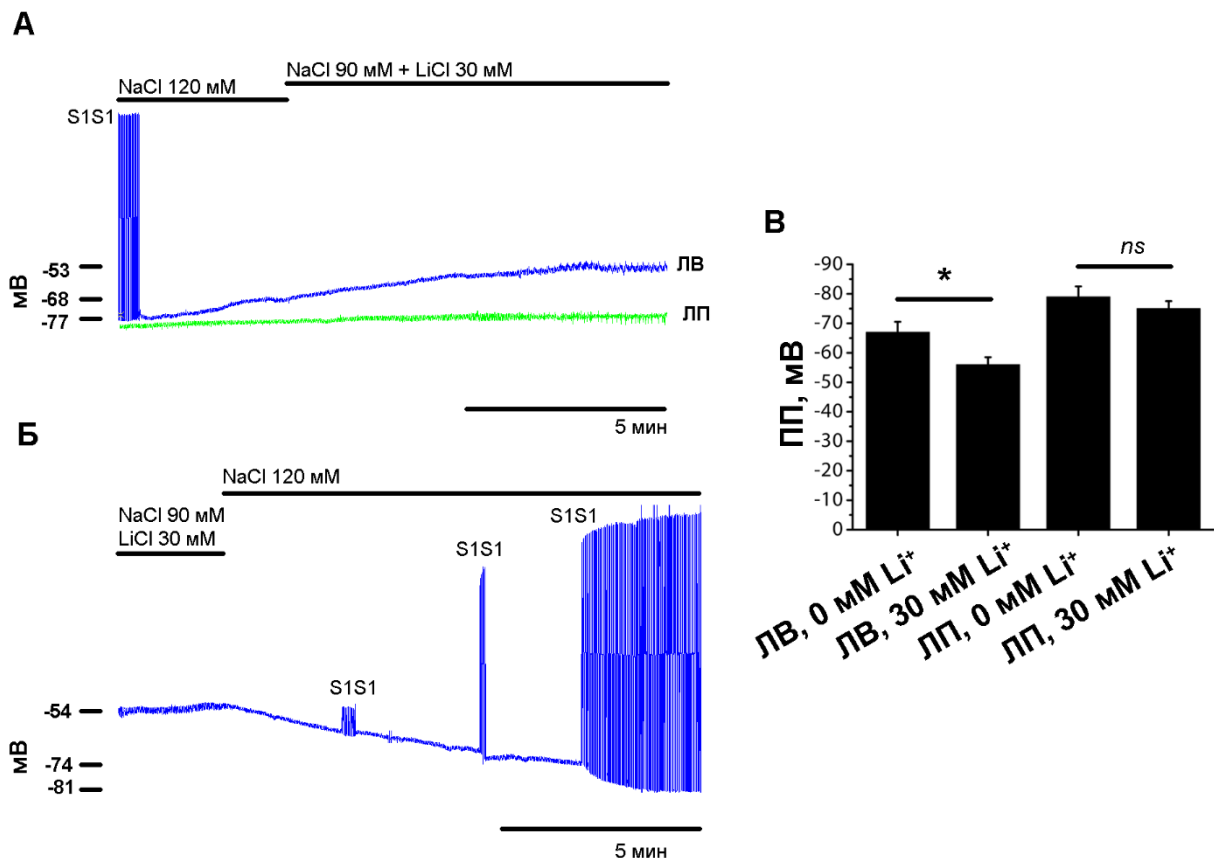


Рис. 4.2.3 Изменение потенциала покоя в миокарде легочных вен при перфузии модифицированным раствором, содержащим ионы лития (Na 90 мМ, Li -30 мМ). **А.** Репрезентативные примеры записей, отражающих изменение ПП в покое миокарде легочных вен (ЛВ) или левого предсердия (ЛП) при действии 30 мМ лития. **Б.** Восстановление исходного значения ПП и возбудимости при удалении ионов лития из перфузионного раствора. **В.** Значения ПП в левом предсердии или легочных венах в контрольных условиях при $[Li^+]_o=30$ мМ. *- $p<0.05$ (однофакторная ANOVA), ns-незначимо.

Удаление ионов лития из перфузионного раствора и восстановление стандартной концентрации ионов натрия (120 мМ) приводит к постепенному возвращению ПП к исходным и даже более отрицательным значениям (-74 ± 6 мВ) в течение 5-10 мин). Восстановление значений ПП после удаления ионов лития из раствора сопровождается восстановлением возбудимости ткани.

4.2.1.3. Влияние ацетилхолина на биоэлектрическую активность легочных вен крысы

Влияние ацетилхолина на электрически вызванные ПД в миокарде легочных вен

Ацетилхолин (АЦХ) в миокардиальной ткани легочных вен у крыс вызывает типичные изменения – снижение длительности ПД и гиперполяризацию потенциала покоя. При действии 1 мкМ АЦХ длительность электрически вызванных ПД на уровне 90% реполяризации в легочных венах быстро уменьшается до 11 ± 1 мс ($n=6$) от 74 ± 3 мс в контрольных условиях (Рис. 4.2.4).

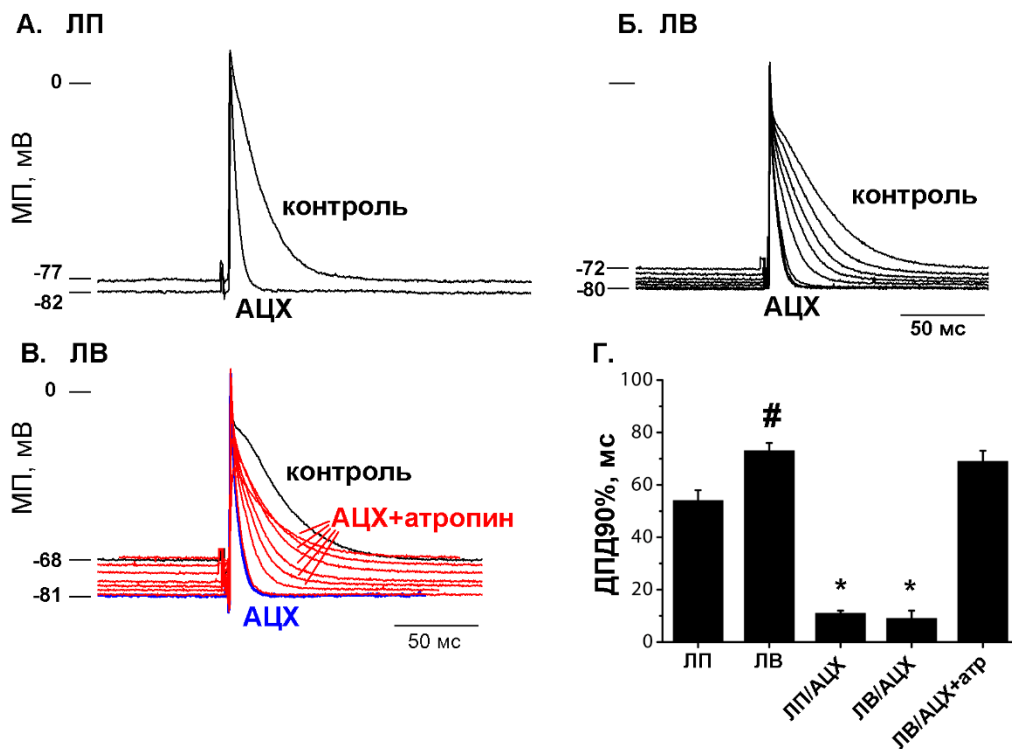


Рис. 4.2.4. Влияние ацетилхолина на биоэлектрическую активность миокардиальной ткани легочных вен крысы. **а-б.** Репрезентативные примеры потенциалов действия в левом предсердии (ЛП), легочной вене (на уровне первой бифуркации ЛВ) крысы в контроле и при действии 1 мкМ ацетилхолина (АЦХ). **в.** Репрезентативные записи, отражающие влияние атропина (1 мкМ) на ПД при действии АЦХ (1 мкМ). **г.** Длительность ПД в рабочем предсердном миокарде и легочных венах крысы при действии ацетилхолина и подавление эффекта АЦХ атропином. *, # - $p < 0.05$ (двухфакторная ANOVA, * - при сопоставлении с длительностью ПД в контроле; # - при сопоставлении ДПД в ЛВ и ЛП).

Величина этого эффекта АЦХ в ЛВ ($88 \pm 9\%$) сравнима ($p(U) > 0.1$) с величиной эффекта в миокарде левого предсердия ($80 \pm 6\%$, $n=6$), несмотря на более высокую длительность ПД в легочных венах в контрольных условиях. Вызванная АЦХ в легочных венах 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. 4.Г, Д.).

Влияние ацетилхолина на ПП в покоящейся миокардиальной ткани легочных вен

Величина эффекта ацетилхолина (АЦХ) различна в предсердном миокарде, проксимальном и дистальном отделах миокарда легочных вен, находящимся в состоянии покоя. Ацетилхолин (1 мкМ) в предсердном миокарде вызывает гиперполяризацию на 4 ± 1 мВ (от -79 ± 2 до -82 ± 2 мВ, $n=10$). В той же концентрации АЦХ в проксимальной части легочной вены (в области устья ЛВ) гиперполяризует ПП на 9 ± 2 мВ ($n=15$), в дистальной части (области бифуркации вены) на $13 \pm 1,5$ мВ (от -67 ± 3 до $-80 \pm 2,5$ мВ, $n=15$). Гиперполяризация, вызываемая АЦХ в легочных венах имеет статистически значимо большую величину ($p(U) < 0.05$), чем в предсердном миокарде.

Следует указать, что в покоящихся либо ритмически стимулируемых/возбуждаемых легочных венах в ходе действия АЦХ автоматической активности, спонтанных ПД не возникало ни в одном из экспериментов. Спонтанные потенциалы действия возникают в период восстановления («отмывки») после действия АЦХ (в трети случаев, 9 из 25).

Влияние ацетилхолина на возбудимость миокарда легочных вен

Как указано выше, в части экспериментов прекращение стационарной стимуляции/возбуждения ткани легочных вен приводило к стабилизации ПП на уровне -55 , -50 мВ. В таких условиях, миокардиальная ткань легочных вен оказывалась невозбудимой: в ответ на нанесение возбуждающих электрических стимулов ПД не возникали.

Ацетилхолин (1-2 мкМ) в таких случаях приводил к восстановлению возбудимости за счет быстрой (10 ± 3 с) гиперполяризации ПП до значений -80 ± 5 мВ ($n=3$). Интересно, что 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. 4.2.5).

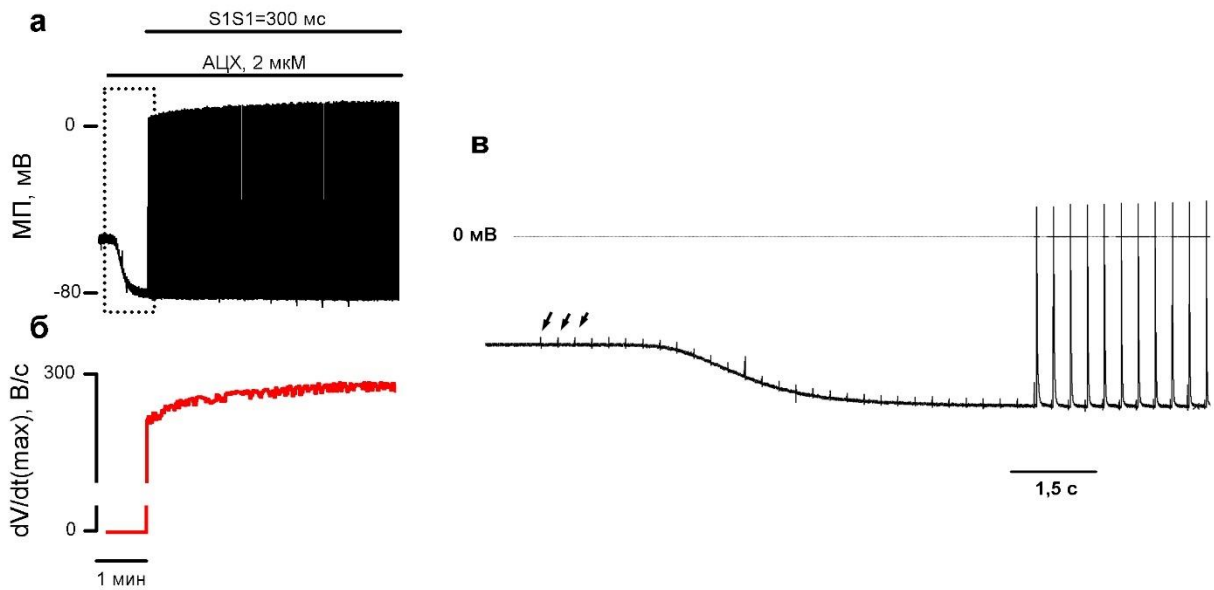


Рис. 4.2.5. Восстановление возбудимости миокардиальной ткани легочных вен при действии ацетилхолина (АЦХ). **а.** Возобновление электрической стимуляции (S1S1) приводит к возникновению ПД только после гиперполяризации, вызванной 2 мкМ ацетилхолина. **б-в.** В ответ на стимуляцию возбудимость при действии АЦХ восстанавливается скачкообразно: амплитуда ПД и скорость нарастания фронта ПД сразу после восстановления имеют величину, характерную для рабочего миокарда предсердий. Стрелками отмечены пассивные ответы, возникающие в моменты нанесения стимулов до начала действия АЦХ.

Влияние бария на потенциал покоя и электрически вызванные ПД при действии ацетилхолина в легочных венах

Барий вызывает подавление гиперполяризующего эффекта ацетилхолина в легочных венах. Этот эффект наблюдается как в покоем миокарде, так и при стимуляции/возбуждении легочных вен. При действии 50 мкМ Ba^{2+} гиперполяризация, вызываемая 1 (n=5) или 2 мкМ АЦХ (n=5) уменьшалась на $60\pm 13\%$ и $56\pm 10\%$, соответственно. По мере уменьшения гиперполяризующего эффекта АЦХ при действии бария амплитуда и скорость нарастания фронта ПД электрически вызванных ПД снижалась. В тех случаях, когда в тканевых препаратах легочных вен вследствие значительной деполяризации ПП вызвать ПД удавалось только в присутствии АЦХ, барий приводил к потере возбудимости, восстановленной ацетилхолином (Рис. 4.2.6).

Следует отметить, что при одновременном действии бария и АЦХ спонтанной активности не наблюдалось ни во одном из экспериментов.

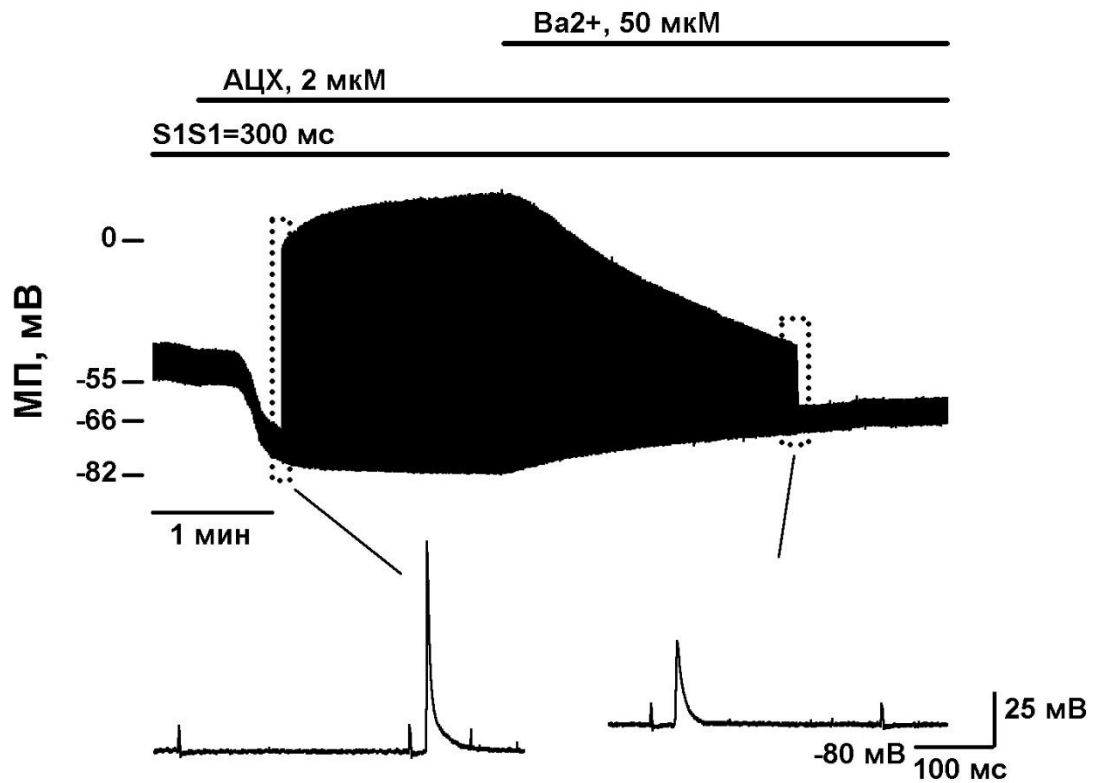


Рис. 4.2.6. Подавление барием гиперполяризации, вызванной ацетилхолином в легочных венах крысы. Ослабление гиперполяризующего эффекта АЦХ при действии бария приводит к постепенному уменьшению амплитуды ПД и потере возбудимости в легочных венах.

Эффекты ацетилхолина, выделяемого неквантовым путем в миокарде легочных вен

В покоящемся препарате миокардиальных рукавов ЛВ крысы при действии эзерина (10 мкМ 15 мин, n=5) - ингибитора ацетилхолинэстеразы (АХЭ), не наблюдалось гиперполяризационного сдвига ПП, который мог бы быть обусловлен «неквантовым» выделением АЦХ. В препаратах легочных вен, работающих с навязанным ритмом, эзерин не приводил к снижению длительности ПД (10 мкМ 15 мин, n=5). Таким образом, «неквантовое» выделение АЦХ, вероятно, значительно менее выражено в миокарде ЛВ, чем предсердиях.

4.2.1.4. Эффекты норадреналина в миокардиальных рукавах легочных вен крыс

Влияние норадреналина на потенциал покоя в миокардиальной ткани легочных вен крысы

Эндогенный агонист адренорецепторов норадреналин (НА, 5-20 мкМ) оказывает сложное, многофазное воздействие на биоэлектрическую активность в легочных венах, что обусловлено различиями в кинетике передачи сигналов через сопряженные с альфа- и бета-

адренорецепторами внутриклеточных каскадов. Двухфазное изменение мембранного потенциала при действии НА в покоем миокарде ЛВ сопровождается индукцией спонтанной активности (спонтанных ПД, Рис. 4.2.7).

Первой фазой после начала действия НА (10 мкМ) является гиперполяризация ПП (11 ± 4 мВ, $p(T) < 0.05$, $n=25$), которая развивается в течение $1 \pm 0,5$ мин. В отдельных случаях гиперполяризация имела значительную величину, в результате чего ПП достигал значения -81 мВ ($n=2$).

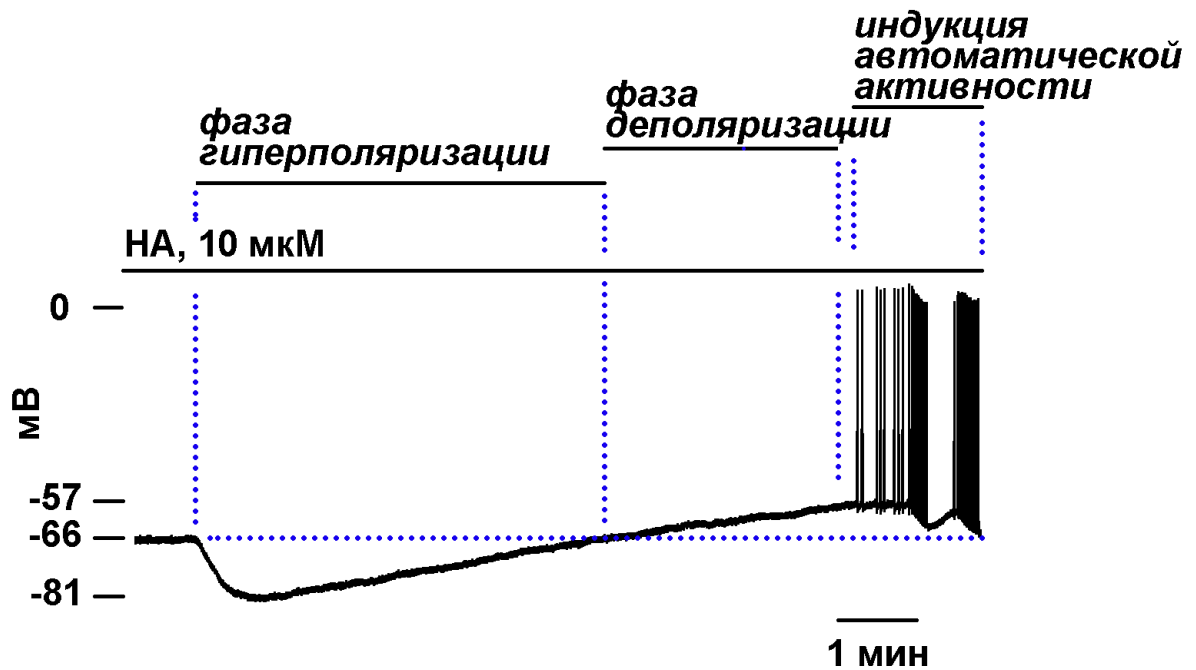


Рис. 4.2.7. Репрезентативный пример записи, демонстрирующий многофазный характер влияния норадреналина на потенциал покоя в легочных венах крысы.

Фазу гиперполяризации сменяет деполяризация потенциала покоя. В ходе деполяризации, вызванной 10 мкМ НА, ПП мог достигать уровня -55 мВ, (в среднем -56 ± 4 мВ, $n=25$). Фаза деполяризации в большинстве экспериментов (22 из 25, 88%) оканчивалась индукцией автоматической активности (спонтанных ПД) различного характера. Спонтанные потенциалы действия никогда не начинались в фазу гиперполяризации. В предсердном миокарде ($n=6$) ПП при действии НА изменялся крайне слабо, как при регистрации в режиме стационарной стимуляции/возбуждения ткани (в интервалах между электрически вызванными ПД), так и при регистрации в покоем миокарде (гиперполяризация на $2,5 \pm 1$ мВ).

Автоматическая активность, вызываемая норадреналином в легочных венах крысы

Как указано выше, двухфазное изменение ПП в покоем миокарде ЛВ при действии НА переходило в большинстве случаев в автоматическую (спонтанную)

активность. Способность НА вызывать автоматическую активность является дозозависимой: автоматическая активность в ЛВ возникала при действии НА в концентрациях 0,1 (2 из 5 или 40% случаев), 1 (2 из 5, 40%), 5 (4 из 5, 80%) 10 (88%, 22 из 25) и 20 мкМ (80%, 4 из 5). В дальнейших экспериментах особенности автоматической активности изучали при действии НА в концентрации 10 мкМ (в отдельных сериях экспериментов НА при действии в концентрации 10 мкМ вызывал спонтанные ПД в 100% случаев).

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. Частота возникновения автоматической активности обоих типов была практически одинакова (12 из 22 и 10 из 22 случаев, $p(F) > 0.1$).

В случае залповой активности периоды («залпы»), в течение которых наблюдались спонтанные ПД, чередовались с периодами покоя. Длительность залпов спонтанных ПД варьировала от 10 до 140 с (в среднем, 54 ± 15 с, $n=12$). Количество ПД в пачке также имело широкий диапазон значений: от 33 до 348 (в среднем 125 ± 37). Продолжительность периодов покоя между залпами составила 44 ± 12 с, а максимальная частота следования ПД в залпе составляла $4,3 \pm 0,5$ Гц и приходилась на период залпа с наименее негативным значением ПП.

Максимальное значение скорости деполяризации (скорости фронта) спонтанных ПД (dV/dt_{max}) варьировало в широком диапазоне и, кроме того, зависела от «положения» ПД в залпе. (Рис. 4.2.9, 4.2.10). В среднем величина dV/dt_{max} составляла 15 ± 4 В/с (что в 20-40 раз ниже значения, характерного для электрически вызванных ПД в рабочем миокарде предсердий и миокарде легочных вен), однако могла быть равной и 1 В/с. Значение dV/dt_{max} , как правило, увеличивалось к моменту окончания залпа спонтанных ПД.

Залп спонтанных ПД начинался при наиболее положительном значении потенциала покоя, который составлял -63 - -56 мВ (-59 ± 4 мВ, $n=12$). Периоды спонтанной активности характеризовались постепенной гиперполяризацией ПП (Рис. 4.2.8). В момент окончания последнего ПД в «залпе» ПП имел наиболее отрицательное значение (-66 ± 5 мВ). В отдельных случаях ПП к моменту окончания залпов достигал -70 - -75 мВ ($n=2$, Рис. 4.2.10). Периоды покоя между залпами спонтанных ПД, таким образом, сопровождалась медленной деполяризацией мембранного потенциала. Окончание залпа ПД, очевидно, связано с тем, что ПП становится отрицательнее некоего критического уровня.

Первые и последние спонтанные ПД в залпе могли сопровождаться постдеполяризациями. Следует отметить, что в ходе залпов активности в интервалах между отдельными спонтанными ПД потенциал покоя не оставался стабильным: наблюдалась медленная деполяризация ПП, которая могла иметь различную крутизну и динамику.

Следует также указать, что в части экспериментов ($n=5$) при залповом типе активности в течение периодов времени, предшествующих залпам ПД, наблюдали низкоамплитудные («подпороговые», $3,5 \pm 1,5$ мВ), медленные, повторяющиеся колебания мембранного потенциала, имевшие время затухания 80 ± 18 мс (Рис. 4.2.8). Эти колебания имеют характеристики, типичные для пассивных изменений мембранного потенциала, вызываемых периодической активацией ионного обменника NCX в результате циклического повышения $[Ca^{2+}]_i$.

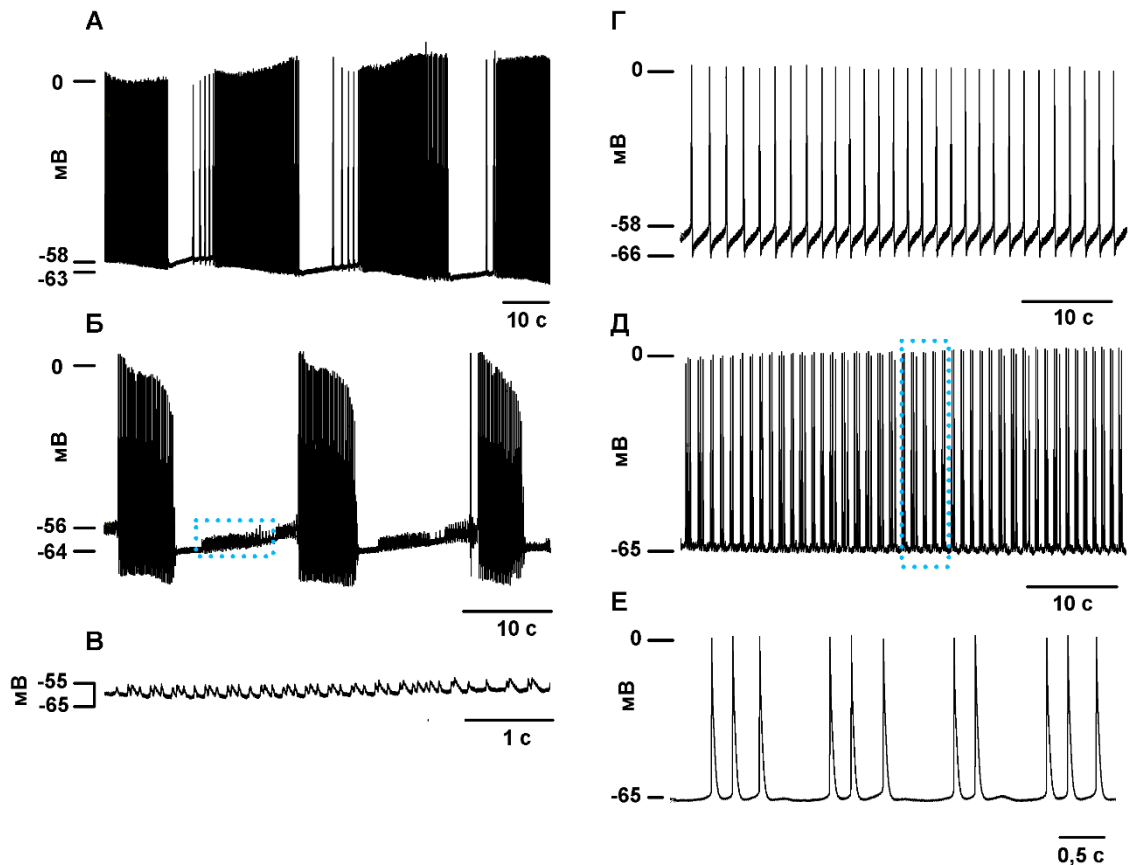


Рис. 4.2.8. Репрезентативные примеры различных типов спонтанной (автоматической) активности в легочных венах крысы, вызываемых норадреналином. **А. Б.** Автоматическая активность залпового характера. **В.** Низкоамплитудные колебания мембранного потенциала, предшествующие залпам спонтанных ПД. **Г, Д.** Автоматическая активность регулярного характера. **Е.** Отдельные ПД и колебания интервалов между спонтанными ПД при автоматической активности регулярного характера.

В случае регулярной автоматической активности спонтанные ПД возникали в фазу деполяризации при ПП -60 - -55 мВ и следовали непрерывно (перманентно) с равными, либо меняющимися интервалами (Рис. 4.2.8.Е) в течение всего периода действия НА, а также в течение 15 ± 6 мин после прекращения его действия (Рис. 4.2.8. Г, Д). Частота спонтанных ПД при регулярном типе активности составляла $3 \pm 0,5$ Гц ($n=10$). Значения ДПД90% и ДПД50% для спонтанных ПД при таком типе активности составили 48 ± 7 мс и 23 ± 5 мс, соответственно. Потенциал покоя при регулярном типе активности составлял -67 ± 5 мВ.

Только в половине случаев спонтанные потенциалы действия имели фазу медленной диастолической деполяризации (МДД). В части случаев ($n=4$) спонтанные ПД возникали при стабильном ПП в интервалах между спонтанными ПД.

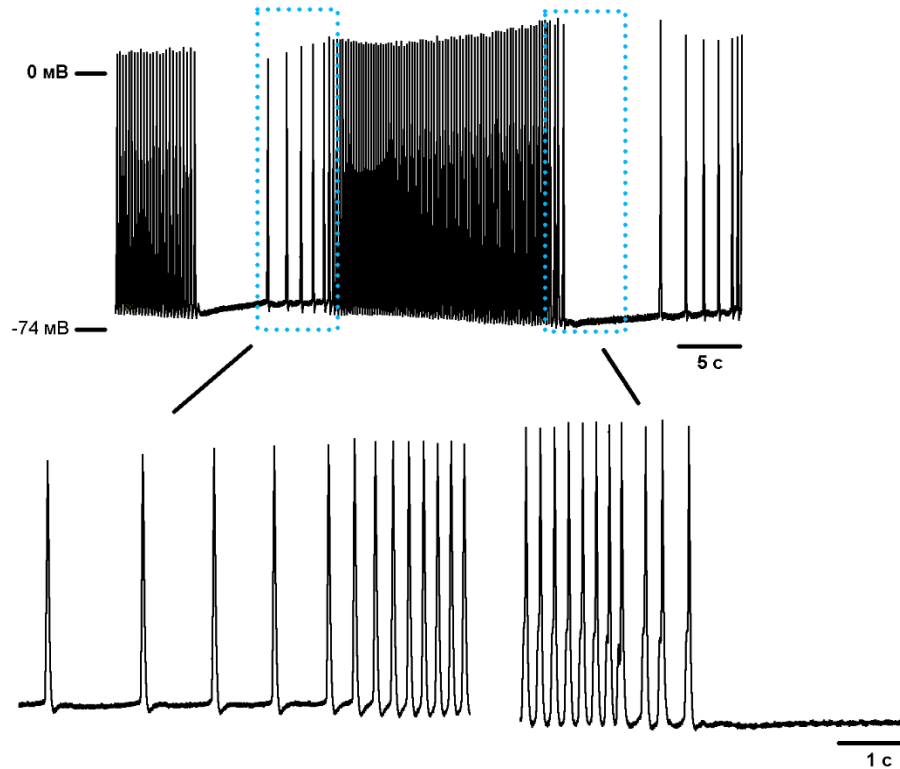


Рис. 4.2.9. Репрезентативный пример записи спонтанной (автоматической) активности залпового характера в легочных венах крысы, вызываемой норадреналином. Показаны спонтанные ПД, типичные для начальных моментов и моментов окончания залпа.

Залповая активность и конфигурация спонтанных ПД, вызванных норадреналином, при действии блокаторов α - и β -адренорецепторов в легочных венах крысы

Блокада α -1- или β -адренорецепторов приводит к изменению параметров автоматической активности залпового типа, вызванной норадреналином в легочных венах крысы. Следует также отметить, что ни при действии празозина, ни при действии пропранолола не происходило немедленного прекращения автоматической активности, вызванной норадреналином.

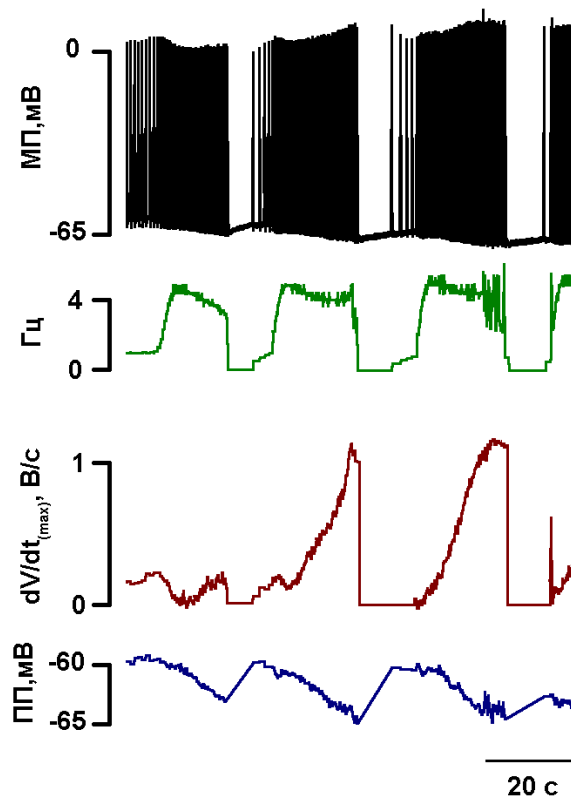


Рис. 4.2.10. Репрезентативный пример записи спонтанной (автоматической) активности в легочных венах крысы залпового характера, вызываемой норадреналином. Показан характер и величины изменений частоты спонтанных ПД в залпе, скорости нарастания фронта спонтанных ПД и потенциала покоя в ходе залпов автоматической активности.

Празозин (5 мкМ, $n=5$), селективный блокатор альфа-1-адренорецепторов, вызывает преобразование автоматической активности залпового типа в регулярную автоматическую активность (Рис. 4.2.11. А). Такое изменение сопровождается гиперполяризацией ПП (до -77 ± 3 мВ) и снижением частоты следования спонтанных ПД (до $3,4\pm 0,15$ Гц) (Рис. 4.2.11. В, Г). Кроме того, при действии празозина на фоне НА увеличивается скорость нарастания фронта спонтанных ПД (до 40 ± 5 В/с, Рис. 4.2.11. Д).

Блокатор бета-адренорецепторов пропранолол (5 мкМ, $n=5$) вызывает увеличение частоты следования залпов спонтанных ПД, вызванных 10 мкМ норадреналина, хотя средняя частота спонтанных ПД при этом снижается (до $1,8\pm 0,2$ Гц). Кроме того, потенциал покоя сдвигается к менее негативным значениям (-56 ± 4 мВ), а скорость нарастания фронта спонтанных ПД в присутствии пропранолола существенно уменьшается ($1,7\pm 0,2$ В/с). В присутствии блокатора бета-адренорецепторов спонтанные ПД, вызванные НА, приобретают конфигурацию, характерную для пейсмекерного миокарда сердца.

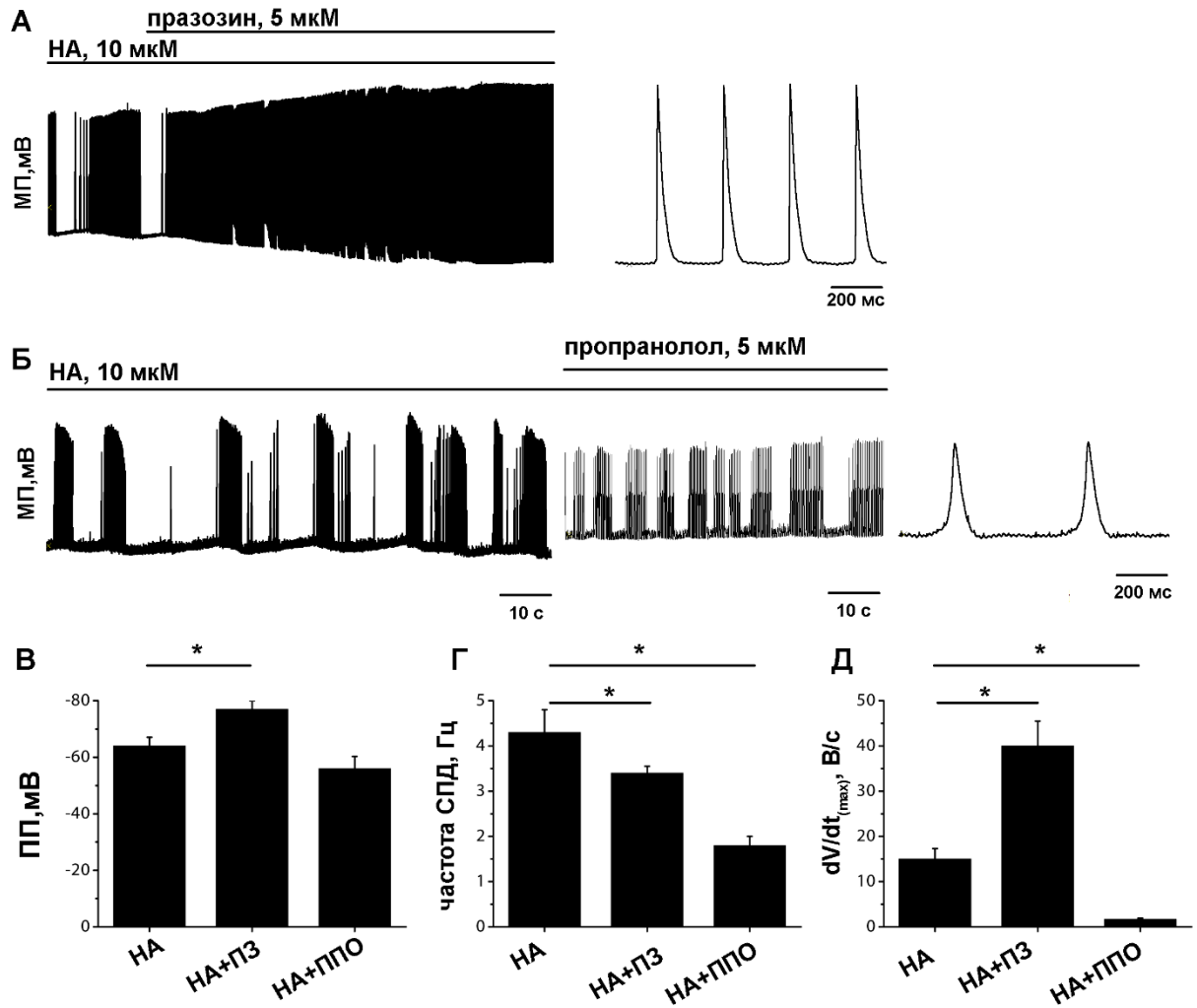


Рис. 4.2.11. Влияние селективных блокаторов альфа-1- или бета-адренорецепторов на автоматическую активность и характеристики спонтанных ПД, вызванных норадреналином в легочных венах крысы. **А.** Репрезентативный пример изменения автоматической активности при действии блокатора альфа-1-адренорецепторов празозина (ПЗ). **Б.** Репрезентативный пример изменения автоматической активности при действии блокатора бета-адренорецепторов пропранолола (ППО). **В-Д.** Потенциал покоя, частота спонтанных ПД (СПД), а также максимальная скорость нарастания фронта спонтанных ПД при действии норадреналина (НА), НА на фоне празозина или пропранолола.

Залповая активность, вызванная норадреналином, при действии агентов, влияющих на «круговорот» цитоплазматического кальция в легочных венах

Типичным эффектом при активации адренорецепторов норадреналином является «мобилизация» внутриклеточного кальция. Иными словами, норадреналин приводит к повышению уровня и амплитуды колебания цитоплазматического кальция – $[Ca^{2+}]_i$. Норадренергические механизмы «мобилизации» кальция связаны с активацией множества внутриклеточных и мембранных белков и ферментов, участвующих в «круговороте» кальция. Ключевыми ферментами «кальциевого» круговорота являются рианодиновые рецепторы (RyR), а также мембранные натрий-кальциевые обменники (NCX), связывающие

концентрацию $[Ca^{2+}]_i$ и биоэлектрическую активность. Блокатор RyR рианодин, а также блокатор NCX бензамил гидрохлорид гидрат («бензамил») были использованы для того, чтобы выявить вовлеченность круговорота цитоплазматического Ca^{2+} в автоматической активности легочных вен, вызываемой норадреналином.

При действии бензамила (10 мкМ) характер залповой активности, вызванной НА в легочных венах существенно изменяется. Эти изменения выражаются в существенном увеличении длительности залпов спонтанных ПД (от 36 ± 15 с до 48 ± 15 в данной серии экспериментов, $n=5$) одновременно со снижением максимальной (от $5,1 \pm 1,9$ до $1,4 \pm 0,4$ Гц, $p(T) < 0.05$) и средней частоты спонтанных ПД в залпе (Рис. 4.2.12).

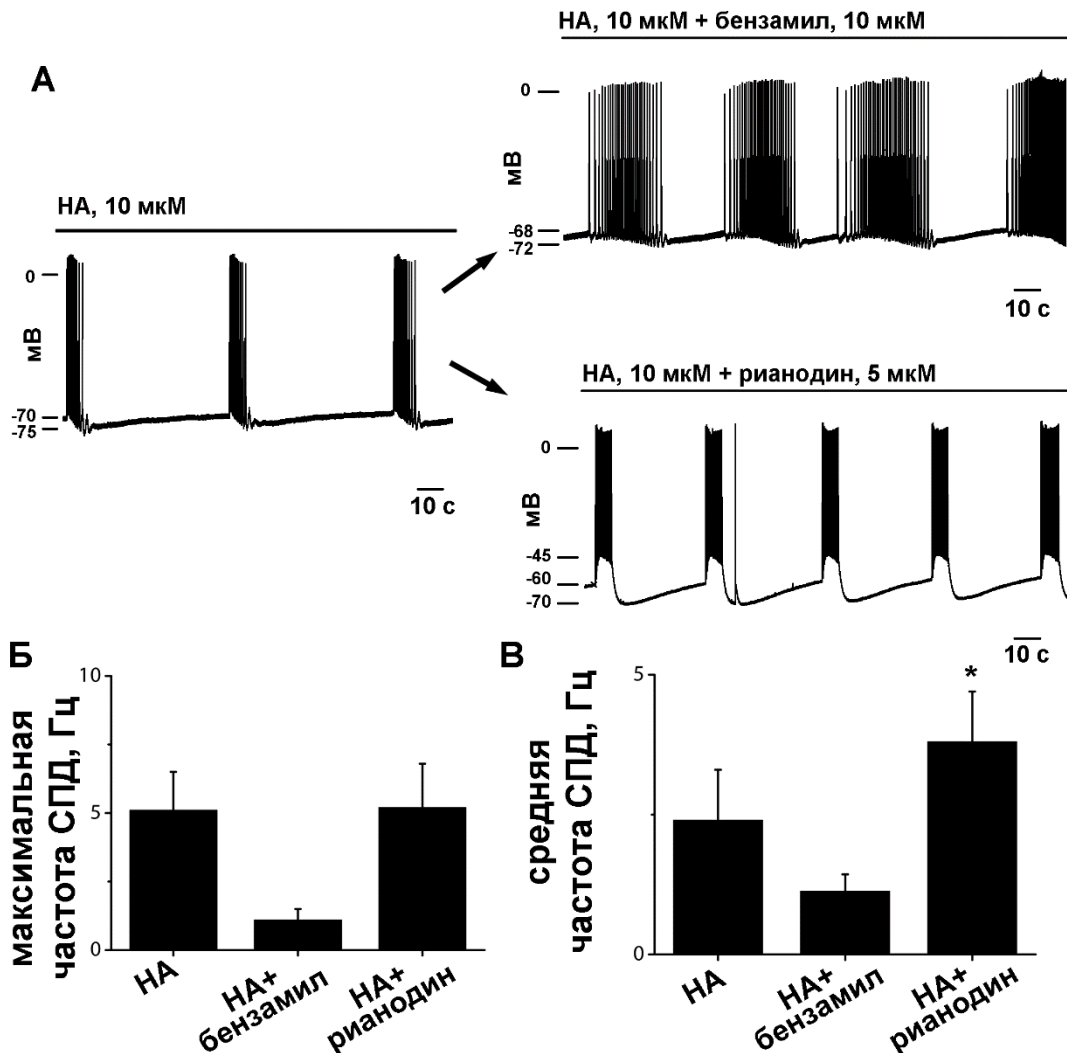


Рис. 4.2.12. Влияние селективных блокаторов рианодиновых рецепторов (RyR) и натрий-кальциевого обменника (NCX) на автоматическую активность, вызванную норадреналином (НА) в легочных венах крысы. **А.** Репрезентативные примеры автоматической активности залпового характера при действии норадреналина, а также при действии НА на фоне бензамила (ингибитора NCX, *сверху*) либо рианоидина (5 мкМ, блокирующая концентрация для RyR, *снизу*). **Б.** Максимальная частота спонтанных ПД в залпе при действии норадреналина НА, НА на фоне бензамила или рианоидина. **В.** Тоже, что на Б, но для средней частоты в залпе.

Рианодин также вызывает заметные изменения характера залповой активности в легочных венах. Частота следования залпов при действии рианодина (5 мкМ) увеличивается, и, кроме того, увеличивается средняя частота следования спонтанных ПД в залпе (от $2,4 \pm 1$ до $3,7 \pm 1,2$ Гц, $p(T) < 0.05$, $n=5$, Рис. 4.2.12). Таким образом, бензамил и рианодин, подавляя активность NCX и RyR, разнонаправлено влияют на спонтанную активность, индуцированную норадреналином, что доказывает важную роль $[Ca^{2+}]_i$ в реализации этой активности.

Влияние режима возбуждения на автоматическую активность, индуцированную норадреналином, в легочных венах

В режиме стационарной ритмической стимуляции/возбуждения ткани легочных вен на фоне 10 мкМ норадреналина автоматическая активность не обнаруживается. Однако, прекращение стимуляции/возбуждения демаскирует способность легочных вен к автоматической активности. Автоматическая активность, преимущественно регулярного типа индуцируется в течение $1 \pm 0,5$ мин после прекращения стимуляции ($n=5$, Рис. 4.2.13, *слева*). Возобновление режима стимуляции/возбуждения легочных вен с частотой, лишь незначительно превышающей (3,3 Гц) частоту спонтанных ПД (3,05 Гц), приводит к подавлению автоматии и установлению стационарного навязываемого ритма ПД (Рис. 4.2.13, *справа*). Возобновление режима стимуляции/возбуждения и установление навязываемого ритма сопровождается быстрым смещением потенциала покоя к уровню, характерному для рабочего миокарда (-77 ± 3 мВ) и увеличением скорости фронта деполяризации ПД (280 ± 30 В/с). Таким образом, источник возбуждения, имеющий большую частоту, чем частота спонтанных ПД в ЛВ, «перехватывает» активацию легочных вен и «переключает» режим биоэлектрической активности в миокарде легочных вен.

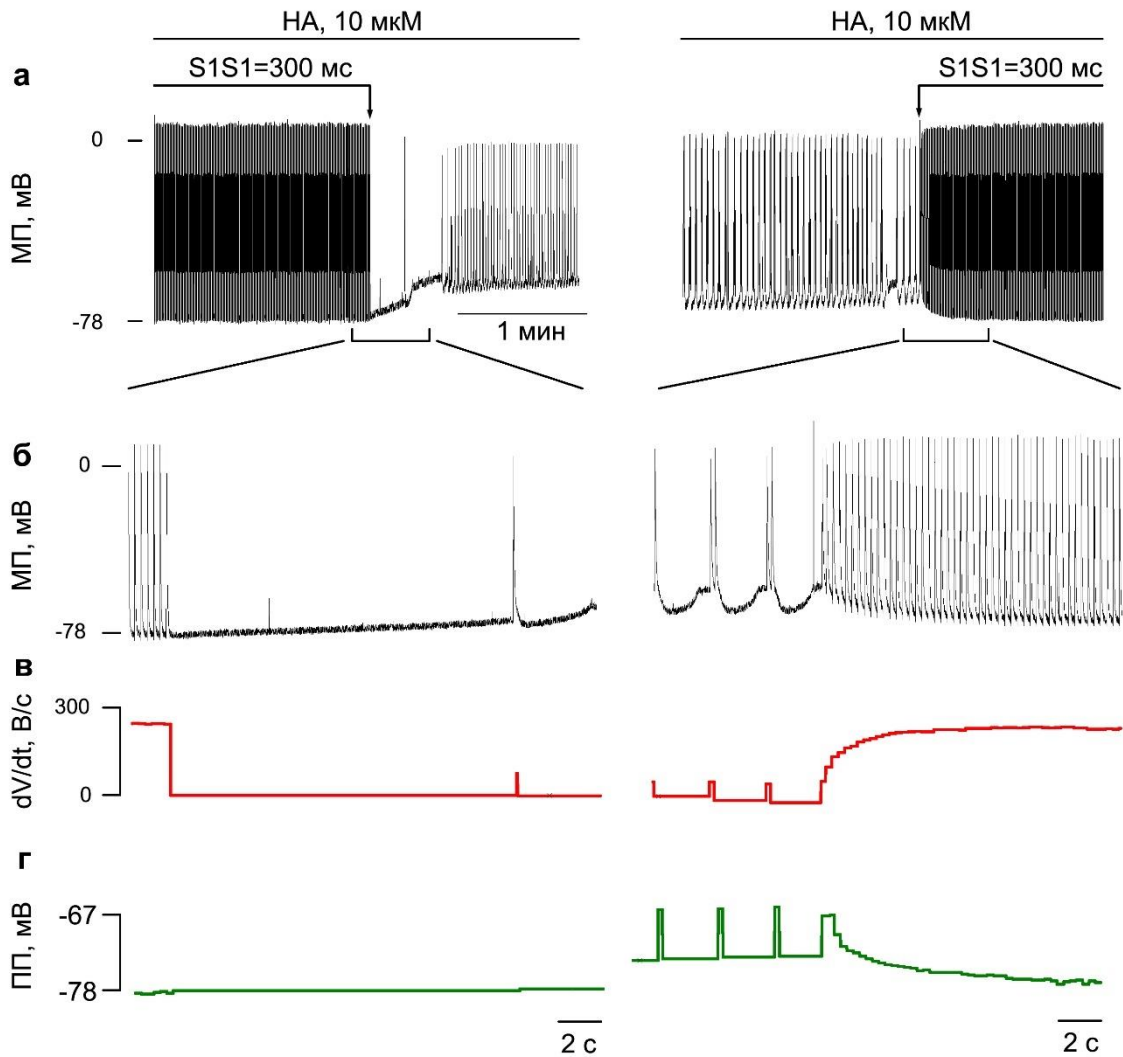


Рис. 4.2.13. Влияние электрической стимуляции на характер биоэлектрической активности в легочных венах при действии норадреналина. **а.** «Демаскировка» норадренергической автоматической активности в легочных венах после прекращения стационарной ритмической стимуляции/возбуждения (S1S1) ткани (слева). Возобновление стимуляции приводит к восстановлению активации легочных вен в стационарном ритме, переключению типа активности и подавлению автоматии (справа). **б.** То же, что и в **а**, но для моментов прекращения и возобновления электрической стимуляции. **в-г.** Изменение потенциала покоя и скорости нарастания фронта ПД при изменении режима стимуляции.

4.2.1.5. Эффекты активации β -адренорецепторов в миокарде легочных вен крыс

Влияние активации β -адренорецепторов на электрически вызванные ПД в миокарде легочных вен

Как и в предсердном миокарде, в миокарде легочных вен агонист β -адренорецепторов изопротеренол вызывает изменение конфигурации электрически вызванных ПД. Изопротеренол (1 мкМ) вызывает в легочных венах уменьшение ДПД90% на $36 \pm 4\%$ (от 72 ± 4 до 48 ± 4 мс в данной серии экспериментов, $n=6$), что существенно

больше, чем в предсердном миокарде ($8 \pm 2\%$). Изопротеренол также вызывает гиперполяризацию ПП (от -75 ± 4 до -83 ± 2 мВ, $p(T) < 0.05$, $n=6$) в легочных венах. Столь значительная гиперполяризация при действии ИЗО обусловлена изначально меньшим ПП (Рис. 4.2.14). Блокатор адrenoрецепторов бета-1 типа пропранолол (1 мкМ) подавлял влияние изопротеренола на ДПД90% и ПП в легочных венах.

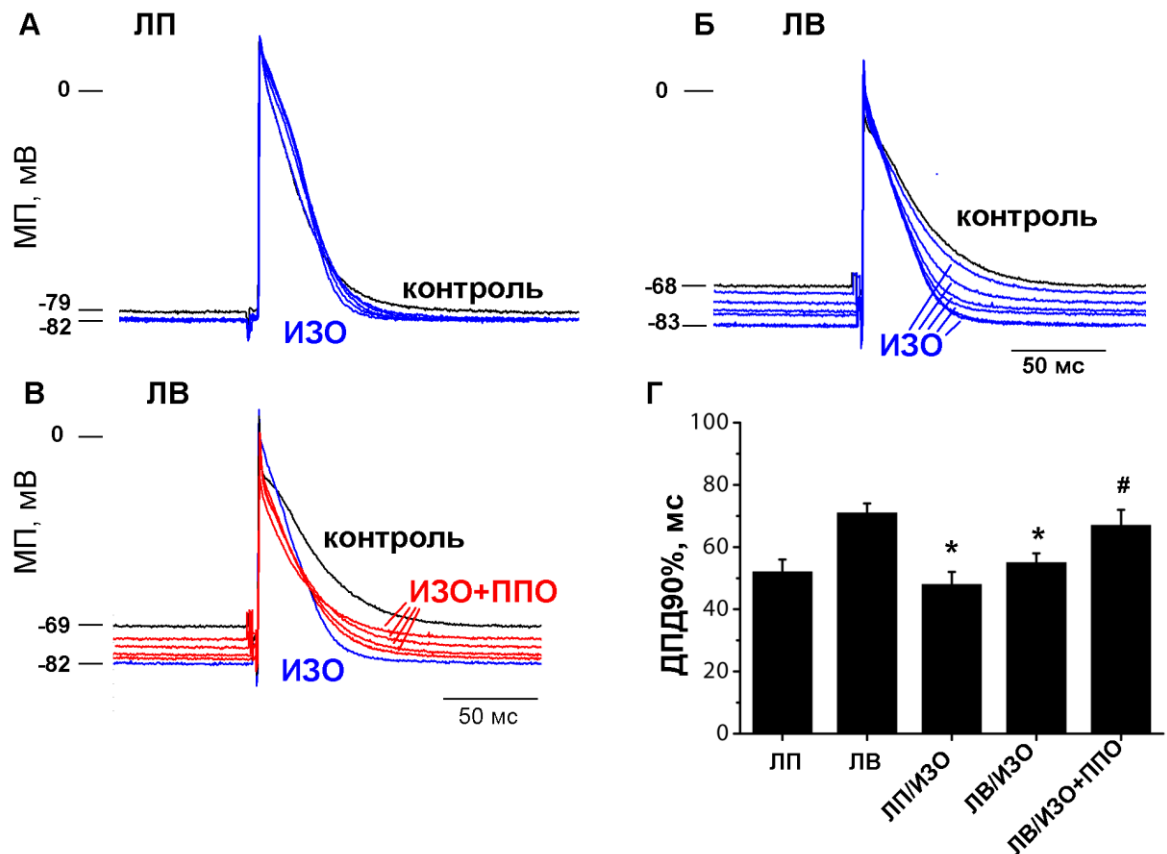


Рис. 4.2.14. Влияние агониста бета-адренорецепторов изопротеренола на электрически вызванные ПД и потенциал покоя в легочных венах (ЛВ) и левом предсердии (ЛП) крысы. **а.** Репрезентативные примеры ПД в контрольных условиях и при действии 1 мкМ изопротеренола (ИЗО) в левом предсердии. **б.** Репрезентативные примеры ПД в контрольных условиях и при действии 1 мкМ ИЗО в легочных венах. **в.** Репрезентативные примеры ПД в контрольных условиях, при действии 1 мкМ ИЗО и блокатора адrenoрецепторов бета-1 типа пропранолола (ППО, 1 мкМ) в легочных венах. **г.** Длительность ПД в ЛВ и ЛП на уровне 90% реполяризации (ДПД90%) при действии ИЗО, или ИЗО на фоне ППО. *, # - $p < 0.05$ (двухфакторная ANOVA).

Влияние активации β -адренорецепторов на потенциал покоя в миокарде легочных вен

Влияние активации бета-адренорецепторов было протестировано в покоящемся миокарде ЛВ, для которого характерен менее негативный ПП, чем в предсердном миокарде. Изопротеренол, как и АЦХ, дозозависимо вызывает гиперполяризацию в таких условиях в легочных венах (Рис. 4.2.15). Величина гиперполяризации, вызванной ИЗО, оказывается

большой в миокарде ЛВ, чем в предсердном миокарде. В концентрации 5 мкМ (n=15) ИЗО вызывает сдвиг ПП в ЛВ на 9 ± 2 мВ, в предсердном миокарде на 5 ± 2 мВ (n=5). Следует отметить, что ни в одном из экспериментов ИЗО, в отличие от норадреналина, не вызывал спонтанных ПД, автоматической активности в легочных венах.

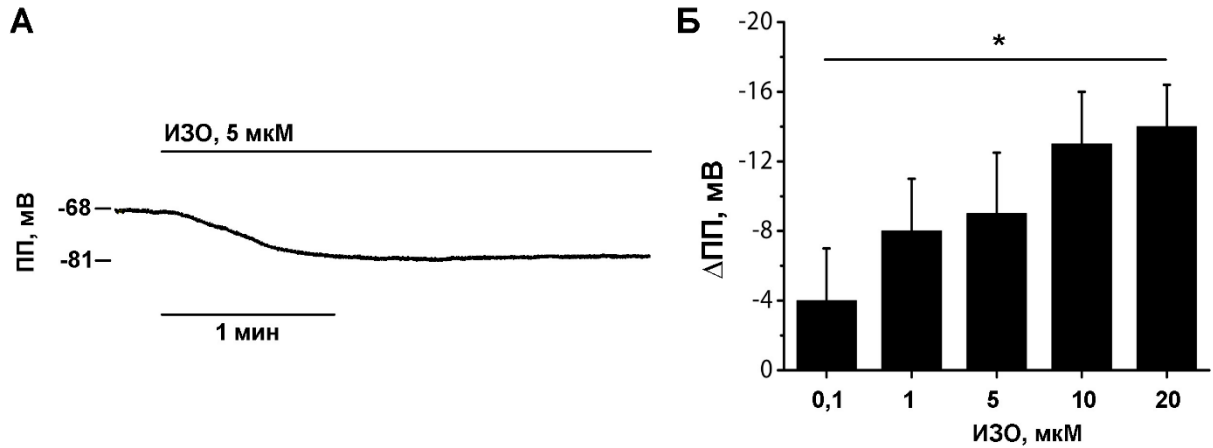


Рис. 4.2.15. Влияние изопротеренола (ИЗО) на ПП в покое миокарде легочных вен. **А.** Репрезентативная запись, отражающая гиперполяризацию ПП при действии ИЗО в легочных венах. **Б.** Дозозависимость влияния ИЗО на ПП в легочных венах. * - $p < 0.05$ (однофакторная ANOVA).

Восстановление возбудимости в легочных венах при активации β -адренорецепторов

В некоторых препаратах (n=4) ПП в миокарде ЛВ при прекращении стимуляции сдвигался до -55 - -45 мВ. В таких препаратах возобновление стимуляции (длительностью до 5 мин) не приводит к гиперполяризации и к активному ответу (ПД), т.е. миокард ЛВ оказывается невозбудимым. ИЗО (1 мкМ) в таких препаратах приводит к восстановлению возбудимости миокарда ЛВ. При этом в течение 1-2 минут происходит сдвиг ПП от -45- -50 мВ до -82 ± 2 мВ (до контрольного значения). При восстановлении возбудимости наблюдается постепенный переход от пассивного ответа, вызванного электрическими стимулирующими импульсами, к ПД с медленным фронтом, а затем к ПД с быстрым фронтом. После восстановления возбудимости значения параметров биоэлектрической активности (скорость нарастания фронта ПД, ДД90%) совпадают с таковыми, наблюдающимися при действии 1 мкМ ИЗО в «контрольных» т.е. ритмически возбуждаемых препаратах (Рис.4.2.16).

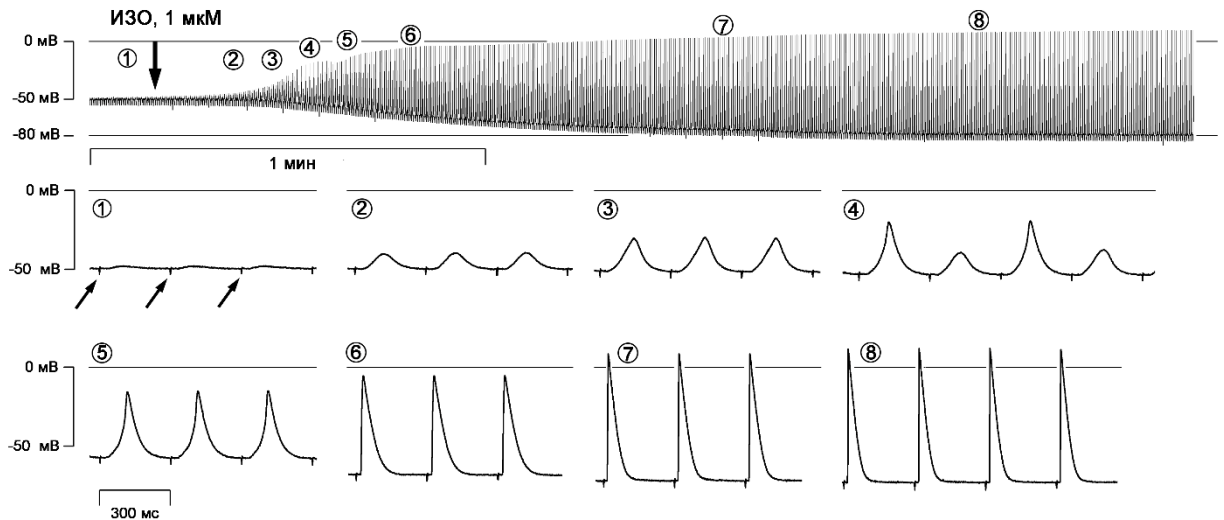


Рис. 4.2.16. Изопротеренол вызывает гиперполяризацию и восстановление возбудимости в миокарде ЛВ крысы. 1 – показана исходная невозбудимость (отсутствие ответа на стимуляцию, наблюдающееся после периода покоя), 2–5 медленный ответ при стимуляции во время начальной фазы действия ИЗО, 6–8 ПД с быстрым фронтом, что характерно для работающего препарата. Вертикальная стрелка – момент начала действия ИЗО. Наклонными стрелками показаны артефакты стимуляции.

Влияние атропина на эффекты агониста β -адренорецепторов изопротеренола в миокарде легочных вен

Изопротеренол вызывал в легочных венах эффекты (гиперполяризацию, снижение ДПД90%) сходные с таковыми для ацетилхолина. Можно предположить, что эффекты ИЗО являются косвенными, обусловленными не прямым его действием на рецепторы кардиомиоцитов, но либо активацией парасимпатических нервов, либо накоплением ацетилхолина в ткани легочных вен, вызываемым тем или иным способом. Для того чтобы исключить возможность косвенного действия ИЗО были проведены эксперименты с атропином. Сам по себе атропин не вызывал изменения ПП в покоящихся препаратах легочных вен. Атропин (1 мкМ) также не подавлял гиперполяризации, вызываемой 1-10 мкМ изопротеренола в легочных венах (Рис. 4.2.17). Таким образом, эффекты активации бета-адренорецепторов в легочных венах не связаны с действием ацетилхолина.

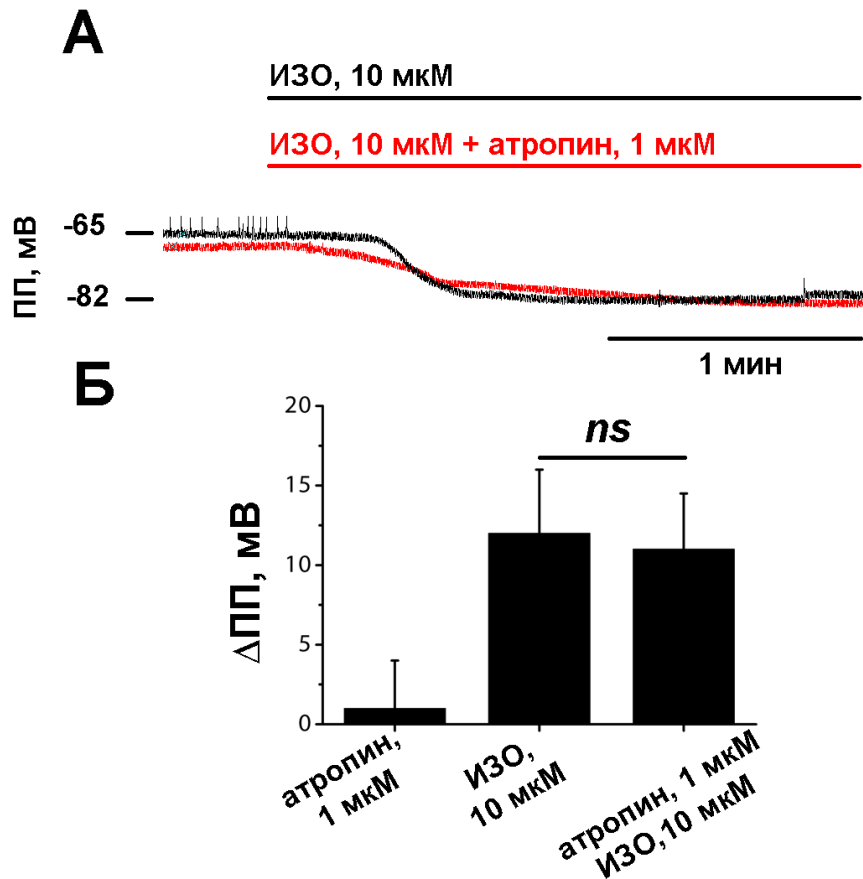


Рис. 4.2.17. Влияние атропина на гиперполяризацию, вызываемую агонистом бета-адренорецепторов изопроterenолом (ИЗО) в миокарде легочных вен. **А.** Репрезентативная запись гиперполяризации ПП при действии ИЗО или ИЗО на фоне атропина. **Б.** Величина гиперполяризации в легочных венах при действии атропина, ИЗО или ИЗО на фоне атропина. *ns*- незначимо ($p(U) > 0.05$).

Влияние бария на эффекты агониста β-адренорецепторов изопроterenолола в миокарде легочных вен

Как указано выше, активация бета-адренорецепторов приводит к гиперполяризации и уменьшению ДПД90% электрически вызванных потенциалов действия как в предсердном миокарде, так и в миокарде легочных вен. Барий подавляет эффекты агониста бета-адренорецепторов изопроterenолола. В левом предсердии 100 мкМ бария вызывают постепенный сдвиг ПП к более положительным значениям, чем в контрольных условиях ($-76 \pm 3,5$ мВ через 5 мин и -69 ± 3 мВ через 10 мин). Также Ba^{2+} в концентрации 100 мкМ вызывает увеличение ДПД90% (48 ± 4 мс при действии ИЗО, $n=5$; 55 ± 3 и 67 ± 7 мс при действии Ba^{2+} через 5 и 10 мин, соответственно, $n=5$) в предсердном миокарде.

В легочных венах барий также подавляет эффекты ИЗО, вызывая сдвиг ПП в сторону положительных значений и увеличение ДПД90% (Рис. 4.2.18). Сдвиг ПП при действии Ba^{2+} на фоне ИЗО более выражен в легочных венах (-71 ± 4 и -65 ± 3 мВ через 5 и 10 мин, соответственно, $n=5$), чем в предсердном миокарде. Однако, что более важно, барий на фоне

изопротеренола вызывает появление внеочередных ПД. Как сказано выше, изопротеренол при самостоятельном действии не вызывал спонтанных ПД ни в условиях стационарной стимуляции, ни в покоеющихся препаратах ЛВ. Этот эффект возникал в 4 экспериментах из 5. При этом внеочередные ПД возникают после электрически вызванных ПД (наподобие задержанных постдеполяризации, что особенно очевидно через 10 мин аппликации Ba^{2+}) и могут быть одиночными, либо следовать в виде залпов с высокой частотой (Рис.4.). Таким образом, барий на фоне изопротеренола индуцирует триггерную активность в легочных венах, но не в предсердном миокарде.

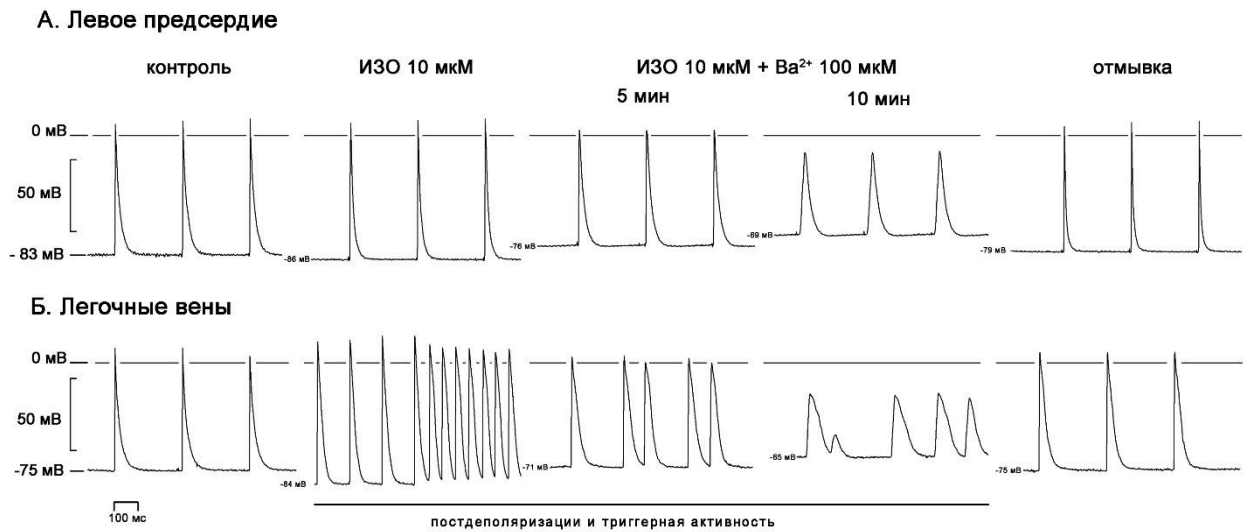


Рис. 4.2.18. Влияние бария на электрически вызванные ПД в левом предсердии и миокарде легочных вен крысы на фоне действия агониста бета-адренорецепторов изопротеренола (ИЗО). **А.** Левое предсердие. **Б.** Легочные вены.

Как и в условиях стационарной стимуляции, барий при одновременном действии с изопротеренолом приводил к положительному сдвигу ПП в покоещемся миокарде ЛВ и инициации спонтанной активности.

При действии Ba^{2+} (50 мкМ) и в миокарде ЛВ, и в предсердном миокарде наблюдалась деполяризация, которая составляла около 5 мВ. ПП в миокарде ЛВ стабилизировался на уровне -60 ± 4 мВ ($n = 5$, $p(T) < 0.05$), а в предсердном миокарде – на уровне -75 ± 2 мВ ($n = 5$, $p(T) < 0.05$).

При действии Ba^{2+} (50 мкМ) на фоне изопротеренола (5 мкМ) в предсердном миокарде ПП стабилизировался на уровне -72 ± 3 мВ ($n=5$); при этом наблюдались только единичные спонтанные ПД (Рис. 4.2.19). В миокарде легочных вен одновременное действие Ba^{2+} и ИЗО приводило к значимо ($p(U) < 0.05$, ЛВ vs ЛП) большему сдвигу ПП - до -50 ± 4 мВ ($n=5$). Деполяризация ПП в миокарде ЛВ сопровождалось возникновением единичных

спонтанных ПД, переходящих затем в залповую активность. Спонтанная активность, возникающая при совместном действии ИЗО и Ca^{2+} имела залповый, циклический характер. Залпы спонтанных ПД чередовались с периодами покоя. Первые ПД в залпах всегда сопровождалось ранними постдеполяризациями, последующие ПД имели вид характерный для пейсмекерных областей (медленная скорость фронта - 13 ± 5 В/с, наличие медленной «диастолической» деполяризации). Частота следования спонтанных ПД в залпе была непостоянной; наибольшая частота наблюдалась в начале залпа, что соответствовало наименее негативным значениям потенциала покоя (Рис. 4.2.20). Количество ПД в залпе составляло 60-140, а его длительность 45 ± 10 с.

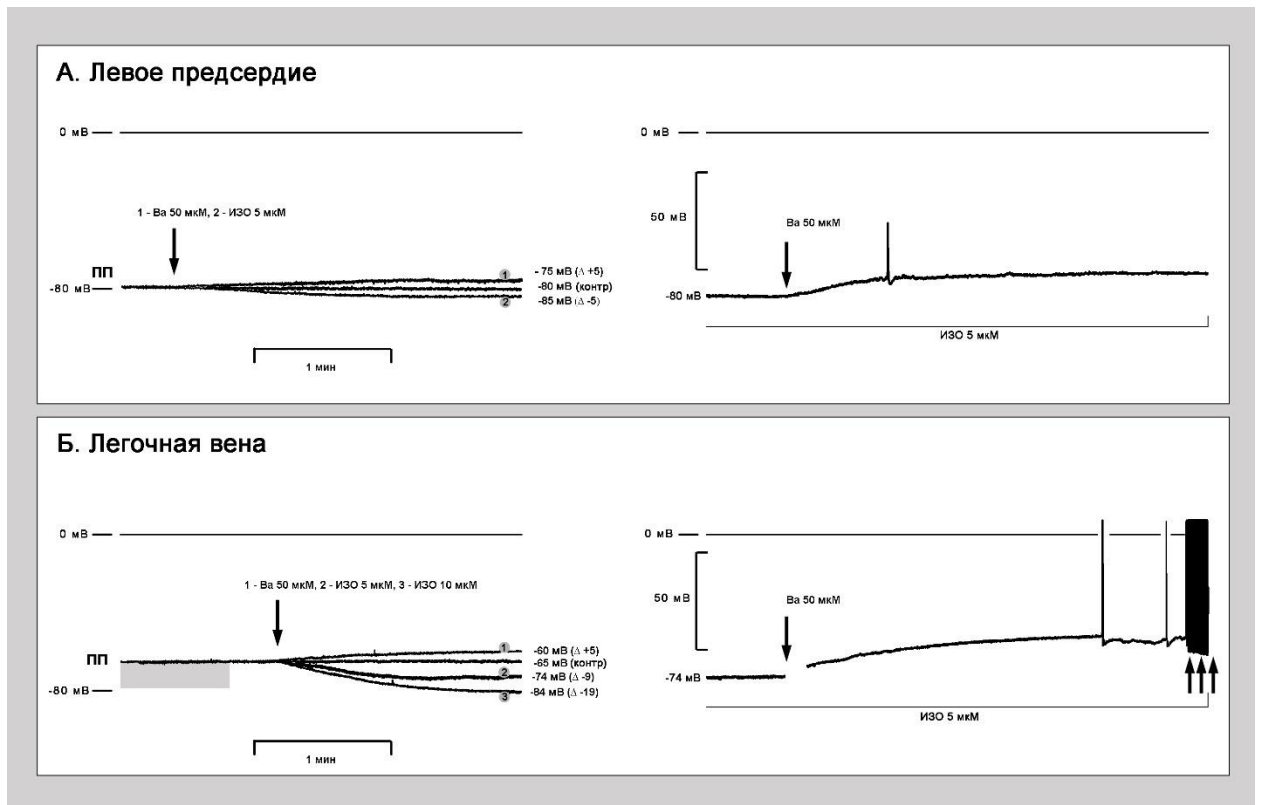


Рис. 4.2.19. Потенциал покоя в левом предсердии (А) и миокарде легочных вен (Б) крысы и его изменение при действии изопротеренола и Ca^{2+} . А – слева – ПП в миокарде левого предсердия в контроле, при действии 50 мкМ Ca^{2+} (1), 5 мкМ изопротеренола (2), справа – сдвиг ПП при одновременном действии изопротеренола и Ca^{2+} приводит к деполяризации до -72 мВ и возникновению единичных спонтанных возбуждений; Б – слева – ПП в миокарде легочных вен в контроле, при действии 50 мкМ Ca^{2+} (1), 5 (2) и 10 мкМ (3) изопротеренола. Серая область – разница в контрольном уровне ПП в миокарде левого предсердия и легочных вен. Справа – сдвиг ПП при одновременном действии изопротеренола и Ca^{2+} приводит к деполяризации до -50 мВ и инициации автоматической активности (указано стрелками).

Количество ПД в залпе составляло 60-140, а его длительность 45 ± 10 с. Наиболее негативный “диастолический” потенциал возрастает к концу пачки (от -55 ± 2 до 61 ± 2 мВ), таким образом период спонтанной активности сопровождается гиперполяризацией и

при достижении -60 – 63 мВ прекращается. Период покоя сопровождается постепенным сдвигом ПП до уровня -55 ± 2 мВ (т.е. деполяризацией), при достижении которого развивается следующая пачка спонтанных ПД. При удалении ИЗО и Ba^{2+} спонтанная активность прекращалась, а ПП достигал значения -65 мВ.

Таким образом, характер спонтанной активности при действии Ba^{2+} и ИЗО оказывался таким же, что наблюдали при действии норадреналина за исключением большого количества спонтанных ПД, сопровождаемых постдеполяризациями. Важно, что при самостоятельном действии Ba^{2+} вызывал деполяризацию в легочных венах, но не приводил к появлению спонтанных ПД.

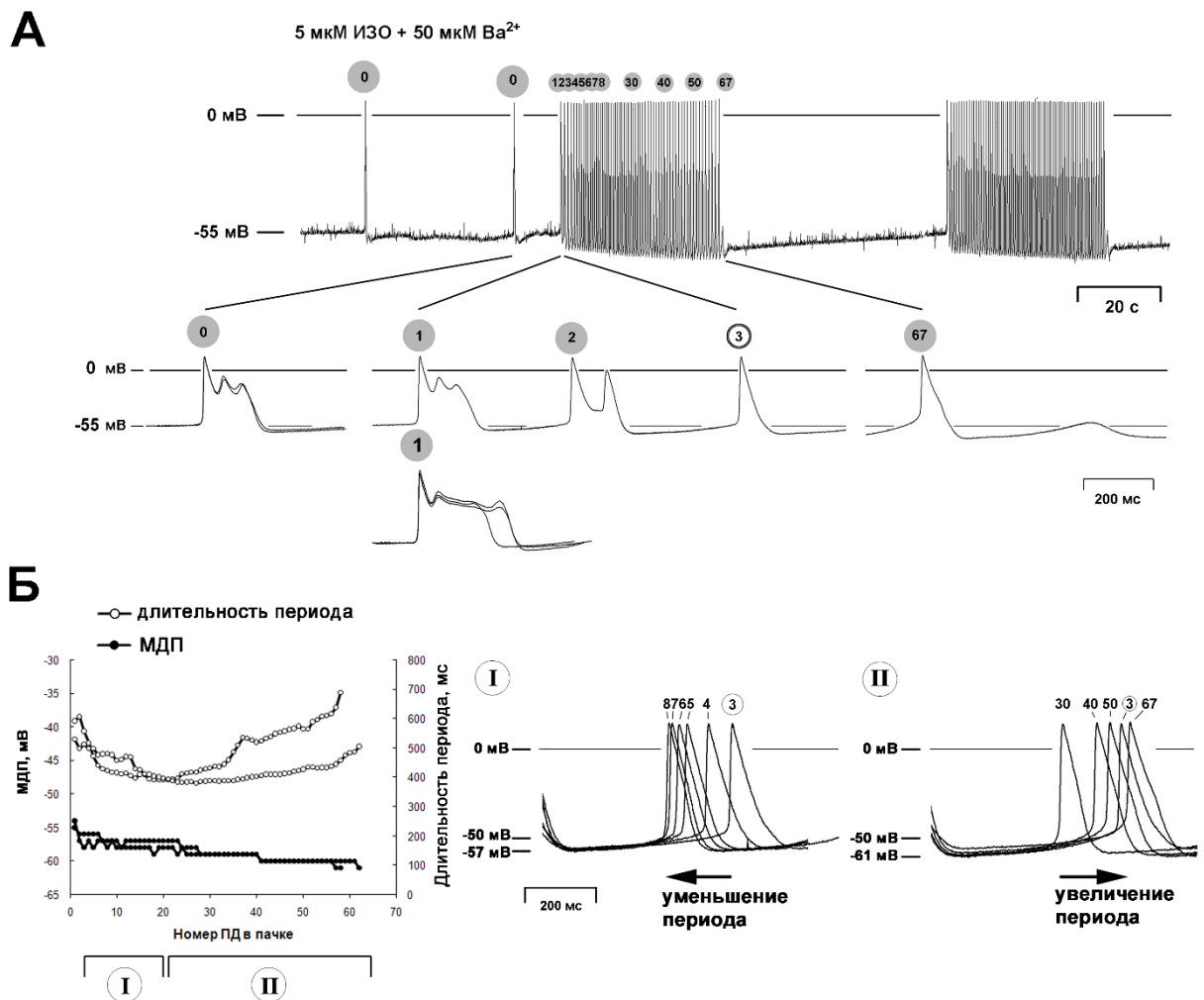


Рис. 4.2.20. Особенности спонтанной активности в миокарде легочных вен при действии изопротеренола и Ba^{2+} . **А.** Сверху – циклический характер спонтанной активности и изменения ПП: периоды спонтанной активности сопровождаются гиперполяризацией, период покоя сопровождается деполяризацией. Снизу - единичные ПД, предшествующие пачечной активности (0), первые ПД в пачке, сопровождаемые ранними постдеполяризациями (1 и 2), типичные пачечные ПД (3), последний ПД пачки (67). **Б.** Изменение ПП и частоты следования ПД в пределах одной пачки спонтанной активности (диаграмма слева). Пачка спонтанной активности состоит из двух фаз (I и II): сначала наблюдается укорочение длительности (I), а затем увеличение длительности периодов между ПД (II). МДП – максимальный диастолический потенциал.

Влияние агентов, регулирующих внутриклеточный баланс цАМФ, на потенциал покоя в легочных венах крысы

Внутриклеточный цАМФ является основным элементом и вторичным посредником внутриклеточного сигнального каскада бета-адренорецепторов. Цитоплазматическая концентрация цАМФ определяется скоростью его синтеза и деградацией аденилатциклазами (АЦ) и фосфодиэстеразами (ФДЭ), соответственно. Активация АЦ либо ингибирование ФДЭ приводит к повышению [цАМФ]_i, имитируя стимуляцию бета-адренорецепторов. Накопление цАМФ также может быть смоделировано применением модифицированных молекул цАМФ, обладающих устойчивостью к гидролизу.

Как и в случае с активацией β-адренорецепторов изопротеренолом, неспецифический ингибитор фосфодиэстераз IBMX (5 мкМ) вызывал гиперполяризацию ПП в покоем миокарде легочных вен крысы (Рис. 4.2.21). Следует отметить, что гиперполяризация при действии IBMX развивалась волнообразно. Тем не менее, через 6±1,5 (n=5) мин после начала действия IBMX ПП в легочных венах стабилизировался на уровне -81±2,5 мВ, что близко к значениям, наблюдаемым при действии ИЗО.

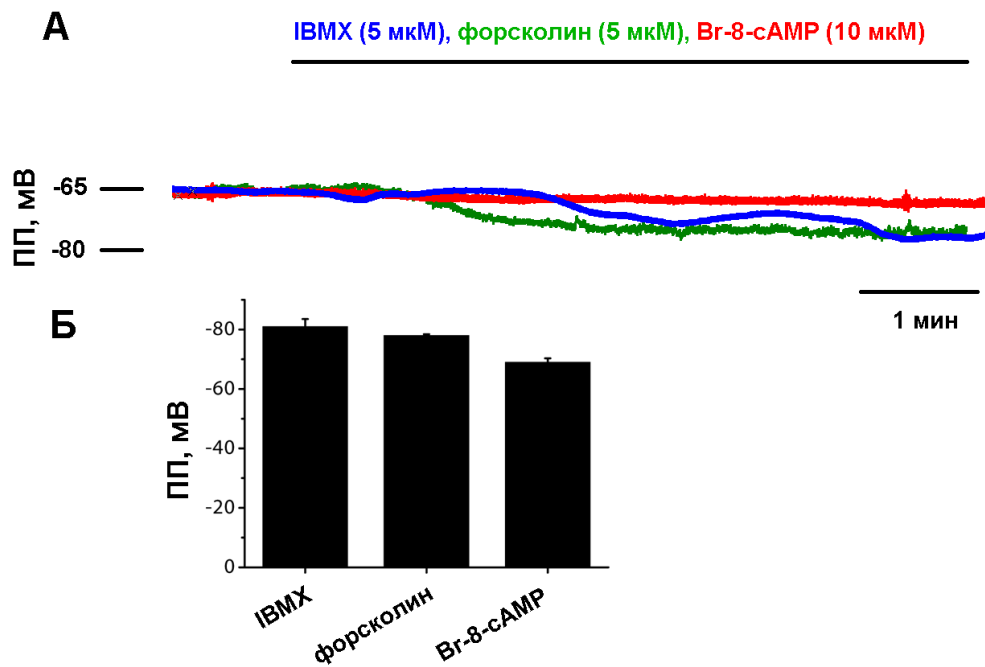


Рис. 4.2.21. Повышение цитоплазматической концентрации цАМФ приводит к гиперполяризации в легочных венах крысы. **А.** Репрезентативные записи ПП при действии ингибитора фосфодиэстераз IBMX, активатора аденилатциклазы форсколина и негидролизуемого аналога цАМФ – Bt-8-cAMP. **Б.** Величина потенциала покоя в легочных венах крысы через 5 мин после действия IBMX (n=5), форсколина (n=5), Bt-8-cAMP (n=5).

Неселективный активатор АЦ форсколин (5 мкМ) также приводил к гиперполяризации ПП в легочных венах, но гораздо быстрее, чем IBMX (Рис. 4.2.21). При

действии форсколина ПП стабилизировался на уровне $-78 \pm 0,6$ мВ ($n=5$). В дополнение, негидролизуемый аналог цАМФ – бромо-8-цАМФ вызывал в экспериментах с препаратами легочных вен медленную, но статистически значимую ($p(T) < 0.05$, $n=5$) гиперполяризацию ПП.

Таким образом, гиперполяризация ПП в покое миокарде легочных вен, вызываемая активацией бета-адренорецепторов, судя по всему, определяется элементами классического внутриклеточного сигнального каскада этих рецепторов и опосредуется повышением цитоплазматической концентрации цАМФ.

4.2.1.6. Эффекты активации $\alpha 1$ -адренорецепторов миокардиальных рукавов легочных вен крыс

Влияние фенилэфрина на потенциал покоя в легочных венах

Изменение потенциала покоя в покое миокарде легочных вен крысы, наблюдаемое при активации альфа-1-адренорецепторов, было противоположным таковому, наблюдаемому при активации бета-адренорецепторов. Селективный агонист альфа-1-адренорецепторов вызывал деполяризацию ПП (Рис. 4.2.22) дополнительно к спонтанному сдвигу ПП, возникающему после прекращения электрической стимуляции. 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 ($n=15$). Хотя в некоторых экспериментах ПП на фоне 10-20 мкМ ФЭ достигал -35 мВ. Следует отметить, что эффект ФЭ развивался гораздо медленнее, чем эффект изопротеренола: наибольшее изменение ПП наблюдали через 3-5 ($4 \pm 1,3$) мин после начала его действия. Таким образом, деполяризация, вызванная ФЭ, по моменту возникновения соответствует второй фазе эффекта, наблюдаемого при действии норадrenalина.

Следует отметить, что при действии ФЭ в концентрациях 0,1-20 мкМ спонтанной активности (т.е. залпов спонтанных ПД либо перманентно следующих ПД) в препаратах легочных вен не наблюдали ни в одном эксперименте. Таким образом, активация альфа-1-адренорецепторов является недостаточной для индукции автоматии в легочных венах.

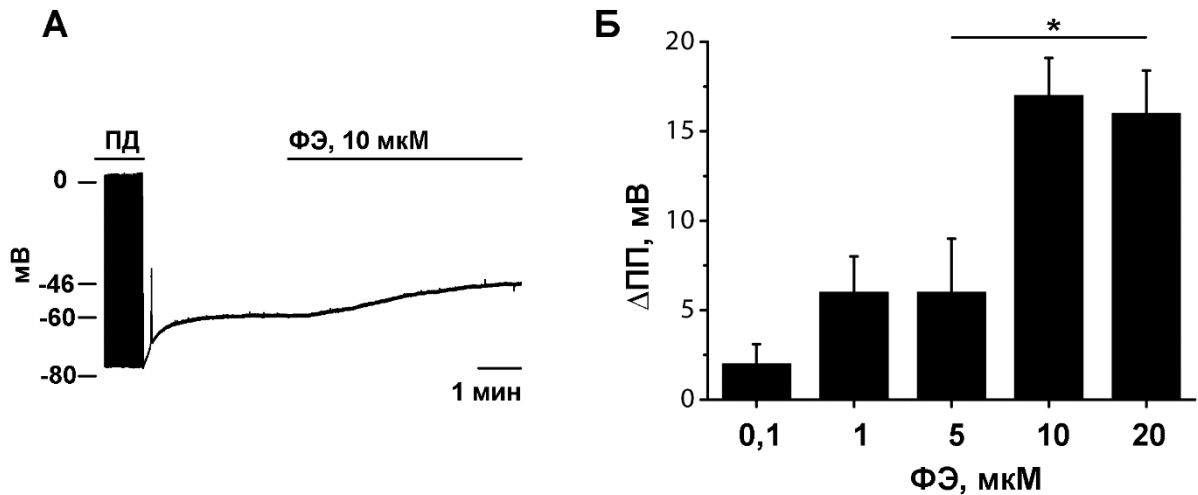


Рис. 4.2.22. Влияние агониста альфа-адренорецепторов фенилэфрина (ФЭ) на потенциал покоя (ПП) в легочных венах крысы. **А** Репрезентативная запись ПП после прекращения электрической стимуляции и при действии 10 мкМ ФЭ. Фенилэфрин вызывает деполяризацию от -60 до -46 мВ. **Б.** Дозозависимость влияния ФЭ на ПП в миокарде легочных вен. * - $p < 0.05$ (однофакторная ANOVA,).

Влияние фенилэфрина на электрически вызванные потенциалы действия в легочных венах

Активация α -1-адренорецепторов фенилэфрином (10 мкМ) приводила к существенному, статистически значимому, увеличению длительности электрически вызванных ПД в легочных венах (Рис. 4.2.23). Увеличение ДПД90% составляло $54 \pm 8\%$ ($n=6$). Таким образом, ДПД90% при действии ФЭ составляла 124 ± 11 мс, что является чрезвычайно большой величиной для ПД грызунов. Следует отметить, что ФЭ также вызывал увеличение длительности ПД в рабочем миокарде левого предсердия. Однако, в данной ткани сердца увеличение было меньшим, по сравнению с ЛВ (Рис. 4.2.23). Помимо ДПД90% фенилэфрин и в левом предсердии, и в легочных венах вызывал деполяризацию (измеряемого в течение 50 мс перед электрически вызванными ПД). Как и в случае с длительностью ПД, деполяризация ПП, индуцированная фенилэфрином, оказывается большей в легочных венах, чем в левом предсердии ($2 \pm 0,9$ и $5,4 \pm 0,91,3$ мВ, соответственно). Значимая деполяризация в легочных венах приводит к снижению скорости фронта и амплитуды ПД.

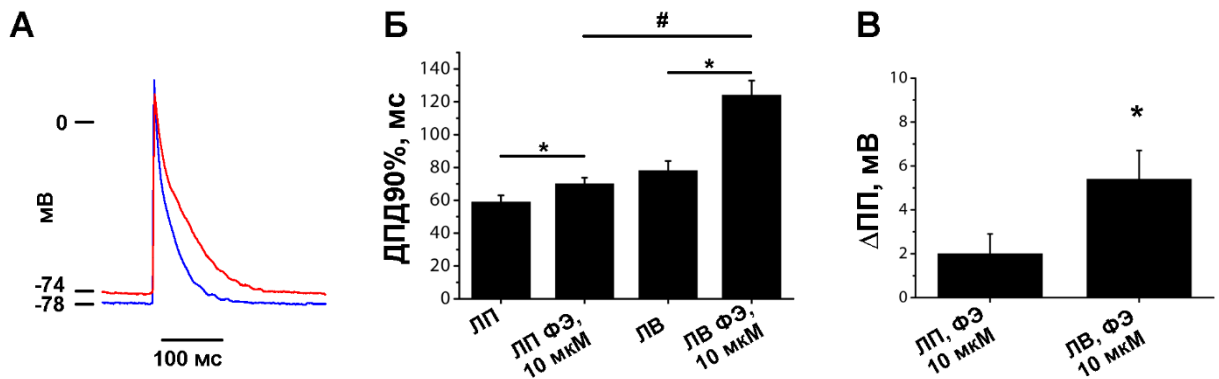


Рис. 4.2.23. Влияние агониста альфа-адренорецепторов фенилэфрина (ФЭ) на электрически вызванные ПД и потенциал покоя (ПП) при электрической стимуляции ($S1S1=300$ мс) миокарда легочных вен. **А.** Репрезентативные примеры электрически вызванных ПД в легочных венах крысы в контрольных условиях (синий) и после 5 мин действия 10 мкМ ФЭ (красный). **Б.** Длительность ПД (ДПД90%) в контрольных условиях и при действии 10 мкМ ФЭ в левом предсердии (ЛП) или легочных венах. *, # - $p < 0.05$ (двухфакторная ANOVA, $n=6$ для легочных вен, $n=5$ для левого предсердия). **В.** Величина деполаризации ПП при действии 10 мкМ ФЭ при постоянной электрической стимуляции в левом ($n=5$) предсердии и легочных венах ($n=6$). *- $p(U) < 0.05$.

4.2.1.7. Влияние стимуляции интрамуральных постганглионарных нервов на биоэлектрическую активность миокардиальной ткани легочных вен крысы

Высокочастотная стимуляция постганглионарных интрамуральных нервных окончаний (ПНС) в тканевых препаратах легочных вен крысы приводит к гиперполяризации потенциала покоя, а также уменьшению длительности ПД. Нанесение высокочастотных импульсов (100 Гц) приводит к гиперполяризации на 7 ± 3 мВ ($n=5$), которая развивается в течение $2 \pm 0,5$ мс (Рис. 4.2.24). Прекращение высокочастотной стимуляции приводит к восстановлению ПП к исходному уровню (-67 ± 5 мВ) в течение 10 ± 3 мс. Гиперполяризация, вызванная ПНС, развивается также в том случае, когда тканевые препараты предварительно перфузировали р-ром, содержащим пропранолол (1 мкМ) и прозалин (1 мкМ), то есть на фоне блокады адренорецепторов β -и $\alpha 1$ -типа. В таком случае гиперполяризация составляла 8 ± 3 мВ ($n=5$). Начало и окончание периода нанесения высокочастотных возбуждающих стимулов сопровождается возникновением потенциалов действия, что позволяет оценить влияние стимуляции интрамуральных нервов на ПД. Длительность ПД (ДПД90), возникающего в момент окончания стимуляции на $21 \pm 5\%$ ($n=5$) меньше, чем длительность «начального» ПД (Рис. 4.2.24.Г). Гиперполяризация ПП и уменьшение длительности ПД при стимуляции интрамуральных нервов в ЛВ обусловлены действием высвобождаемого из нервных окончаний ацелилхолина.

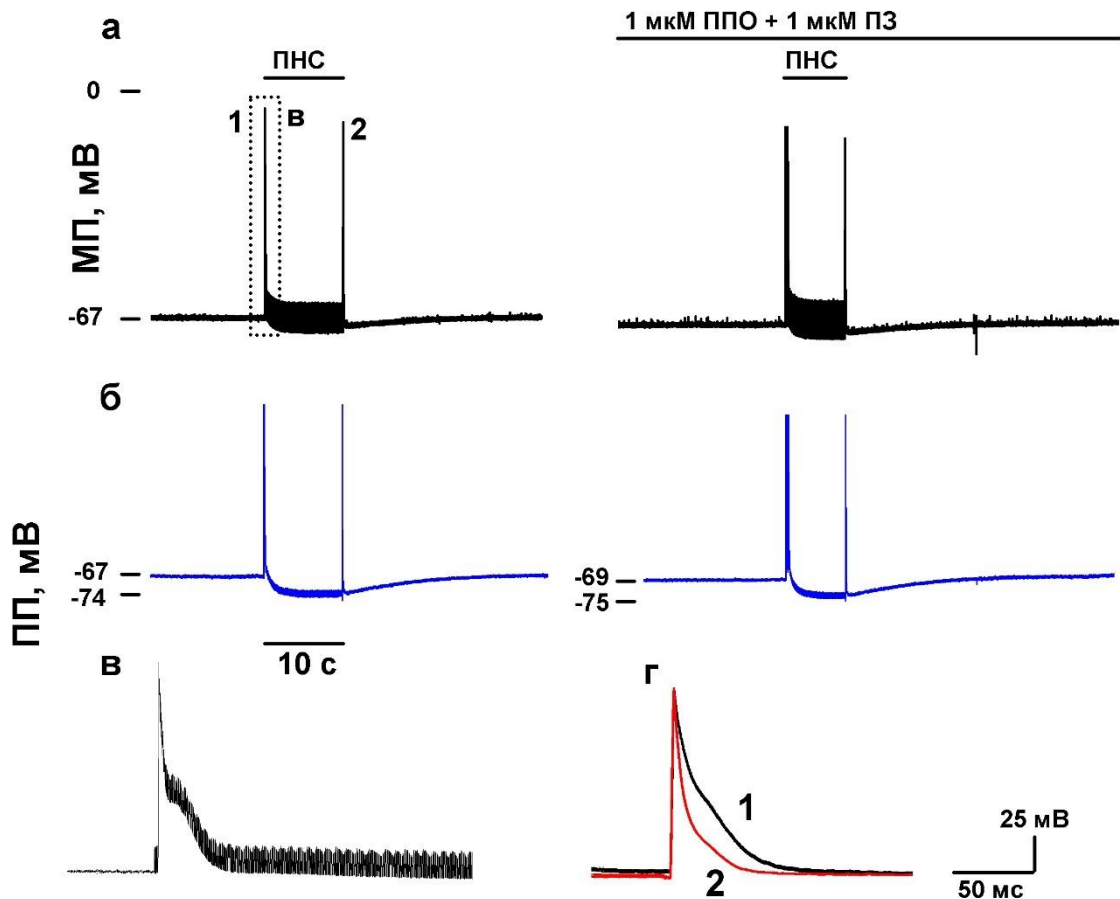


Рис. 4.2.24. Влияние активации интрамуральных постганглионарных нервов на потенциал покоя и потенциалы действия (ПД) в миокарде легочных вен крысы. **а.** Репрезентативные записи мембранного потенциала в моменты высокочастотной стимуляции постганглионарных нервов (ПНС) в контрольных экспериментах (слева), а также при блокаде адренорецепторов β - и α -типа пропранололом (ППО) и празозином (ПЗ). Начало и окончание периода нанесения высокочастотных возбуждающих стимулов сопровождается возникновением потенциалов действия: 1 и 2. **б.** Потенциал покоя в легочных венах в контроле и при стимуляции постганглионарных нервов. **в.** ПД в легочных венах, сопровождаемый стимуляционными артефактами (показано пунктиром на **а**). **г.** ПД в легочных венах в моменты, соответствующие началу (1) и окончанию (2) стимуляции постганглионарных нервов.

4.2.1.8. Роль пейсмекерного тока I_f в формировании биоэлектрической активности легочных вен крысы

Была предпринята попытка выяснить роль «пейсмекерного» тока I_f в формировании спонтанной активности в миокардиальных рукавах ЛВ крысы. Для этого использовали блокатор тока I_f ивабрадин. Ивабрадин (5 μ М, $n=8$) не оказывал существенного влияния на частоту следования потенциалов при медленной спонтанной активности, не изменял длительность периодов спонтанной активности и не вызывал дополнительного сдвига (дополнительной деполяризации, либо уменьшения деполяризации) мембранного потенциала при спонтанной активности в ЛВ крысы. Эффекты ивабрадина отсутствовали

при самостоятельном действии препарата, а также при действии на фоне альфа-адреномиметиков (норэпинефрин, фенилэфрин, 1 мкМ, n=6). Вероятно, ток I_f , характерный для синусного узла, не играет существенной роли в формировании спонтанной (автоматической) активности в миокардиальных рукавах ЛВ крысы.

Однако при навязанном ритме ивабрадин (5 мкМ) оказывает влияние на биоэлектрическую активность в легочных венах и левом предсердии крысы, а именно увеличивает длительность потенциалов действия (на 10% и 11%, соответственно, Рис.4.2.25). Данный эффект, по-видимому, связан с известным побочным действием ивабрадина как блокатора каналов $K_{v1.5}$, формирующих ток I_{Kur} . Таким образом, получены косвенные данные о наличии данного тока в миокарде легочных вен крысы.

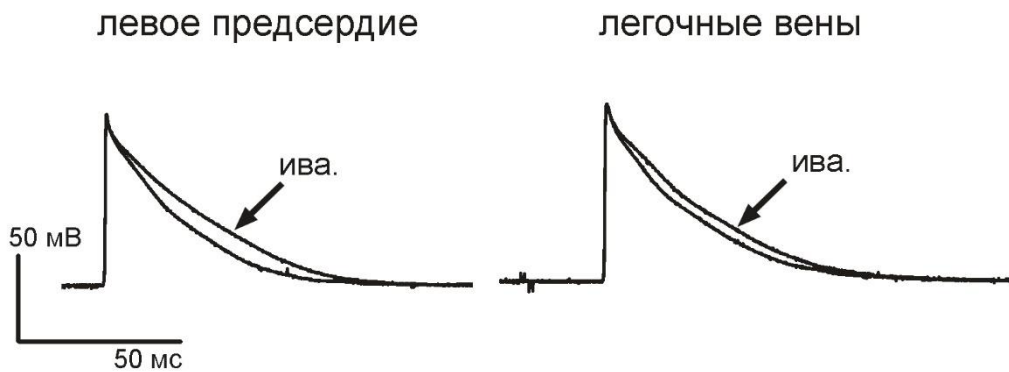


Рис. 4.2.25. Блокатор пейсмекерного тока I_f (ивабрадин, 5 мкмоль/л, 30 мин) вызывает существенное увеличение длительности электрически вызванных потенциалов действия в рабочем миокарде предсердий и миокардиальной ткани легочных вен крысы. Приведены контрольные ПД, а также ПД при действии ивабрадина (ива).

4.2.1.9. Влияние факторов эндотелия на потенциал покоя и потенциалы действия в легочных венах крысы

Роль эндотелия в регуляции потенциала покоя

В серии экспериментов, в которых величину спонтанного сдвига мембранного потенциала измеряли до и после механического удаления эндотелия в многоклеточных препаратах, включающих участки легочных вен, установлено, что удаление эндотелия не оказывает существенного влияния на величину спонтанного сдвига мембранного потенциала (ПП до удаления эндотелия -67 ± 4 мВ (n=8), ПП после удаления составил -64 ± 6 мВ (n=7), $p(T) > 0.1$) в покоящихся ЛВ.

Ранее было показано, что агонист α_1 -адренорецепторов фенилэфрин (ФЭ) усиливает спонтанную деполяризацию в ЛВ. При действии 10 мкМ ФЭ мембранный потенциал в покоящемся миокарде легочных вен сдвигается до уровня -50 ± 5 мВ, что достоверно больше сдвига в контрольных условиях (n=10, $p(T) < 0.01$). Однако, величина спонтанной

деполяризации в многоклеточных препаратах ЛВ при действии 10 мкМ ФЭ оказалась одинаковой до и после удаления эндотелия (ПП до удаления -50 ± 5 мВ ($n=8$), ПП после удаления составил -52 ± 4 мВ ($n=7$), $p(T) > 0.1$).

Эндотелин-1

Установлено, что 0,1 ($n=5$) и 1 ($n=3$) мкМ эндотелина-1 не оказывал заметного влияния на ПП и потенциалы действия в ритмически возбуждаемых, а также спонтанную деполяризацию и спонтанную активность в покоящихся многоклеточных препаратах легочных вен.

Внеклеточный калий

Природа эндотелиального гиперполяризующего фактора (EDGF) полностью не изучена, однако, предполагается, что основным элементом EDGF является калий, накапливающийся в межклеточной среде, и обуславливающий гиперполяризацию гладкомышечных клеток за счет активации Na/K-АТФазы и калиевых каналов, переносящих ток аномального выпрямления (IK1). Нами были выполнены эксперименты, в которых многоклеточные препараты, включающие участки легочных вен перфузировали раствором, содержащим ионы калия в концентрации, превышающей нормальную концентрацию данного иона в плазме крови (2,7 - норма; 3 и 4 мМ). Нами была, таким образом, предпринята попытка имитировать действие EDHF на миокардиальную ткань ЛВ. Увеличение внеклеточной концентрации калия приводило к сдвигу ПП в ритмически возбуждаемых препаратах ЛВ в положительную сторону, такие же изменения наблюдались в миокарде левого предсердия. Изменение концентрации калия в перфузионном растворе также приводило к увеличению сдвига мембранного потенциала в покоящихся препаратах ЛВ, однако, величина данных изменений была незначительна (-67 ± 4 мВ при 2.7 мМ, -64 ± 5 мВ при 3 мМ, -60 ± 6 мВ при 4 мМ калия в перфузионном растворе, везде $n > 5$). Таким образом, изменение концентрации внеклеточного калия влияет на ПП в рабочем миокарде предсердий и в ЛВ, а также влияет на величину спонтанной деполяризации в ЛВ. Однако эти изменения, вероятно, не связаны со специфическими изменениями активности вышеуказанных ферментов и ионных каналов. Увеличение концентрации калия во внеклеточном перфузионном растворе ни в одном случае не приводило к гиперполяризации (в ритмически возбуждаемых препаратах), либо уменьшению величины спонтанной деполяризации (в покоящихся препаратах) в ЛВ. Вероятно, калий-зависимая гиперполяризация, обусловленная активацией Na/K-АТФазы и IK1, возможна только при локальном примембранном увеличении концентрации калия, которое может быть

достигнуто *in vivo* внутри клеточных слоев, и невозможно при общем увеличении калия во внеклеточной среде.

Влияние доноров оксида азота на потенциал покоя в миокарде легочных вен крысы

Для исследования роли оксида азота в регуляции мембранного потенциала в миокарде легочных вен использовали такие доноры NO как нитропруссид (НПС) и SNAP. При самостоятельном действии НПС (1-10 мкМ) и SNAP (1-10 мкМ) вызывали небольшое увеличение длительности ПД в ритмически возбуждаемых препаратах ЛВ (от 63 ± 5 до 66 ± 5 мс, $n=5$). Увеличение длительности ПД было одинаково в ЛВ и рабочем предсердном миокарде. НПС и SNAP вызывали снижение частоты спонтанных ПД в покоящихся препаратах ЛВ, однако, значимого влияния на величину спонтанной деполяризации в ЛВ не оказывали.

НПС и SNAP в вышеуказанных концентрациях не изменяли влияние норадреналина (НА), а также ФЭ на потенциалы действия в ритмически возбуждаемых препаратах легочных вен. В то же время, НПС и SNAP оказывали влияние на характер спонтанной активности, усиленной НА в покоящихся препаратах легочных вен. Оба донора NO вызывали снижение длительности пачек спонтанных ПД, частоту следования ПД в пачках, вызывали уменьшение количества спонтанных ПД, сопровождаемых ранними постдеполяризациями, а также снижали «тяжесть» (длительность) постдеполяризаций, сопровождающих спонтанные ПД. Мы предположили, что в основе такого действия доноров оксида азота в ЛВ может быть снижение уровня цитоплазматического кальция, в результате чего снижается деполяризирующая составляющая тока натрий-кальциевого обменника (I_{NCX}).

На основе выполненных экспериментов, было сделано предположение, что спонтанная деполяризация в миокарде легочных вен крысы не связана с действием эндотелиальных факторов. В то же время оксид азота способствует предотвращению спонтанной активности в миокарде легочных вен, вызывает подавление эффектов норадреналина в покоящихся ЛВ.

4.2.2. Биоэлектрическая активность миокардиальной ткани легочных вен мышцы и ее регуляция

4.2.2.1. Потенциал действия, потенциал покоя и спонтанная автоматическая активность в миокарде легочных вен мышцей

Вызванные потенциалы действия в миокардиальной ткани легочных вен мышцей

При стационарной электрической стимуляции в миокардиальной ткани легочных вен мышцей наблюдаются потенциалы действия характерные для рабочего миокарда. Потенциалы действия наблюдали в легочных венах у мышцей нескольких линий BALB/c, C57Bl/6, CBA, а также 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 мышцей линии BALB/c установлено, что длительность электрически вызванных ПД, регистрируемых в проксимальных и дистальных участках легочных вен, различна (Рис. 4.2.26). 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. 4.2.26, Б, В).

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. На рис. 4.2. А представлена карта распределения длительностей оптических ПД в разных участках легочных вен мышцей. Реконструированная карта распределения длительностей оптических ПД, выявляет наибольшую длительность в области устья легочных вен.

Длительность ПД в различных отделах легочных вен оценивали не только у мышцей линии BALB/c, но и у мышцей линий C57Bl/6 и CBA, а также у межлинейных гибридов B6CBAF1. У всех этих типов мышцей наблюдали сходное распределение длительностей ПД в венозно-предсердном миокарде, как и у мышцей BALB/c. Потенциалы действия с наибольшей длительностью всегда обнаруживали в области устьев вен. Сравнение длительностей ПД у разных типов мышцей проводили только для двух участков: ушка левого предсердия (УЛП) и устья ЛВ. Соответствующие значения ДПД90% и ДПД50% для

устья ЛВ и ушка ЛП всех четырех типов мышей представлены в таблицах 4.1, 4.2. Статистически значимых различий в значениях ДПД в миокарде ЛВ, а также ЛП между различными типами мышей выявлено не было.

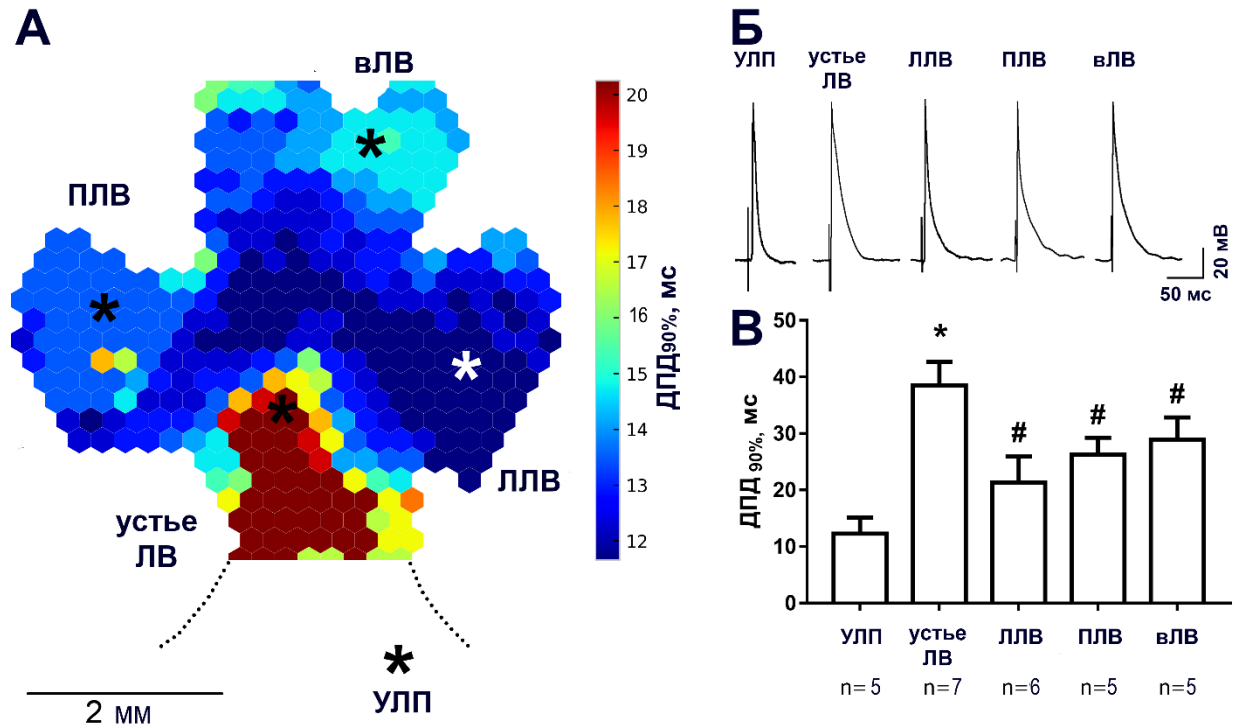


Рис. 4.2.26. Длительность потенциала действия (ДПД_{90%}), регистрируемых при электрической стимуляции в различных участках венозно-предсердного препарата мышей линии BALB/c. **А.** Карта ДПД_{90%}, построенная на основе данных, полученных методом оптического картирования (временной интервал между изохронами 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 (ДПД_{90%}), 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 4.1. 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)

Таблица 4.2. Значения ДПД_{50%} 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	13±4 (n=10)	11±1 (n=5)	7±1 (n=6)	9±1 (n=8)
ЛП	6±1 (n=5)	6±1 (n=6)	6±1 (n=5)	7±2 (n=10)

Потенциал покоя

Потенциал покоя регистрировали как в условиях стационарной стимуляции/возбуждения, так и в покоящемся миокарде легочных вен различных линий мышей. Значения потенциала покоя для всех линий мышей представлены на Рис. 4.2.27. 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 (спонтанная деполяризация) потенциала покоя к менее негативным значениям. Таким образом, в состоянии покоя миокардиальная ткань легочных вен мышей, по крайней мере некоторых линий, демонстрировала те же свойства, что и у других грызунов – морские свинки, крысы. 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±1,6 минут, после чего, на протяжении всего периода покоя оставался на постоянном уровне.

У мышей линии C57Bl/6 ПП при оценке в режиме стимуляции/возбуждения в легочных венах составил -79±3 мВ (n=4). Спонтанную деполяризацию ПП после прекращения электрической стимуляции препарата наблюдали только в части экспериментов (3 из 5). В среднем ПП в покоящихся 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 покоящемся миокарде -67±2 мВ (n=5). Эта величина статистически значимо отличается от значений ПП, наблюдаемой в режиме стимуляции/возбуждения. Таким образом, для миокарда ЛВ мышей линии CBA также характерен нестабильный уровень ПП. У гибридов первого поколения B6CBAF1 (гибридов линий CBA и C57Bl/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).

Таким образом, спонтанная деполяризация ПП характерна только для легочных вен мышей линии BALB/c и CBA (Рис. 4.3).

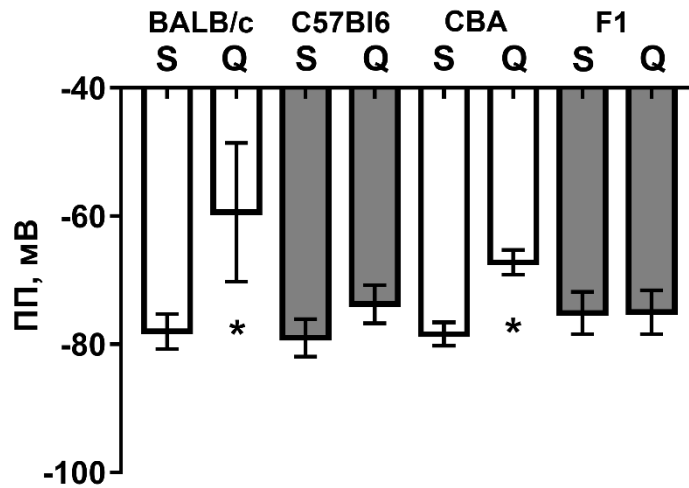


Рис. 4.2.27. Потенциал покоя в стимулируемых (S - stimulated) и нестимулируемых, покоящихся (Q - quiescent) препаратах миокардиальной ткани легочных вен (ЛВ) мышей линий BALB/c, C57Bl/6, CBA и межгибридных особей B67C (F1). * - $p < 0,05$ (ПП при стимуляции vs ПП в покое у мышей линии CBA, и BALB/c, парный t-тест).

Автоматическая активность в миокардиальной ткани легочных вен мышей различных линий в базальных условиях

Для миокарда легочных вен мышей линии C57Bl/6, а также гибридов B6CBAF1 характерна автоматическая (спонтанная) активность в базальных условиях (т.е. без адренергических либо холинергических воздействий). Спонтанные ПД наблюдались у мышей линии C57Bl/6 в 40% экспериментов ($n=10$); у гибридов F1 в 80% экспериментов ($n=19$). У мышей линии CBA автоматической активности в легочных венах в базальных условиях не наблюдали. У мышей BALB/c в базальных условиях спонтанные потенциалы действия возникали в 20% (в 6 из 30) случаев. Автоматическая активность у этой линии мышей носила регулярный или залповый характер. У мышей линии CBA при прекращении стимуляции наблюдали исключительно деполяризацию ПП, которая не сопровождалась какими-либо спонтанными потенциалами действия. Таким образом, некоторые линии мышей отличаются в плане электрофизиологических свойств легочных вен от других грызунов и кроликов, для которых базальная автоматия не характерна.

Автоматическая активность в миокардиальной ткани легочных вен мышей линии C57Bl/6, гибридов C57Bl/6/CBA в базальных условиях

У мышей линии C57Bl/6 автоматическая активность в легочных венах в базальных условиях не сопровождалась деполяризацией потенциала покоя. 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.

В легочных венах мышей гибридов В6СВАF1 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. Спонтанная активность имела перманентный (сохранялась на протяжении всего периода регистрации) и регулярный характер. В 55% (в 8 из 15) таких препаратов реполяризация спонтанных ПД сопровождалась повторяющимися длительными осцилляциями мембранного потенциала (Рис. 4.2.28). Осцилляции 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 В6СВАF1 за счет осцилляций либо фазы «плато» была крайне велика и могла достигать 20000 мс, что на 2,5 порядка превышает нормальную длительность ПД у мышей.

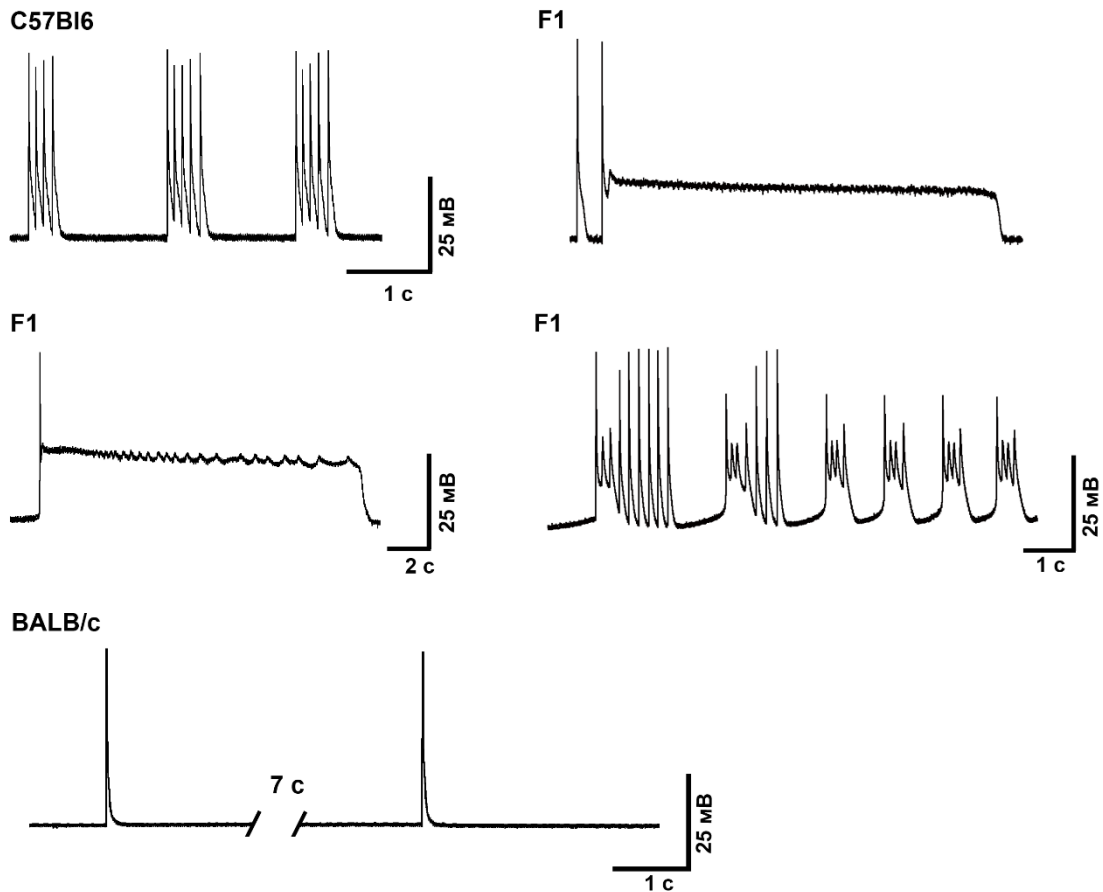


Рис. 4.2.28. Репрезентативные примеры спонтанной автоматической активности в миокардиальной ткани легочных вен у мышей линии C57Bl/6 и у гибридов первого поколения В6СВАF1 (F1), а также примеры спонтанных потенциалов действия, возникающих в ходе периода стабилизации ПП в миокарде ЛВ мышей BALB/c.

4.2.2.2. Эффекты норадреналина в миокардиальных рукавах легочных вен мышей

Биоэлектрическая активность в миокарде легочных вен мышей линии BALB/c при действии норадреналина

В миокарде легочных вен мышей линии BALB/c норадреналин (НА, 10 мкМ) вызывал спонтанную активность во всех экспериментах (n=8, Рис.4.2.29..А, Г).

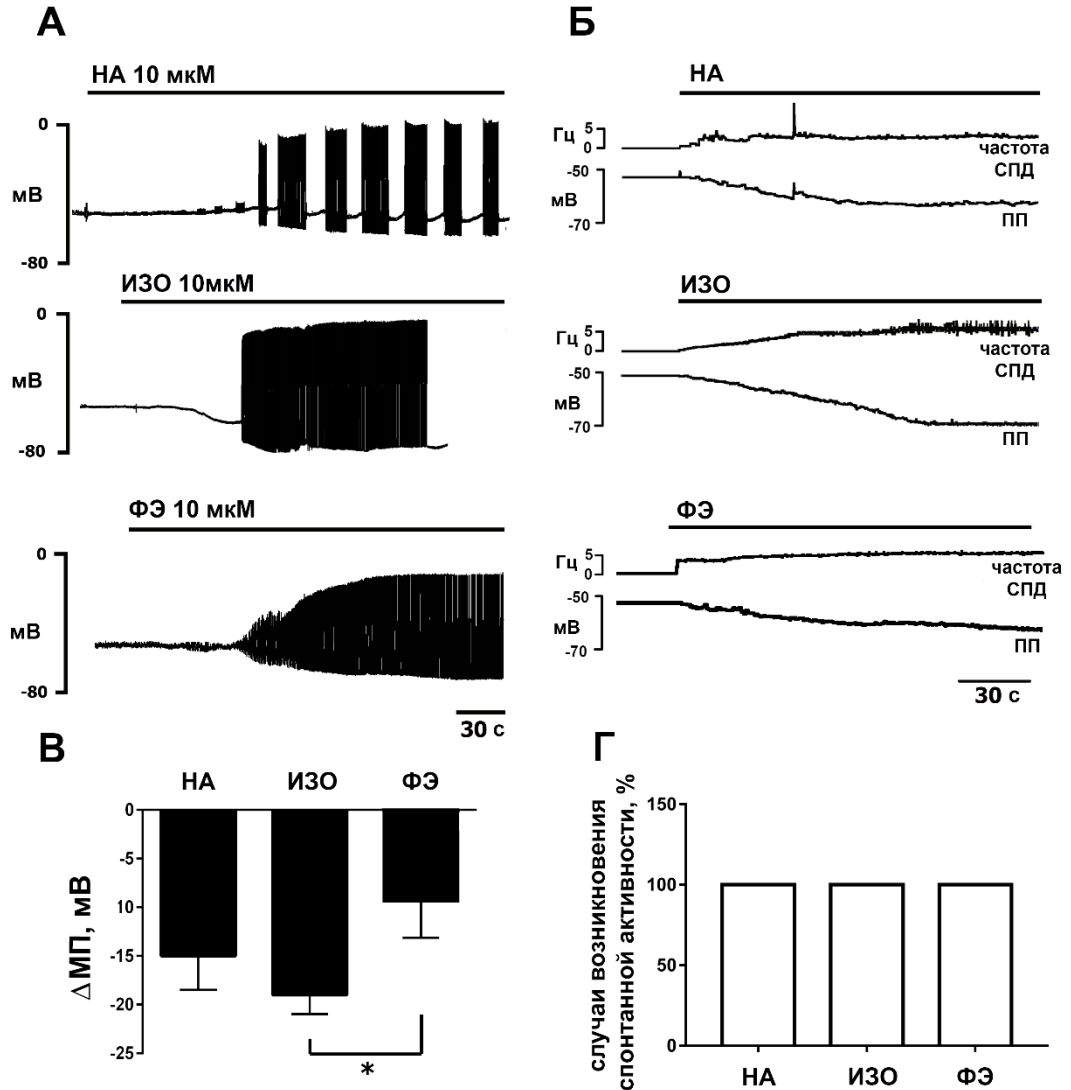


Рис. 4.2.29. Действие норадреналина (НА, 10 мкМ), изопротеренола (ИЗО, 10 мкМ) и фенилэфрина (ФЭ, 10 мкМ) на мембранный потенциал в покоящихся препаратах ЛВ мышей линии BALB/c. **А.** Репрезентативные примеры спонтанной активности, вызываемой агонистами адренорецепторов в препаратах ЛВ мышцы. **Б.** Примеры изменения частоты спонтанной активности и потенциала покоя при действии агонистов адренорецепторов в препаратах ЛВ мышцы. **В.** диаграмма, отражающая количество экспериментов, в которых агонисты адренорецепторов вызвали спонтанную активность. **Г.** Изменение потенциала покоя при действии агонистов адренорецепторов, * - $p < 0.05$ (в сравнении с действием ФЭ).

Как и в случае с миокардом легочных вен крыс, у мышей данной линии спонтанная активность могла иметь регулярный (спонтанные ПД возникали периодически с варьирующими интервалами времени) или залповый (ПД возникали залпами, сменяющимися периодами покоя) характер. Оба типа спонтанной активности развивались через 1-2 мин ($1,3 \pm 0,6$ мин) после начала действия норадреналина и продолжалась на протяжении всего времени его действия. (Рис. 4.2.29. А). Норадреналин у мышей линии BALB/c вызывал регулярную активность в 3 из 8 экспериментах (частота следования ПД составляла $5,5 \pm 2,5$ Гц), а в остальных 5 случаях - залповую активность. Интересно, что во всех случаях, когда НА вызвал залповую активность ($n=5$), наблюдали медленную диастолическую деполяризацию, в то время как при регулярном характере автоматической активности потенциал покоя между спонтанными ПД оставался на постоянном уровне.

В ходе автоматической активности при действии НА потенциал покоя в легочных венах сдвигался к более негативным значениям, чем в покоящемся миокарде. Величина гиперполяризации составляет 15 ± 4 мВ ($n=5$, $p < 0.05$), в результате чего ПП достигала -74 ± 4 мВ. Таким образом, НА у мышей не вызывал многофазных изменений ПП. значения ПП при автоматической активности, вызванной норадреналином, а также значения ПП при электрической стимуляции/возбуждении одинаковы (Рис. 4.2.29. Б, В).

Биоэлектрическая активность в миокарде легочных вен мышей линии CBA, C57Bl/6 и межлинейных гибридов B6CBAF1 при действии норадреналина

Несмотря на то, что в базальных условиях у мышей линии CBA автоматическую активность в легочных венах не наблюдали, при действии норадреналина (10 мкМ) спонтанные ПД возникали во всех экспериментах ($n=8$). Действие НА всегда сопровождалось гиперполяризацией (14 ± 3 мВ) потенциала покоя. Автоматическая активность у данной линии носила преимущественно залповый характер, хотя длительность залпов (1-15 с) и интервалом между залпами ПД существенно варьировала (1-10 с). Максимальная частота спонтанных ПД при действии НА составляла $3,4 \pm 0,6$ Гц. Интервалы между спонтанными ПД в залпах всегда сопровождалась диастолической деполяризацией (Рис. 4.30).

В легочных венах мышей линии C57Bl/6, гибридов B6CBAF1 (F1) норадреналин также вызывал автоматическую активность регулярного или залпового характера. В том случае, если в легочных венах мышей C57Bl/6 или B6CBAF1 исходно наблюдалась автоматическая активность, норадреналин приводил к изменению характера спонтанных ПД и увеличению частоты их следования. У мышей линии C57Bl/6 автоматическая активность регулярного характера при действии НА приобретала залповый характер.

Интересно, что у мышей гибридов В6СВАF1 норадреналин подавлял осцилляции мембранного потенциала (ранние постдеполяризации), приводил к «нормализации» реполяризации и укорочению ПД. Однако частота следования спонтанных ПД при этом возрастала (Рис. 4.2.31).

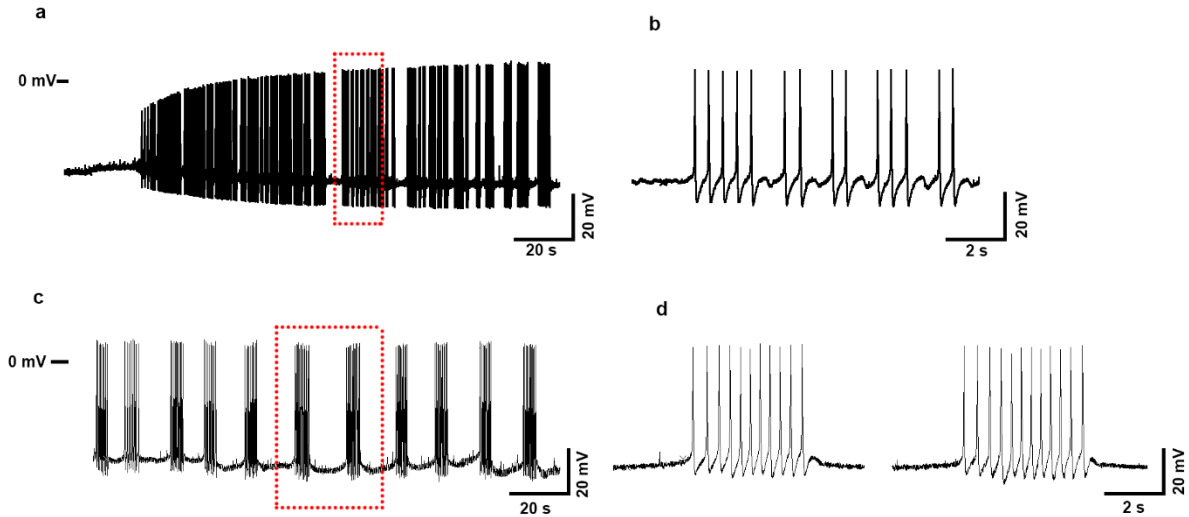


Рис. 4.2.30. Репрезентативные примеры записей спонтанных ПД, вызываемых норадреналином (10 мкМ) в миокарде легочных вен мышей линии СВА. Автоматическая активность в легочных венах мышей данной линии характеризуется значительной вариацией длительности залпов спонтанных ПД и длительности интервалов между залпами. Справа показаны участки записей, выделенные красным пунктиром в левой части рисунка.

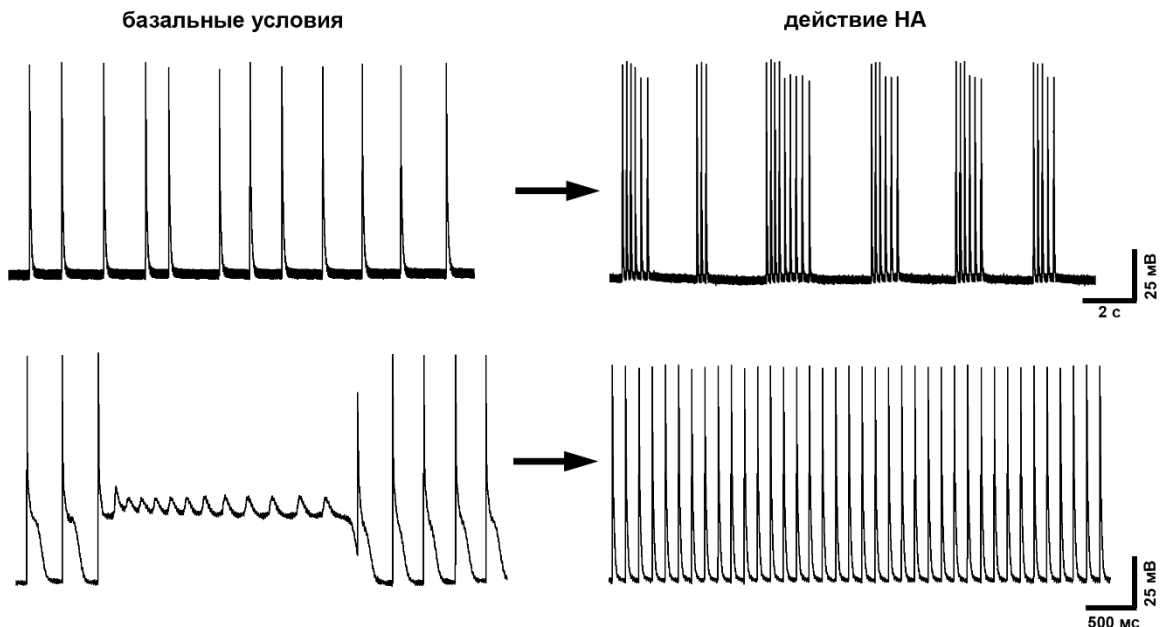


Рис. 4.2.31. Репрезентативные примеры записей спонтанных ПД, наблюдаемых в миокарде легочных вен мышей линии С57В1/6 (сверху) и гибридов В6СВАF1 (снизу) в базальных условиях, а также влияние норадреналина (10 мкМ) на конфигурацию спонтанных ПД и характер автоматической активности.

Залповая активность, вызванная норадреналином, при действии при действии антагонистов кальциевых каналов в легочных венах мышей

Кальциевые блокаторы, подавляя $I_{Ca,L}$ и косвенно снижая активность NCX и RyR, вызывают прекращение залповой активности, индуцированной норадреналином или повышением уровня цАМФ (при подавлении активности фосфодиэстераз), что доказывает важную роль $[Ca^{2+}]_i$ в реализации этой активности.

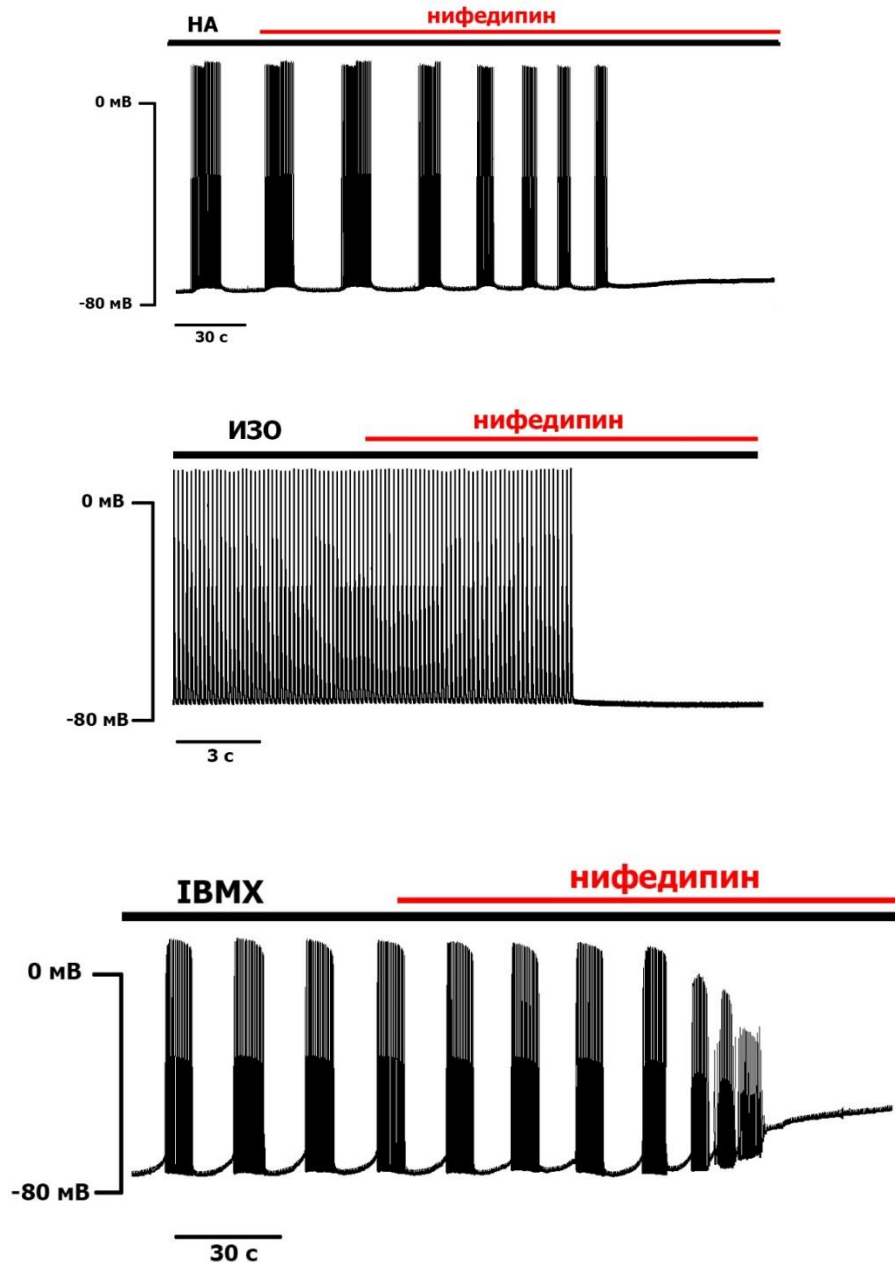


Рис. 4.2.32. Влияние кальциевого антагониста нифедипина на залповую спонтанную активность, вызванную в миокардиальной ткани легочных вен мышей норадреналином (НА, сверху), изопротеренолом (ИЗО, в центре) или блокатором фосфодиэстераз ИБМХ.

4.2.2.3. Эффекты активации β -адренорецепторов в миокарде легочных вен мышей

Влияние активации β -адренорецепторов на потенциал покоя и спонтанную активность в легочных венах мышей линии BALB/c

Эффекты активации β -адренорецепторов в миокарде легочных вен выявляли на примере линии мышей BALB/c. Агонист β -адренорецепторов изопротеренол (ИЗО) при действии в концентрации 1 или 10 мкМ в 100% экспериментов ($n=5$ и $n=10$) вызывал в легочных венах автоматическую активность. Подчеркнем, что ИЗО никогда не вызвал спонтанные ПД в легочных венах крыс, кроликов или морских свинок. Спонтанная активность при действии ИЗО имела залповый (5 экспериментов из 10) или регулярный (5 экспериментов из 10) характер и продолжалась на протяжении всего времени действия ИЗО. Частота регулярной спонтанной активности составила 4.5 ± 0.4 Гц, частота следования спонтанных ПД в залпах была непостоянной; максимальная частота ПД в залпах составляла $6,8 \pm 1,2$ Гц. При действии ИЗО происходила крайне быстрая (0,5-5 с, 3-10 последовательных ПД) гиперполяризация ПП на 20 ± 2 мВ ($n=10$, $p(T) < 0.05$, по сравнению с ПП в контроле). Данный эффект статистически значимо не отличался от эффекта НА, но был значимо больше, чем эффект ФЭ ($p < 0.05$). Медленная диастолическая деполяризация при действии ИЗО наблюдалась только в части экспериментов и только кратковременно в фазу инициации автоматической активности. Поэтому, автоматическая активность при действии ИЗО в легочных венах у мышей имела место при стабильном и достаточно негативном (-79 ± 3 мВ) потенциале (Рис. 4.2.33), чего не наблюдали в легочных венах других млекопитающих. Спонтанные ПД при действии ИЗО имели конфигурацию, характерную для рабочего предсердного миокарда с высокой скоростью переднего фронта и значительным овершутом. Более того, при залповом типе активности. ПП в интервалах между залпами оставался достаточно стабильным.

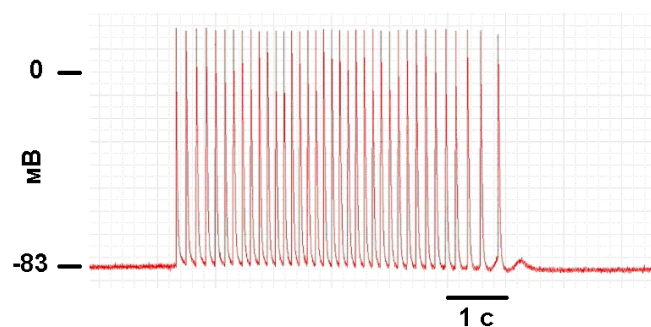


Рис. 4.2.33. Репрезентативный пример залпа спонтанных ПД, вызываемого активацией β -адренорецепторов (изопротеренол, 1 мкМ) в легочных венах мышей линии BALB/c.

4.2.2.4. Эффекты активации α 1-адренорецепторов миокардиальных рукавов легочных вен мышей

Влияние активации α -1-адренорецепторов на электрически вызванные потенциалы действия в легочных венах мышей линии BALB/C

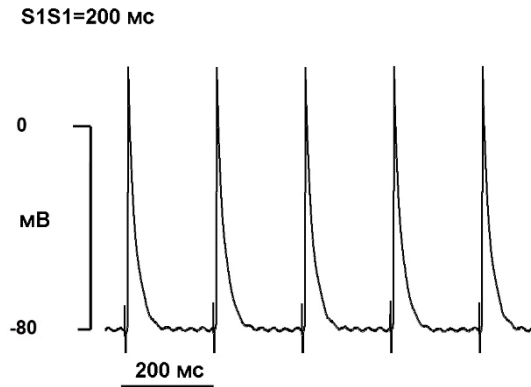


Рис. 4.2.34. Репрезентативные примеры записей электрически вызванных ПД в легочных венах мышей BALB/C.

Для легочных вен мышей характерны типичные потенциалы действия с быстрым фронтом при условии непрерывной стимуляции с межимпульсными интервалами 200-80 мс (Рис. 4.2.34).

В миокардиальных препаратах левого предсердия агонист адренорецепторов α -1 типа фенилэфрин (ФЭ) вызывал снижение длительности электрически вызванных ПД. ДПД90 при действии 10 мкМ ФЭ снижалась на $35 \pm 4\%$ при S1S1=200 мс ($n=6$, $p(T) < 0,05$) и на $40 \pm 5\%$ при S1S1=80 мс ($n=6$, $p(T) < 0,05$). В части экспериментов с легочными венами ФЭ также снижал ДПД90. В пяти экспериментах длительности ПД в ЛВ уменьшалась на $20 \pm 6\%$ при S1S1=200 мс ($n=5$, $p(T) < 0,05$) и на $47 \pm 3\%$ при S1S1=80 мс ($n=5$, $p(T) < 0,05$). Однако в 50% экспериментов (5 из 10) фенилэфрин вызывал обратный эффект, т.е. увеличивал ДПД90% (Рис. 4.2.35). Этот эффект слабо зависел от частоты генерации ПД. При S1S1=200 мс ($n=5$, $p(T) < 0,05$) увеличение ДПД90 составляло $12 \pm 3\%$, а при S1S1=80 мс - $16 \pm 5\%$ ($n=5$, $p(T) < 0,05$).

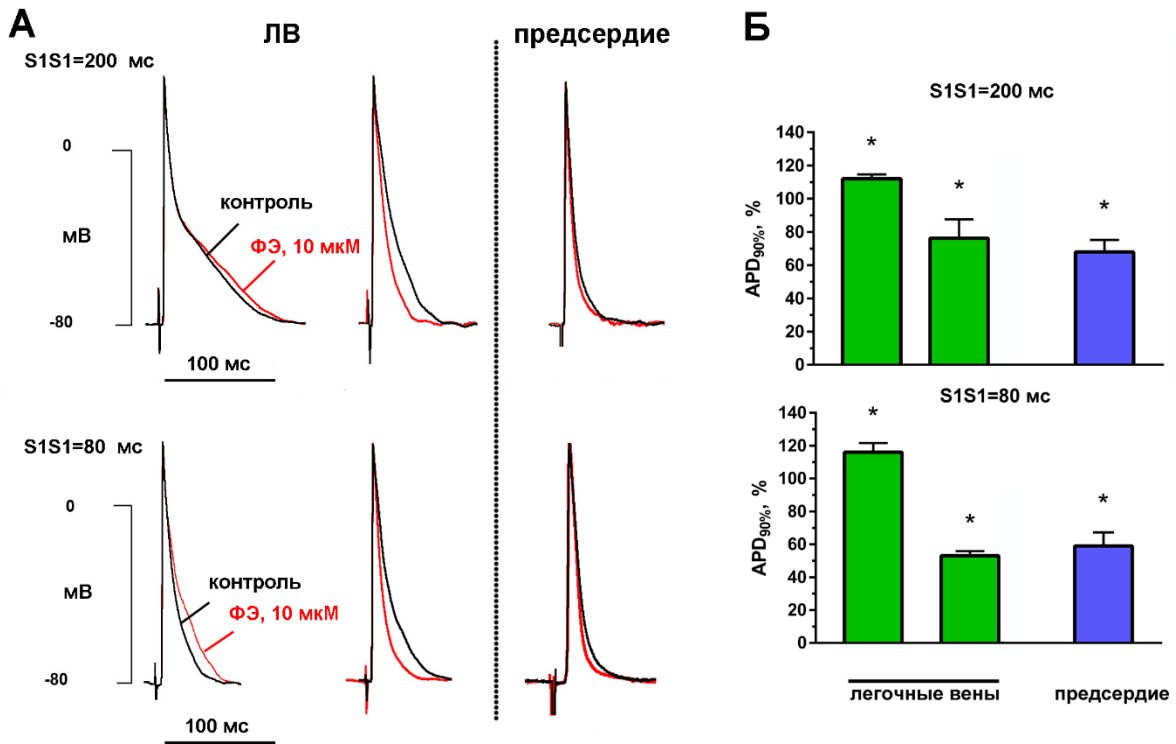


Рис. 4.2.35. Влияние фенилэфрина на электрически вызванные ПД в легочных венах мыши. **А.** Репрезентативные примеры записей электрически вызванных ПД в легочных венах мышей BALB/C в контроле и при действии фенилэфрина (10 мкМ). S1S1 – длительности интервала между возбуждающими стимулами. **Б.** Длительность ПД при действии ФЭ при разной частоте стимуляции ткани ЛВ.

Влияние активации α -1-адренорецепторов на потенциал покоя и спонтанную активность в легочных венах мышей линии BALB/C

Эффекты активации α -1-адренорецепторов в миокарде легочных вен выявляли на примере линии мышей BALB/c. Агонист α -1-адренорецепторов фенилэфрин (ФЭ) в концентрации 10 мкМ во всех экспериментах вызывал автоматическую активность регулярного характера ($n=6$), частота которой составила $2,7 \pm 0,8$ Гц (Рис.4.2.36, А,Б). По мере развития спонтанной активности при действии ФЭ происходила гиперполяризация мембранного потенциала, величина этой гиперполяризации составляла 10 ± 4 мВ ($n=6$, Рис.4.2.37, Б, В). Этот эффект был статистически значимым ($p < 0,05$) и отличался от величины гиперполяризации ПП, вызываемой 10 мкМ НА. Несмотря на гиперполяризацию, во всех случаях при действии ФЭ спонтанная активность сопровождалась МДД, а сами ПД имели «пейсмекерную» конфигурацию. Инициация спонтанных ПД при действии ФЭ всегда предварялась низкоамплитудными («подпороговыми») осцилляциями мембранного потенциала. У мышей линии BALB/c спонтанные ПД, вызванные фенилэфрином, никогда не сопровождалось ранними или задержанными постдеполяризациями.

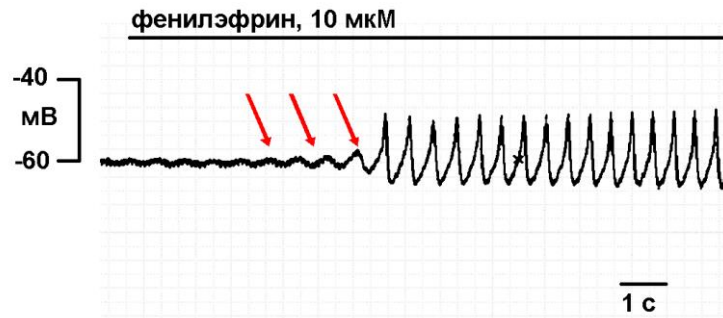


Рис. 4.2.36. Низкоамплитудные осцилляции ПП, предшествующие спонтанным ПД при действии фенилэфрина в миокарде легочных вен мышей линии BALB/c.

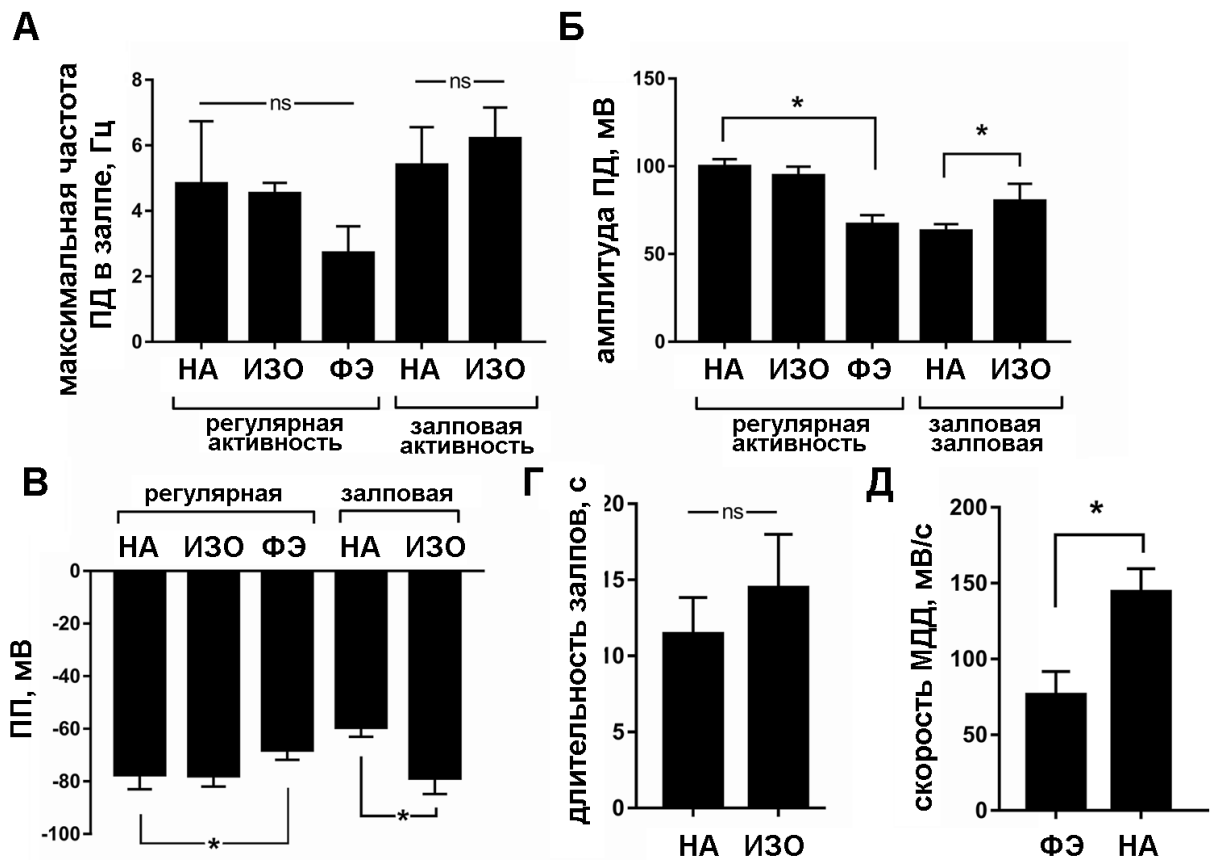


Рис. 4.2.37. Характеристики спонтанных ПД и автоматической активности в миокарде легочных вен мышей линии BALB/c вызываемых норадреналином (НА, 10 мкМ), селективным агонистом α -1-адренорецепторов фенилэфрином (ФЭ, 10 мкМ), либо агонистом β -адренорецепторов изопроterenолом (10 мкМ). **А.** Максимальная частота следования спонтанных ПД при залповом или регулярном типе спонтанной активности. **Б** Амплитуда спонтанных ПД. **В.** Наиболее отрицательное значение потенциала покоя (ПП) при залповом или регулярном типе автоматической активности. **Г.** Длительность залпов автоматической активности. **Д.** Скорость диастолической деполяризации ПП, в том случае, когда при действии НА или ФЭ возникали спонтанные ПД «пейсмейкерного» типа. * - $p < 0.05$ (ANOVA). ns – незначимо.

4.2.2.5. Влияние экзогенных микроРНК на базальную автоматическую активность и автоматическую активность, вызванную норадреналином в легочных венах мышей В6СВАF1

В данной серии экспериментов исследовали способность микроРНК miR-486-3p, miR-1, miR-133a-3p при внутривенном введении изменять характер спонтанной активности в миокардиальной ткани легочных вен мышей гибридов В6СВАF1 (Рис.4.2.38).

Для оценки эффектов микроРНК рассчитывали такие параметры как встречаемость (частота возникновения) осциллирующих спонтанных ПД, встречаемость МДД, встречаемость задержанных постдеполяризаций и постпотенциалов в препаратах легочных вен от животных, получавших носитель (контрольная группа) либо одну из трех микроРНК. Кроме того, рассчитывали такие количественные характеристики как частота ранних постдеполяризаций, частота следования спонтанных ПД при залповом типе активности.

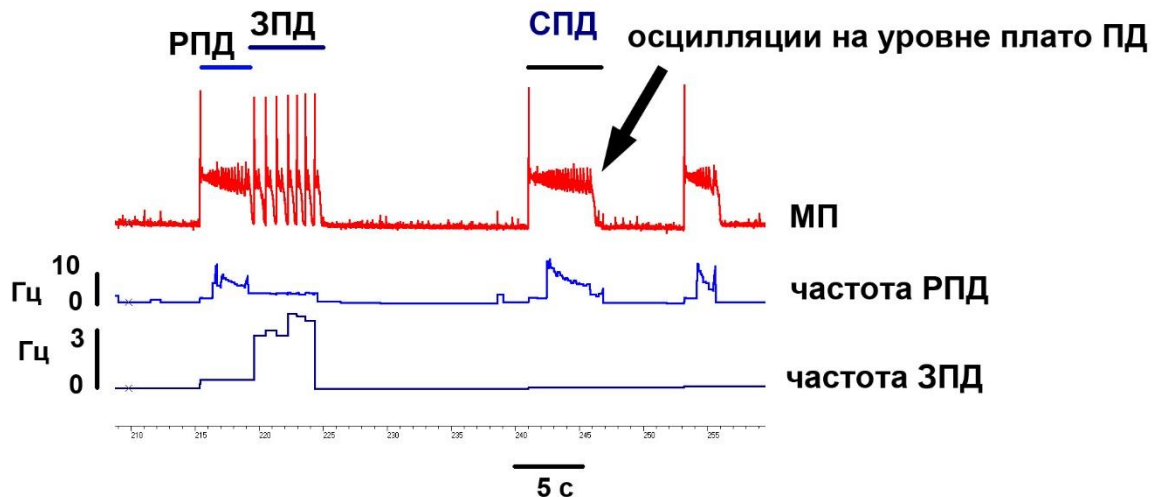


Рис. 4.2.38. Репрезентативные примеры спонтанных потенциалов действия (СПД) легочных вен мышей гибридов В6СВАF1 и расчета характеристик постдеполяризаций. Длительные осцилляции мембранного потенциала (МП) позволяют рассчитать количество и частоту множественных ранних (РПД) и задержанных постдеполяризации (ЗПД).

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 микроРНК вызывала изменение отдельных характеристик проаритмической биоэлектрической активности в легочных венах мышей. Далее, последовательно приведены основные эффекты трех изученных микроРНК в легочных венах гибридов В6СВАF1.

(1) В базальных условиях встречаемость задержанных постдеполяризаций (т.е. степень триггерной активности), встречаемость и величина спонтанного сдвига ПП в интервалах между ПД была значительно ниже в легочных венах мышей, которым вводили miR-1. В дополнение, при действии норадреналина в группе miR-1 не возникали ранние постдеполяризации (Рис. 4.2.39). Остальные параметры не были изменены в группе животных, получавших miR-1 по сравнению животными, которым вводили носитель.

(2) 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 (Рис. 4.2.39). Ни один из других параметров, как в базальных условиях, так и при действии НА, не был изменен в группе животных, получавших miR-486-3p.

(3) В базальных условиях в легочных венах мышей, которым предварительно вводили miR-133a-3p, наблюдали статистически значимое увеличение встречаемости и величины спонтанного сдвига ПП в интервалах между ПД (Рис.4.2.39). На фоне норадреналина, у мышей, получавших miR-133a-3p, наблюдали большее количество задержанных постдеполяризаций (т.е. усиление триггерной активности). Этот эффект был статистически значимым.

В базальных условиях ни после введения наночастиц (носителя, контрольная группа), ни после введения какой-либо из трех микроРНК не наблюдали залповой спонтанной активности. Однако, норадреналин вызывал преобразования паттерна эктопической активности в легочных венах мышей В6СВАF1 таким образом, что в части экспериментов осциллирующие ПД преобразовывались в залпы СПД с нормальной реполяризацией. Поэтому встречаемость залпового типа спонтанной активности и максимальную частоту ПД (в залпах) рассчитывали при действии норадреналина. Из всех трех микроРНК только miR-133a-3p приводила к увеличению встречаемости залпового типа эктопической активности (Рис.4.2.40), однако частота СПД в пределах залпов при этом не изменялась.

Таким образом, результаты наших экспериментов указывают на то, что miR-1 в легочных венах мышей гибридов В6СВАF1 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.

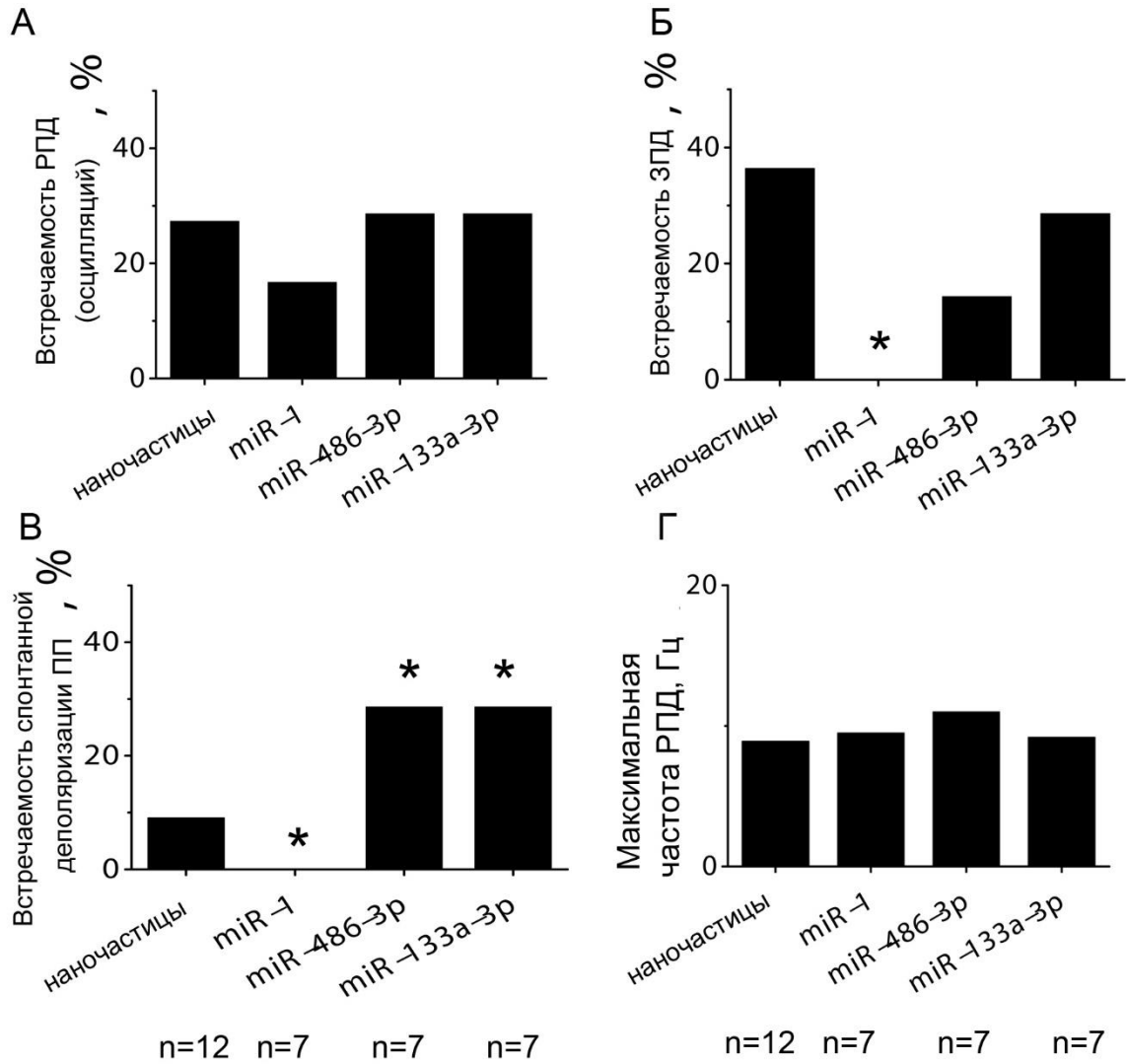


Рис. 4.2.39. Характеристики эктопической активности и аномальных спонтанных потенциалов действия в миокардиальной ткани легочных вен мышей B6CBAF1 через 24 часа после введения микроРНК miR-1, miR-133a-3p, miR-486-3p или носителя (суспензии наночастиц). РПД – осцилляции мембранного потенциала по типу множественных ранних деполаризаций. ЗПД – множественные задержанные постдеполяризации (постпотенциалы). * <0.05 (Точный тест Фишера, микроРНК vs контроль (наночастицы)).

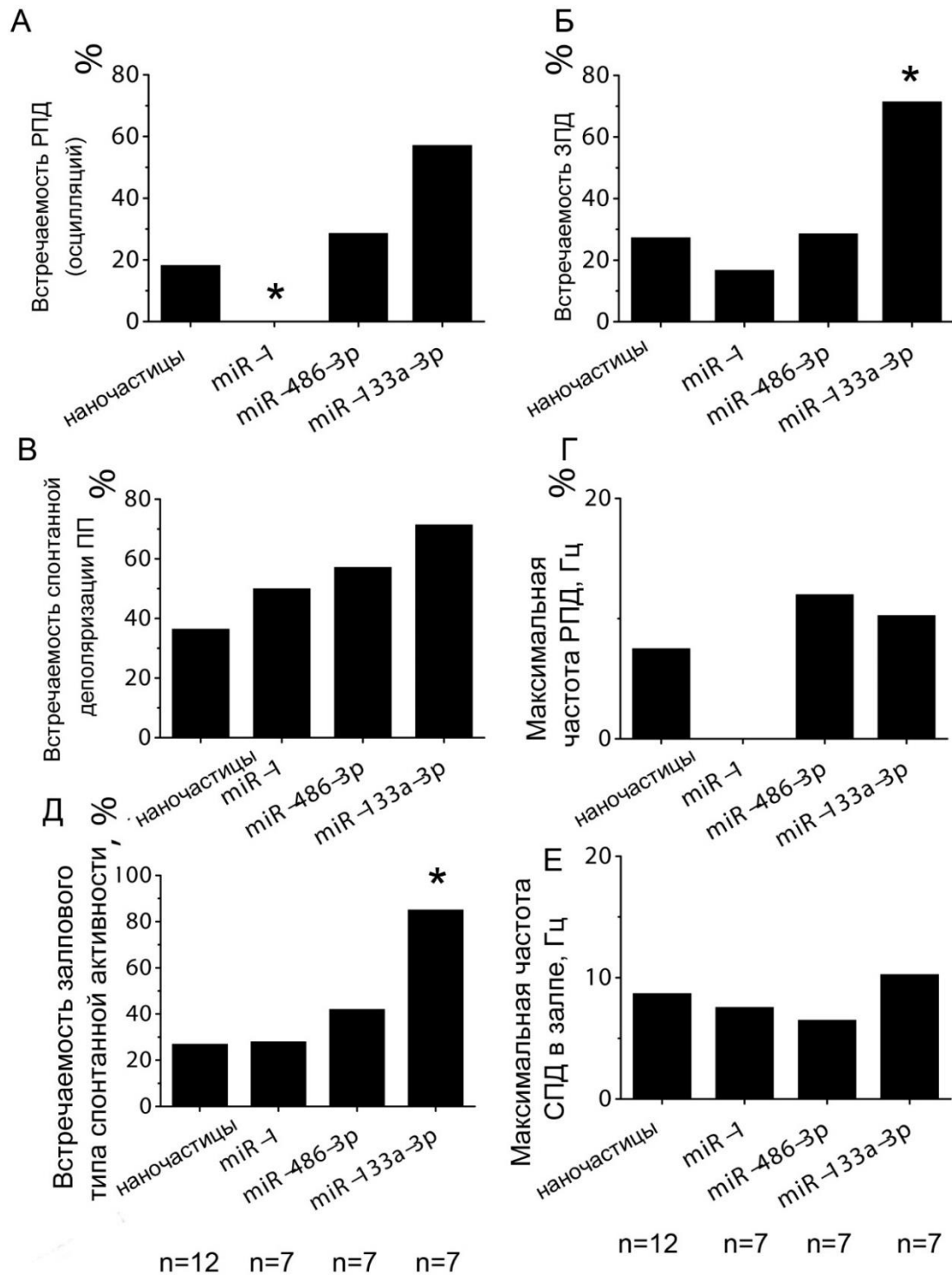


Рис. 4.2.40. Характеристики эктопической активности и аномальных спонтанных потенциалов действия (СПД) в миокардиальной ткани легочных вен мышей B6CBAF1 на фоне норадреналина (10 мкМ) через 24 часа после введения микроРНК miR-1, miR-133a-3p, miR-486-3p или носителя (суспензии наночастицы). РПД – осцилляции мембранного потенциала по типу множественных ранних деполяризаций. ЗПД – множественные задержанные постдеполяризации (постпотенциалы, см. Рис. 4.2.38). **А.** Встречаемость РПД; **Б.** Встречаемость ЗПД; **В.** Встречаемость спонтанного сдвига потенциала покоя (ПП); **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)).

4.2.3. Биоэлектрическая активность миокардиальной ткани легочных вен кролика и ее регуляция

4.2.3.1. Общая характеристика биоэлектрической активности миокарда легочных вен кролика в разных режимах работы

Миокардиальная ткань в области легочных вен кролика способна генерировать ПД предсердного типа в том случае, когда электрическая стимуляция осуществляется с помощью электродов, расположенных в предсердной части многоклеточных препаратов, либо когда электроды располагаются непосредственно в легочных венах. В обоих случаях у кролика как в устьях, так и в наиболее дистальных участках миокардиальной ткани ЛВ электрически вызванные ПД (4 Гц, стационарная стимуляция) имеют высокую скорость нарастания фронта (298 ± 43 ($n=5$), 290 ± 51 ($n=5$) и 269 ± 52 ($n=5$) В/с для левого предсердия, устья и дистальной части ЛВ, соответственно). Конфигурация ПД в ЛВ у кролика 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, соответственно).

Длительность ПД существенно различается в левом предсердии и миокарде легочной вены. 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 (Рис. 4.2.41. и Рис. 4.2.42). Также, как и в случае с длительностью ПД, максимальная длительность эффективного и функционального рефрактерных периодов наблюдаются в области устьев легочных вен.

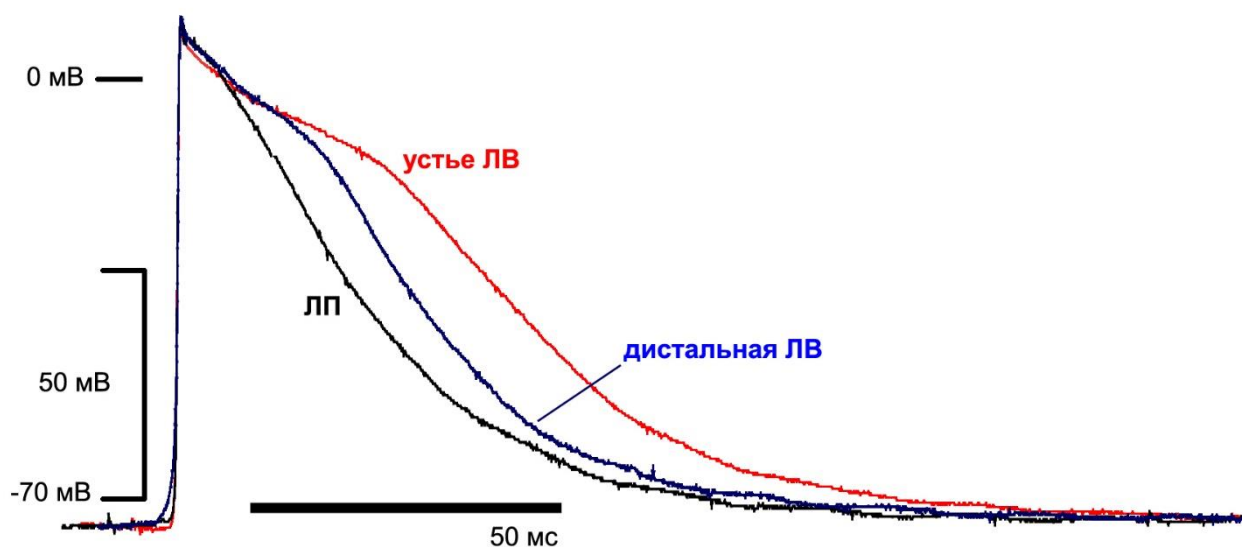


Рис. 4.2.41. Репрезентативные примеры потенциалов действия в устье (устье ЛВ) и наиболее дистальном участке (дистальная ЛВ) миокардиального рукава легочной вены кролика, наблюдаемые при электрической непрерывной стимуляции.

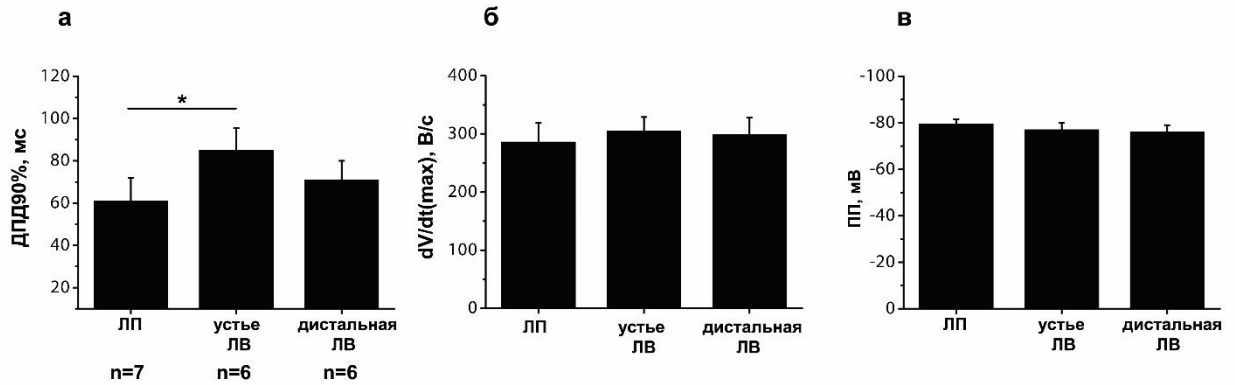


Рис. 4.2.42. Характеристики потенциалов действия и уровень потенциала покоя в области устьев легочных вен (устье ЛВ), наиболее дистальных участках миокардиальных рукавов легочных вен, а также в левом предсердии (ЛП) кролика. **а.** Длительность потенциалов действия на уровне 90% реполяризации (ДПД_{90%}); **б.** Максимальная скорость фронта ПД ($dV/dt(max)$); **в.** Значение потенциала покоя. *- $p < 0.05$ (однофакторный дисперсионный анализ, ANOVA).

Прекращение стационарной непрерывной электрической стимуляции и, соответственно, прекращение генерации ПД в ткани легочных вен приводит к изменениям потенциала покоя. В дистальных участках переход в покоящийся режим ЛВ кролика приводит к спонтанному сдвигу ПП к более положительным значениям, чем в режиме генерации ПД – спонтанной деполяризации (Рис. 4.2.43). 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, $n=5$, Рис. 4.2.44); деполяризация развивается после короткого периода, в течение которого наблюдается («постстимуляционная») гиперполяризация ПП ($1,8 \pm 1,4$ мВ, $n=5$, Рис. 4.2.44). В отличие от легочных вен, в миокарде левого предсердия кролика спонтанная деполяризация не наблюдается. Переход миокарда ЛП в покоящийся режим сопровождается гиперполяризацией ПП ($4,5 \pm 1,4$ мВ, $p < 0,05$, $n=6$), после которой значения ПП возвращается к таковому, наблюдаемому при электрической стимуляции (-78 ± 2 мВ, $n=6$). Таким образом, изменение режима работы в легочных венах и предсердном миокарде у кролика сопровождаются разными изменениями ПП. Более того, для проксимального и дистального участка легочных вен у кролика характерны различия в биоэлектрической активности.

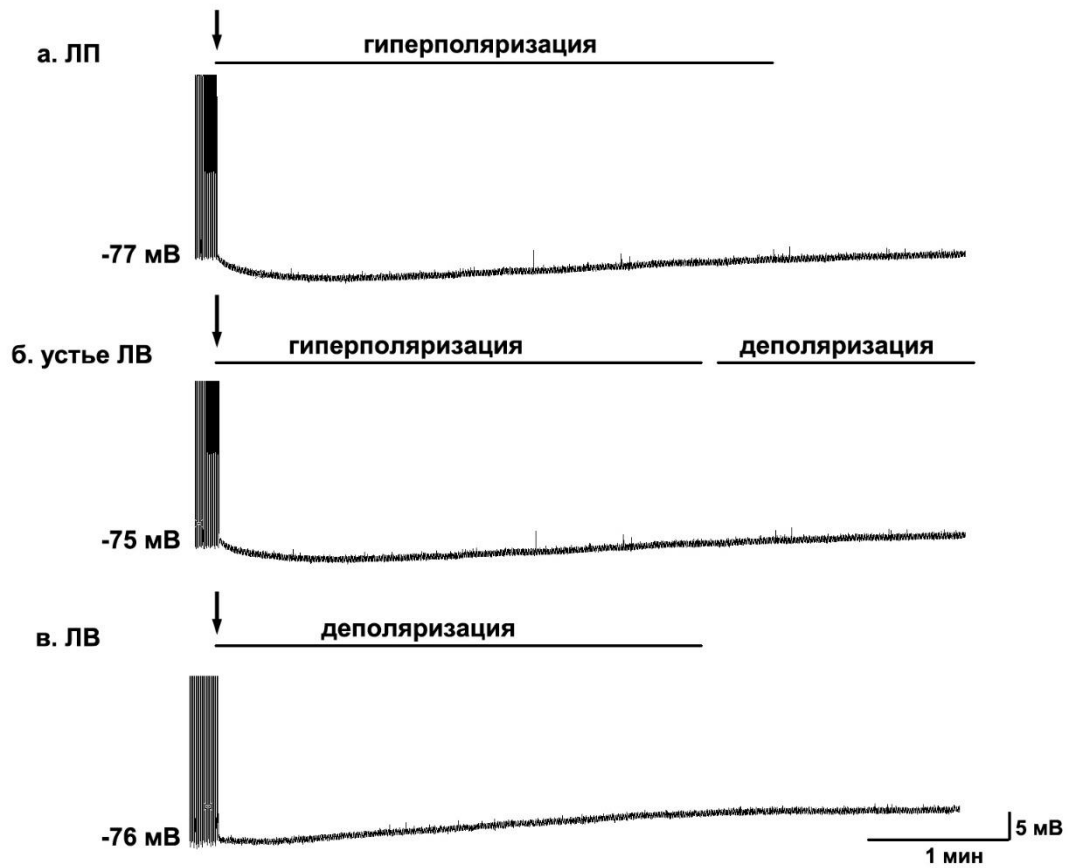


Рис. 4.2.43. Репрезентативные примеры записей, отражающих изменения мембранного потенциала покоя (ПП) в предсердии и миокардиальной ткани легочных вен кролика. Прекращение электрической стимуляции (момент прекращения стимуляции и генерации ПД обозначен стрелкой) и переход миокардиальной ткани в покоящееся состояние в левом предсердии (ЛП) приводит к кратковременной гиперполяризации (а); в дистальном участке легочных вен (ЛВ, в) переход ткани в покоящееся состояние сопровождается деполяризацией ПП и его стабилизацией на новом уровне через $3,4 \pm 0,6$ мин. В устье ЛВ (б) наблюдается небольшая гиперполяризация, сменяющаяся небольшой деполяризацией.

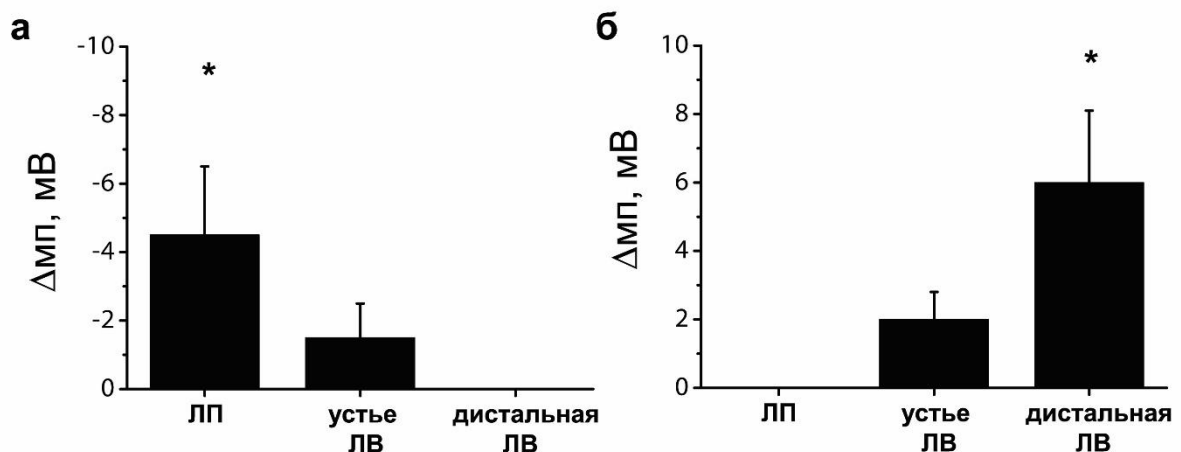


Рис. 4.2.44. Величина гиперполяризации (а), либо деполяризации (б), наблюдаемые в левом предсердии (ЛП), устье легочной вены (ЛВ), а также в дистальном участке легочной вены кролика. * - $p < 0.05$ (ANOVA, при сопоставлении ЛП и дистального участка ЛВ).

4.2.3.2. Влияние ацетилхолина на биоэлектрическую активность легочных вен кролика

Ацетилхолин (АЦХ) в миокардиальной ткани легочных вен у кролика вызывает типичные изменения – снижение длительности ПД, гиперполяризацию ПП. Ацетилхолин вызывает одинаковую гиперполяризацию в левом предсердии, области устья и в дистальных участках легочных вен (Рис. 4.2.45). Однако, степень укорочения ПД при действии АЦХ различается в ЛП и ЛВ. Укорочение ПД, вызванное 1 мкМ АЦХ, одинаково в предсердном миокарде и устье легочной вены (Рис. 4.2.45). Однако снижение длительности ПД (ДПД90%) при действии АЦХ у кроликов в наиболее дистальных отделах миокарда легочных вен оказывается максимальным: на $90 \pm 5\%$ ($n=6$, $p<0,05$).

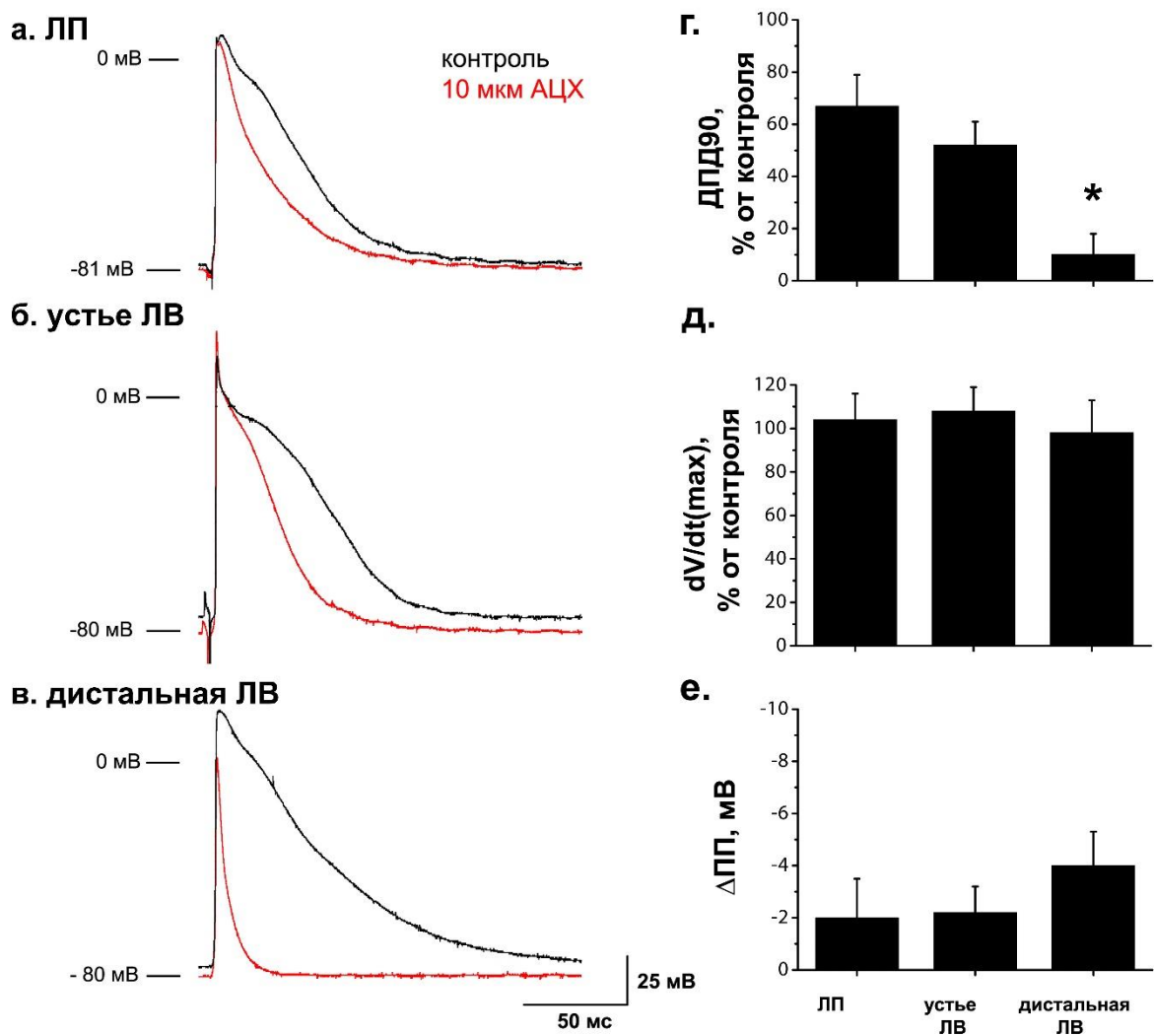


Рис.4.2.45. Влияние ацетилхолина на биоэлектрическую активность миокардиальной ткани легочных вен кролика. **а-в.** Репрезентативные примеры потенциалов действия в левом предсердии (ЛП), устье (устье ЛВ) и дистальном участке легочной вены (дистальная ЛВ) кролика при действии ацетилхолина (АЦХ). Влияние АЦХ на длительность ПД (г), скорость деполяризации (д) и потенциал покоя (е) в рабочем предсердном миокарде и легочных венах кролика. * - $p<0.05$ (ANOVA, при сопоставлении ЛП и дистального участка ЛВ).

В покое миокарде ЛВ кролика АЦХ (1 мкМ) вызывает гиперполяризацию. Величина указанной гиперполяризации в дистальном отделе ЛВ статистически значимо больше ($p < 0,05$, ANOVA), чем в устье ЛВ и в левом предсердии: 10 ± 2 мВ ($n=6$) и $4,5 \pm 2,5$ ($n=6$), 4 ± 2 ($n=6$) мВ, соответственно. В значительной степени, большой эффект АЦХ в дистальном участке ЛВ обусловлен тем, что ПП в покое миокарде деполяризован. При действии АЦХ, как и в течение 10-15 мин после действия АЦХ в миокардиальной ткани ЛВ кролика не наблюдали спонтанных ПД; каких либо форм спонтанной активности ни в одном из экспериментов ($n=6$).

4.2.3.3. Влияние активации адrenoрецепторов на биоэлектрическую активность легочных вен кролика

Влияние норадреналина на ПП в миокардиальной ткани легочных вен кролика

В дистальном участке покоей легочной вены кролика норадреналин вызывает гиперполяризацию. Гиперполяризация поддерживается на протяжении всего времени действия НА, а прекращение его действия сопровождается возвращением ПП (деполяризацией) к значениям, характерным для покоей миокарда ЛВ (-72 ± 3 мВ). Таким образом, действие НА в ЛВ кролика является однофазным. Величина гиперполяризации ПП при действии НА составляет 9 ± 3 мВ ($n=5$, $p < 0,05$).

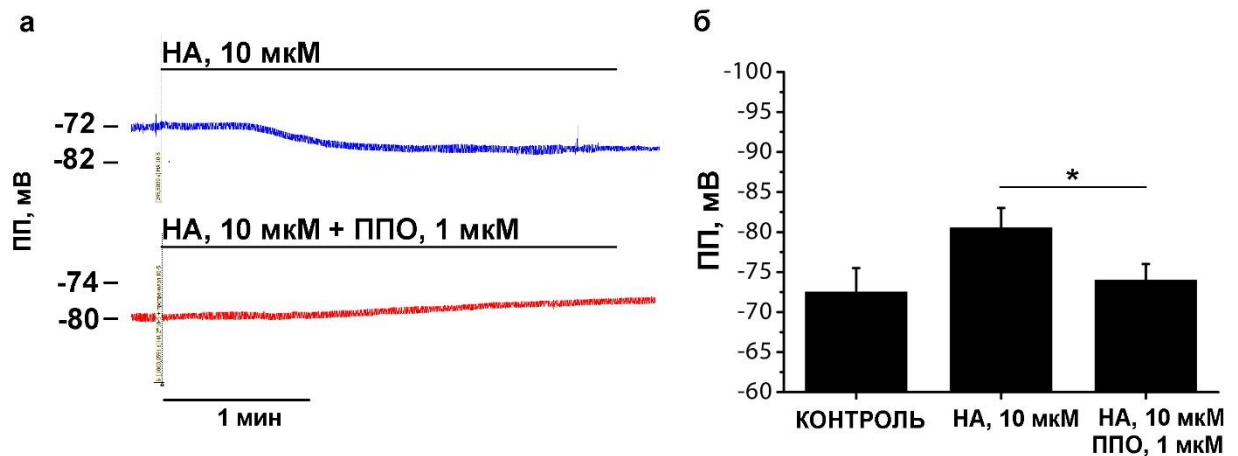


Рис. 4.2.46. Влияние эндогенного агониста адrenoрецепторов норадреналина (НА) на потенциал покоя (ПП) в миокардиальной ткани легочных вен кролика. **а.** Репрезентативные записи, отражающие изменение ПП при действии 10 мкМ НА (сверху) или НА на фоне блокатора адrenoрецепторов β -типа 1 мкМ пропранолола (ППО, снизу) в покоей миокарде ЛВ кролика. **б.** Пропранолол подавляет гиперполяризацию ПП в легочных венах кролика, вызываемую норадреналином. * - $p(T) < 0,05$.

Пропранолол, блокатор адrenoрецепторов β -типа, подавляет изменение ПП (гиперполяризацию), вызванную НА: ПП при одновременном действии НА на фоне ППО

составляет -76 ± 2 мВ ($n=5$, $p < 0,05$, Рис. 4.2.46). Таким образом, гиперполяризация ПП в ЛВ кролика, вызванная НА, обусловлена активацией β -адренорецепторами.

В покое миокарде ЛВ кролика норадреналин в диапазоне концентраций 0,1-10 мкМ не вызывал спонтанных потенциалов действия, залпов ПД или активности в форме аномальной автоматии ни в одном из экспериментов ($n=6$).

Влияние активации β -адренорецепторов на ПП в миокардиальной ткани легочных вен кролика

Агонист адренорецепторов β -типа изопротеренол (ИЗО) вызывал в легочных венах кролика такие же изменения как и НА: при действии 10 мкМ ИЗО гиперполяризация ПП в покое миокарде ЛВ составляла $8-12$ мВ (10 ± 4 , $n=5$, $p < 0,05$). Зависимость величины гиперполяризации ПП от концентрации ИЗО показана на Рис. 4.2.47. Как и НА, изопротеренол не вызывал спонтанных ПД в легочных венах кролика.

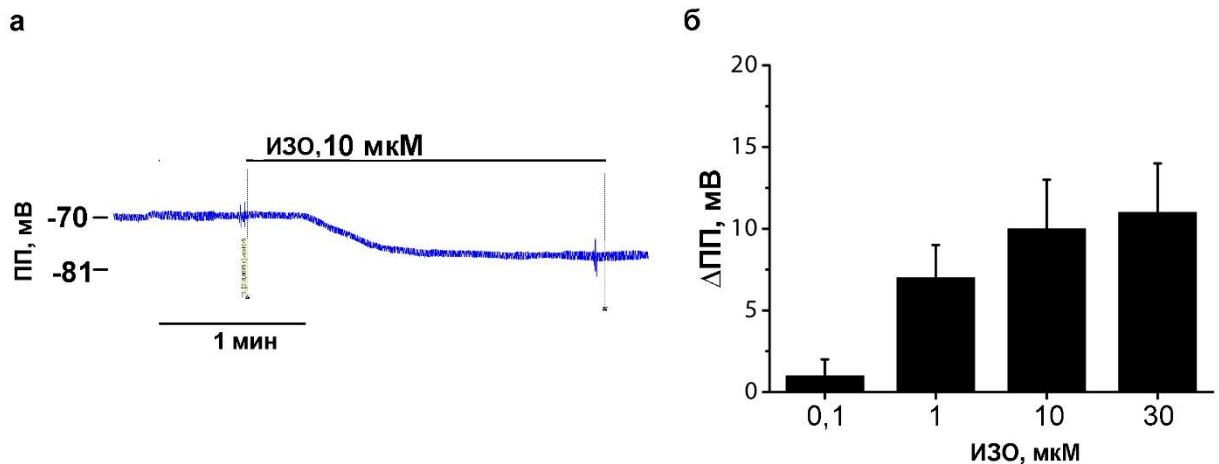


Рис. 4.2.47. Влияние агониста адренорецепторов β -типа изопротеренола (ИЗО) на потенциал покоя (ПП) в миокардиальной ткани легочных вен кролика. **а.** Репрезентативная запись, отражающая изменение ПП при действии 10 мкМ ИЗО в покое миокарде ЛВ кролика. **б.** Величина гиперполяризации ПП в ЛВ кролика при действии ИЗО в диапазоне концентраций 0,1-30 мкМ. * - $p < 0,05$ (однофакторная ANOVA, относительно значения ПП в контрольных условиях).

Влияние активации $\alpha 1$ -адренорецепторов на ПП в миокардиальной ткани легочных вен кролика

Агонист адренорецепторов $\alpha 1$ -типа фенилэфрин (ФЭ) вызывал лишь очень слабые изменения ПП в миокарде ЛВ кролика. Фенилэфрин в диапазоне концентраций 0,1-10 мкМ не влиял на ПП, а в концентрации 20 мкМ вызывал небольшую гиперполяризацию, величина которой составляла 4 ± 2 мкМ (Рис. 4.2.48). Следует отметить, что этот эффект ФЭ развивался медленно – в течение 3-5 мин. Таким образом, в ЛВ кролика ФЭ не вызывал

деполяризации ПП; активация $\alpha 1$ -адренорецепторов приводит к однонаправленному изменению ПП, наблюдаемому при активации адренорецепторов β -типа. При действии ФЭ, как и при действии НА и ИЗО в легочных венах кролика не наблюдали спонтанной активности.

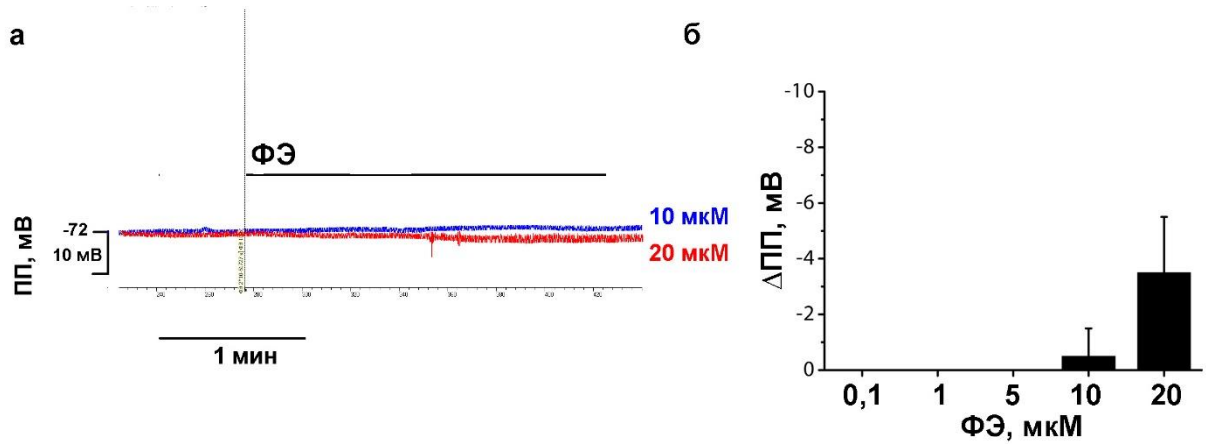


Рис. 4.2.48. Влияние агониста адренорецепторов $\alpha 1$ -типа фенилэфрина (ФЭ) на потенциал покоя (ПП) в миокардиальной ткани легочных вен кролика. **а.** Репрезентативная запись, отражающая изменение ПП при действии 10 и 20 мкМ ФЭ в покоящемся миокарде ЛВ кролика. **б.** Величина гиперполяризации ПП в ЛВ кролика при действии ФЭ в диапазоне концентраций 0,1-20 мкМ. ns – $p > 0,05$ (однофакторная ANOVA, относительно значения ПП в контрольных условиях).

4.2.4. Биоэлектрическая активность миокардиальной ткани легочных вен морской свинки и ее регуляция

4.2.4.1. Общая характеристика биоэлектрической активности миокарда легочных вен морской свинки в разных режимах работы

Миокардиальная ткань в области легочных вен у морской свинки, также как и у кролика, способна генерировать ПД предсердного типа, в том случае, когда электрическая стимуляция осуществляется с помощью электродов, расположенных в предсердной части многоклеточных препаратов, либо когда электроды располагаются непосредственно в легочных венах. В обоих случаях при постоянной стационарной стимуляции с частотой 4 Гц как в устьях, так и в наиболее дистальных участках миокардиальной ткани в легочных венах ПД имеют высокую скорость нарастания фронта (290 ± 43 ($n=5$), 290 ± 51 ($n=5$) и 290 ± 52 ($n=5$) В/с в левом предсердии, устье и дистальной части ЛВ, соответственно), конфигурацию, характерную для рабочего миокарда, стабильный потенциал покоя, близкий к таковому в левом предсердии (-78 ± 5 ($n=5$), -78 ± 5 ($n=5$) и -78 ± 5 ($n=5$) мВ, соответственно).

Длительность ПД (ДПД90%) у морской свинки в 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 в миокардиальных рукавах легочных вен у морской свинки выше, чем в предсердном миокарде (Рис. 4.2.49. и Рис. 4.2.50).

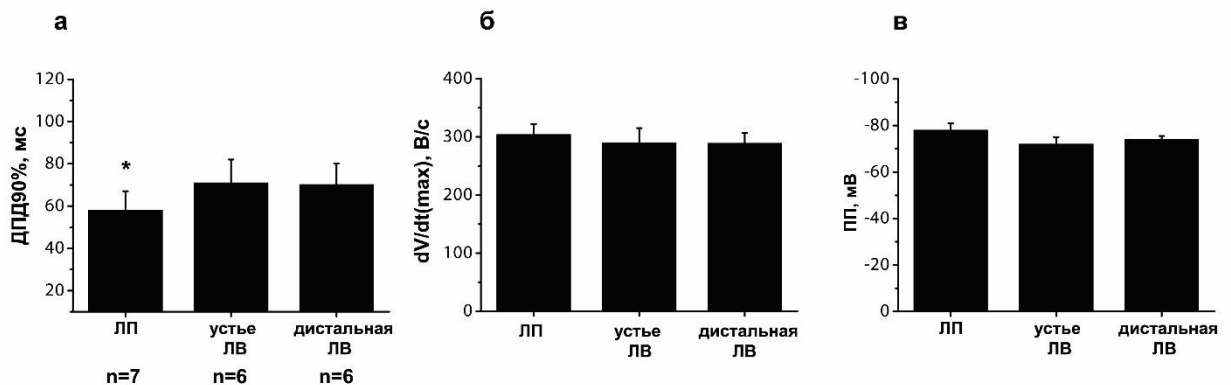


Рис. 4.2.49. Характеристики потенциалов действия и уровень потенциала покоя (ПП) в области устьев легочных вен (устье ЛВ), дистальных участках миокардиальных рукавов легочных вен, а также в левом предсердии (ЛП) морской свинки. **а.** Длительность потенциалов действия на уровне 90% реполяризации (ДПД90%); **б.** Максимальная скорость фронта ПД ($dV/dt(max)$); **в.** Значение ПП. * - $p < 0.05$ (однофакторный дисперсионный анализ, ANOVA).

Прекращение стационарной непрерывной электрической стимуляции и, соответственно, прекращение генерации ПД в ткани легочных вен приводит изменениям потенциала покоя. В дистальных участках переход в покоящийся режим легочных вен у

морской свинки приводит к спонтанному сдвигу ПП к более положительным значениям, чем в режиме генерации ПД – спонтанной деполяризации. Эта деполяризация развивается в течение $1,5 \pm 1$ мин и составляет $10 \pm 2,4$ мВ ($n=5$, $p<0,05$, Рис.4.2.50). В проксимальном участке ЛВ кролика спонтанная деполяризация гораздо меньше ($1,8 \pm 1,4$ мВ, $n=5$). Гиперполяризации ПП в области устья ЛВ у морских свинок не наблюдается. Переход миокарда ЛП в покоящийся режим сопровождается небольшой гиперполяризацией ПП ($4,5 \pm 1,4$ мВ, $p<0,05$, $n=6$), после которой значения ПП возвращается к таковому, наблюдаемому при электрической стимуляции (-78 ± 2 мВ, $n=6$). Таким образом, изменение режима работы в легочных венах и предсердном миокарде у морской свинки, как и у кролика, сопровождаются разными изменениями ПП.

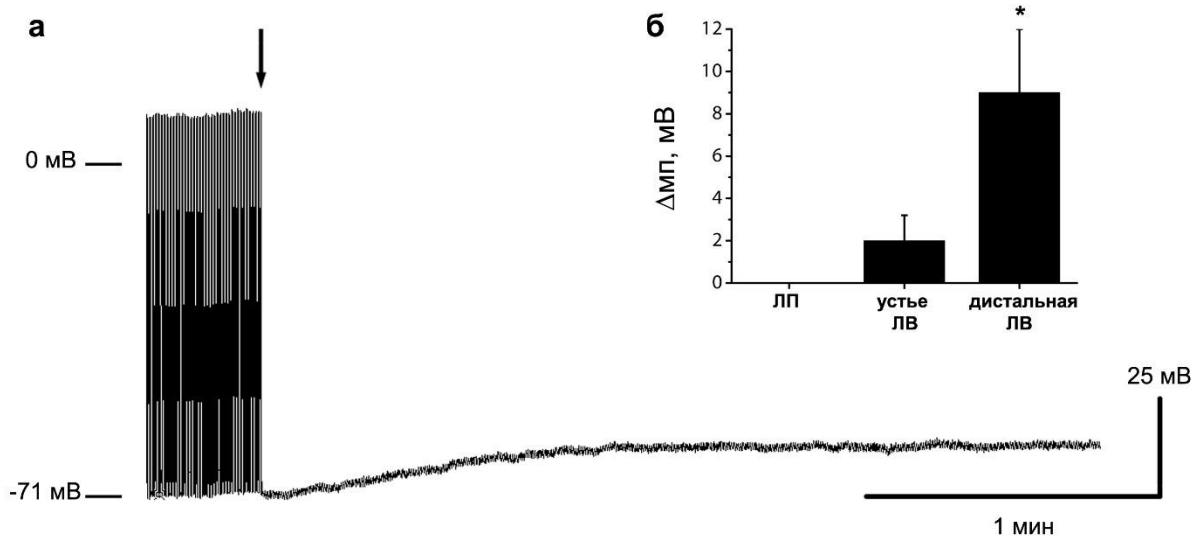


Рис. 4.2.50. Репрезентативный пример записи, отражающий изменение мембранного потенциала покоя (ПП) в миокардиальной ткани легочных вен морской свинки. **а.** Прекращение электрической стимуляции (момент прекращения стимуляции и генерации ПД обозначен стрелкой) и переход миокардиальной ткани в покоящееся состояние в дистальном участке легочных вен сопровождается спонтанной деполяризацией ПП. **б.** Сдвиг ПП после прекращения стимуляции в левом предсердии, устье и дистальном участке легочной вены морской свинки. * - $p<0.05$ (однофакторный дисперсионный анализ, ANOVA).

4.2.4.2. Влияние ацетилхолина на биоэлектрическую активность легочных вен морской свинки

Ацетилхолин (АЦХ) в миокардиальной ткани легочных вен у морской свинки вызывает снижение длительности ПД и гиперполяризацию (Рис. 4.2.51, Рис. 4.2.52) ПП. Эффекты ацетилхолина различаются статистически значимо в предсердном миокарде и миокарде легочных вен. Снижение длительности ПД (ДПД90%) при действии 1 мкМ АЦХ у морских свинок в ЛВ составляет $80 \pm 5\%$ ($n=6$), в то время как уменьшение ДПД90% в

левом предсердии только $55 \pm 5\%$ ($n=6$). Гиперполяризация ПП при действии АЦХ (1 мкМ) в ЛВ достигает $5,5 \pm 2$ мВ ($n=6$), в то время как в ЛП – $2,5 \pm 2$ мВ ($n=6$).

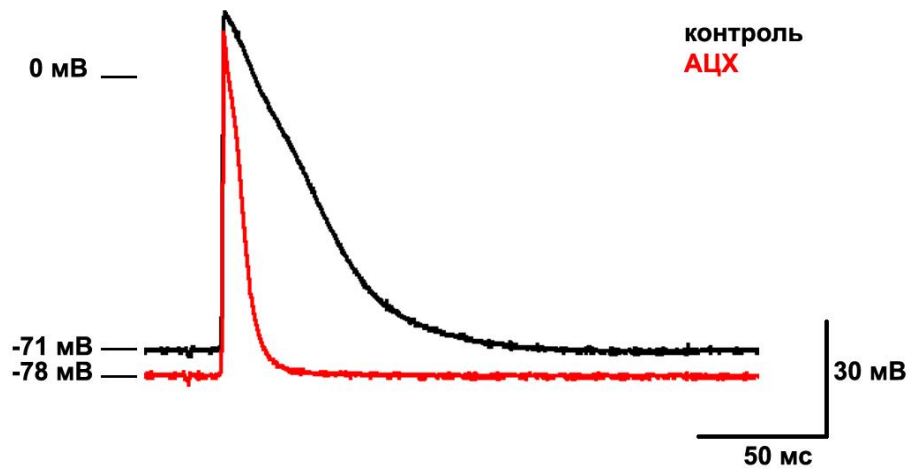


Рис. 4.2.51. Влияние ацетилхолина на биоэлектрическую активность миокардиальной ткани легочных вен морской свинки. Репрезентативные примеры потенциалов действия в дистальном участке легочной вены морской свинки в контроле и при действии ацетилхолина (10 мкМ АЦХ).

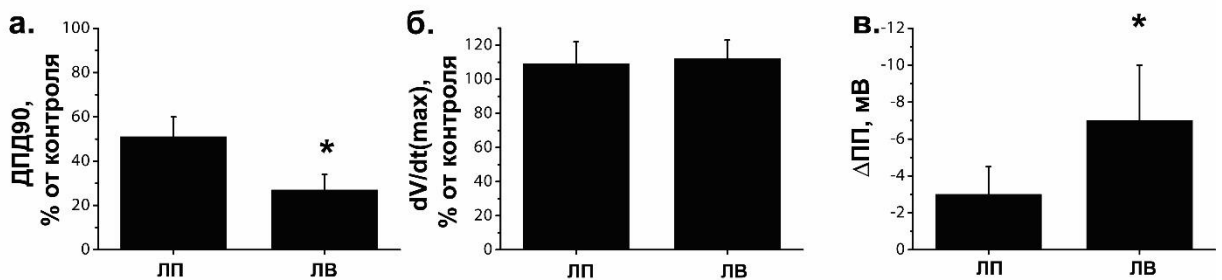


Рис. 4.2.52. Влияние АЦХ (10 мкМ) на длительность ПД (а), скорость деполяризации (б) и потенциал покоя (в) в рабочем предсердном миокарде и легочных венах морской свинки. * - $P < 0.05$ (U-тест, при сопоставлении ЛП и ЛВ).

В покое миокарде ЛВ морской свинки АЦХ (1 мкМ) также вызывает гиперполяризацию. Величина указанной гиперполяризации в ЛВ статистически значимо больше ($p < 0,05$), чем в левом предсердии: 12 ± 2 мВ ($n=6$) и $6,5 \pm 2,5$ ($n=6$), соответственно. Гиперполяризация ПП при действии АЦХ больше в легочных венах (как в случае покоей, так и в случае электрически возбуждаемой ткани), так как здесь исходное значение потенциала покоя более положительно, чем в предсердном миокарде.

При действии АЦХ, как и в течение 10-15 мин после прекращения его действия, в миокардиальной ткани ЛВ морской свинки не наблюдали спонтанных ПД, а также каких-либо форм спонтанной активности ни в одном из экспериментов (n=6).

4.3. ХРОНОТОПОГРАФИЯ АКТИВАЦИИ МИОКАРДИАЛЬНОЙ ТКАНИ ЛЕГОЧНЫХ ВЕН

Хронотопография активации (возбуждения) миокардиальных рукавов легочных вен исследована у четырех видов животных: крыса, мышь, кролик, морская свинка. Эти виды животных относятся двум разным отрядам (грызуны, зайцеобразные) и демонстрируют особенности биоэлектрической активности и строения легочных вен.

4.3.1. Распространение возбуждения в миокардиальной ткани легочных вен крысы

4.3.1.1. Проведение возбуждения в различных отделах легочных вен крысы

У крыс способностью проводить волну возбуждения обладают все участки легочных вен. Как при естественном способе активации, т.е. в результате поступления возбуждения из САУ и правого предсердия, так и при искусственной активации, вызываемой нанесением возбуждающих электрических импульсов от биполярных электродов, расположенных в миокарде левого предсердия, волна возбуждения распространяется от предсердной части препарата через область устья в проксимальные и дистальные отделы легочных вен, включая внутрилегочные участки ЛВ.

В том случае, когда частота нанесения возбуждающих электрических стимулов была близка к естественной частоте возбуждений, генерируемых САУ (180-400 удм/мин или 3,3-6,6 Гц), предсердный миокард и миокард легочных вен крысы незначительно различались по таким макроскопическим параметрам как время активации (1, t_{act}) и средняя (2, θ_{cp}) скорость проведения.

Максимальная (3, θ_m) скорость проведения возбуждения, рассчитываемая локально в участках ткани, может быть рассмотрена как «микроскопический» параметр. В левом предсердии θ_m рассчитанная на основе данных оптического картирования, составляла 84 ± 14 см/с ($n=15$), что несколько больше, чем θ_m , рассчитанная для общего ствола (участка ЛВ от устья до первой бифуркации) легочной вены, где она составила - 71 ± 11 см/с ($n=7$, $p > 0,05$). Средняя скорость проведения возбуждения оказалась сходной в ЛВ левой легочной доли, вене правой легочной доли и вене добавочной доли легких.

Более того, скорость проведения возбуждения в ЛВ при антероградном (т.е. при активации со стороны левого предсердия) и ретроградном проведении (т.е. при стимуляции дистальной области ЛВ) практически не различалась. Максимальная анетроградная и ретроградная скорости в стволе ЛВ составили 71 ± 11 ($n=7$) и 73 ± 11 см/с ($n=3$) соответственно. Средняя антероградная и ретроградная скорости проведения составляли 50 ± 5 ($n=7$) и 48 ± 5 см/с ($n=6$, $p > 0,05$).

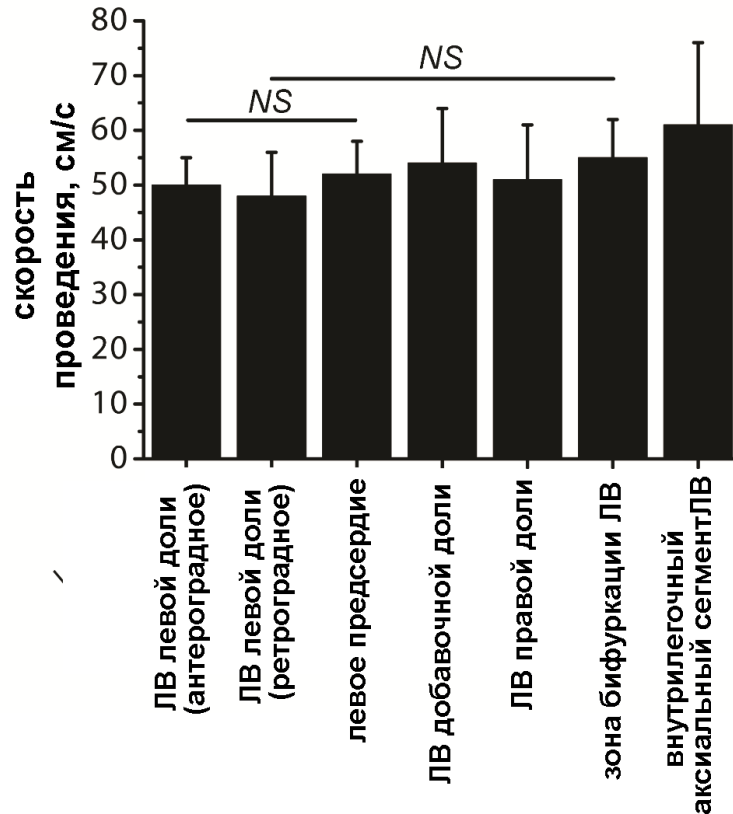


Рис. 4.3.1. Средняя скорость распространения волны возбуждения в левом предсердии и различных участках легочных вен при антероградном и ретроградном проведении. Скорость проведения рассчитана на основе данных оптического картирования при стационарной «ритмической» активации с длительностью цикла (S1S1) 300 мс. NS – статистически незначимо (однофакторная ANOVA с апостериорным тестом Крускала-Уоллиса). А – антероградный, Р – ретроградный режим активации.

С учетом того, что легочные вены имеют сложную анатомическую организацию, нами отдельно рассмотрены особенности проведения волны возбуждения в стволе, ветвях, областях бифуркации ЛВ, а также во внутрилегочных участках ЛВ.

При стационарном режиме активации общий ствол легочной вены проводит волну возбуждения как в антероградном, так и в ретроградном направлении (Рис. 4.3.1). Паттерн активации общего ствола легочных вен у крыс сходен с таковым в т.н. «свободной» стенке левого предсердия (участок «крыши» предсердия, имеющий гладкую, нетрабекуляризованную стенку). Для миокарда свободной стенки левого предсердия характерна высокая степень «однородности» и линейности проведения возбуждения (Рис. 4.3.2). Коэффициент неоднородности по скорости проведения k , рассчитанный для левого предсердия равен $1,62 \pm 0,09$ ($n=5$), для сегмента ствола легочных вен - $1,92 \pm 0,21$ ($n=7$).

Следует подчеркнуть, что при стационарном режиме активации ни в одном из экспериментов как при антероградном ($n=6$), так и при ретроградном ($n=7$) направлении распространения волны возбуждения в области устья ЛВ (иначе, в «переходной» зоне) не

наблюдалось блоков проведения. Т.е. волна возбуждения, распространяющаяся ретроградно во всех случаях, охватывала миокард левого предсердия. Таким образом, устье легочных вен у крыс не является критической зоной для проведения возбуждения, по крайней мере, при стационарном режиме активации и длительности цикла 150-300 мс.

При ретроградной активации ни в одном из экспериментов не наблюдали снижения скорости проведения в области устья вены. Однако при антероградном проведении в части экспериментов (2 из 9) в переходной зоне наблюдали снижение скорости проведения и задержку активации предсердия (Рис .4.2.2, Б, отмечено символом «3»).

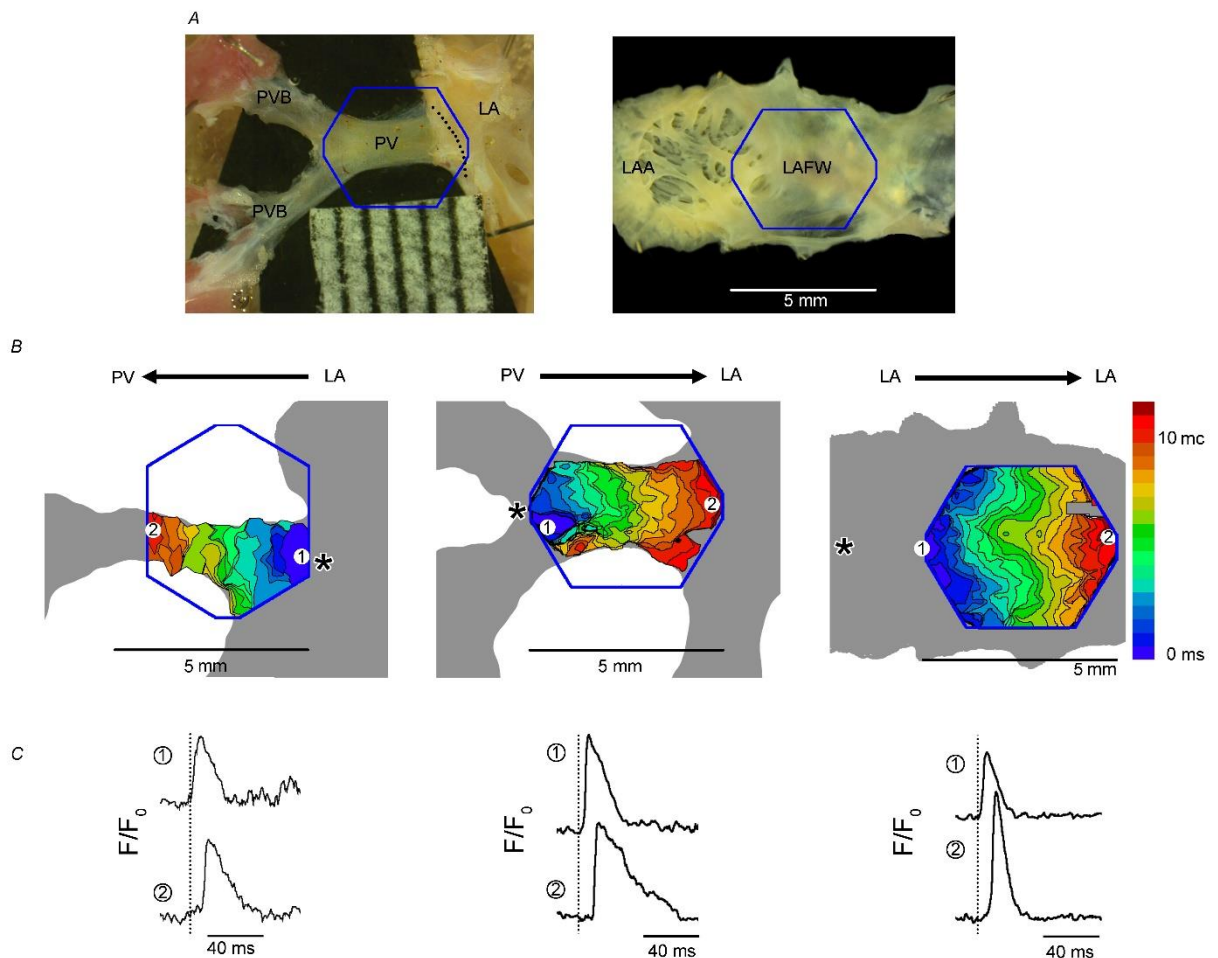


Рис. 4.3.2. Антероградное и ретроградное проведение волны возбуждения в области устья и в общем стволе легочной вены (ЛВ) крысы. **А.** Фотографии картируемого участка (ограничен синим многогранником) легочной вены левой доли легкого (слева) и левого предсердия (справа). Пунктирная линия – анатомическая граница ЛВ и предсердия. **В.** Изохронные карты активации устья и общего ствола ЛВ при антероградном (слева) и ретроградном (в центре) проведении возбуждения, а также карта активации гладкостенного участка левого предсердия (справа). **С.** Оптические сигналы, регистрируемые в точках, отмеченных в изохронных картах активации (1 – в области устья вены, 2 – в дистальной части ствола ЛВ). Вертикальной пунктирной линией отмечен момент времени, соответствующий возбуждению в точке «1». LA – левое предсердие, LAA – ушко левого предсердия, LAFW – стенка левого предсердия, PVB – ветвь легочной вены (PV). * – место расположения стимулирующих электродов. F/F₀ – нормализованная флуоресценция.

В отдельной серии экспериментов оценивали проведение возбуждения в области бифуркаций легочных вен. Как и в устье, в областях бифуркаций ЛВ волна возбуждения распространяется без заметных задержек и блоков проведения при стационарном режиме активации (Рис. 4.3.3). В области бифуркаций ЛВ волна возбуждения способна распространяться как в антероградном, так и в ретроградном направлении (n=6). В наших экспериментах активация одной из ветвей ЛВ всегда приводила к возбуждению остальных ветвей ЛВ. Такой паттерн активации можно рассматривать как разновидность возвратного возбуждения или анатомического re-entry. Активация одной из ветвей ЛВ всегда приводила к ретроградной активации основного ствола вены, левого предсердия и, соответственно, легочных вен остальных легочных долей (n=3). Скорость проведения возбуждения в области бифуркации составляла 55 ± 7 см/с (n=6).

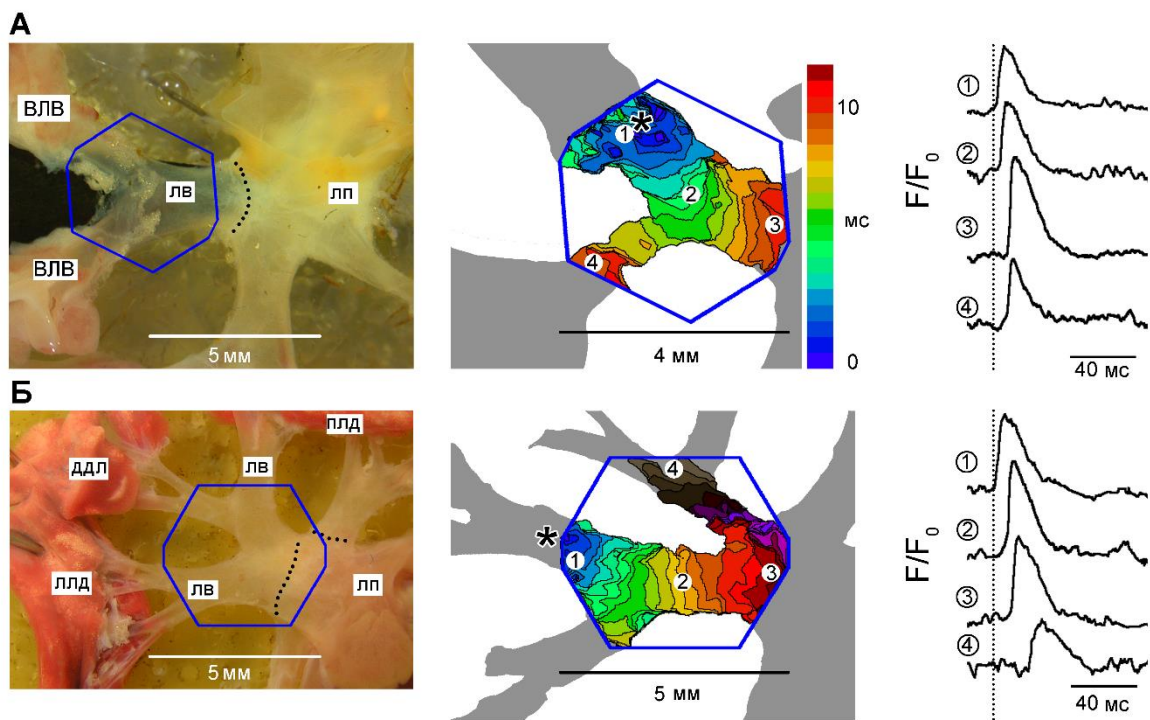


Рис. 4.3.3. Ретроградное проведение волны возбуждения в области бифуркации и в устье легочной вены (ЛВ) крысы. **А.** Хронотопография возбуждения в зоне бифуркации ЛВ. **Б.** Возвратная активация легочной вены. *Слева* - фотографии картируемого участка (ограничен синим многогранником) легочной вены левой доли легкого). Пунктирная линия – анатомическая граница ЛВ и предсердия. В центре - изохронные карты активации ЛВ при ретроградном проведении возбуждения. *Справа* - оптические сигналы, регистрируемые в точках, отмеченных в изохронных картах активации (1 - 4). Вертикальной пунктирной линией отмечен момент времени, соответствующий возбуждению в точке «1». * - место расположения стимулирующих электродов. F/F_0 – нормализованная флюоресценция. ЛП – левое предсердие; ВЛВ – ветвь легочной вены; ДДЛ – добавочная легочная доля; ПЛД – правая легочная доля, ЛЛД – левая легочная доля.

Следует отметить, что паттерн активации ЛВ, характер проведения и значения скорости проведения возбуждения в области устья и бифуркаций ЛВ при стационарной стимуляции сохранялись от цикла к циклу на протяжении 1 ч и более.

На Рис. 4.3.4. приведен репрезентативный пример карты активации аксиальной легочной вены левой доли легкого, то есть «внутрилегочного» участка ЛВ. При стационарном режиме активации возбуждение охватывает участок легочной вены от места вхождения (хилума) вплоть до ее бифуркации внутри доли легкого. Амплитуда оптических сигналов (оптических ПД) снижается по направлению от хилума к бифуркации внутрилегочного участка, что, вероятно, обусловлено снижением толщины миокардиальной обкладки вены по мере углубления в ткань доли легкого. Тем не менее, скорость проведения возбуждения по мере углубления в легкое в легочной вене не снижается ($P > 0.05$, $n=5$), и более того, оказывается незначительно выше, чем в миокарде левого предсердия во внелегочном участке ЛВ (Рис. 4.1). В дистальном отделе аксиальной внутрилегочной вены скорость проведения возбуждения составляет 61 ± 15 мс/с.

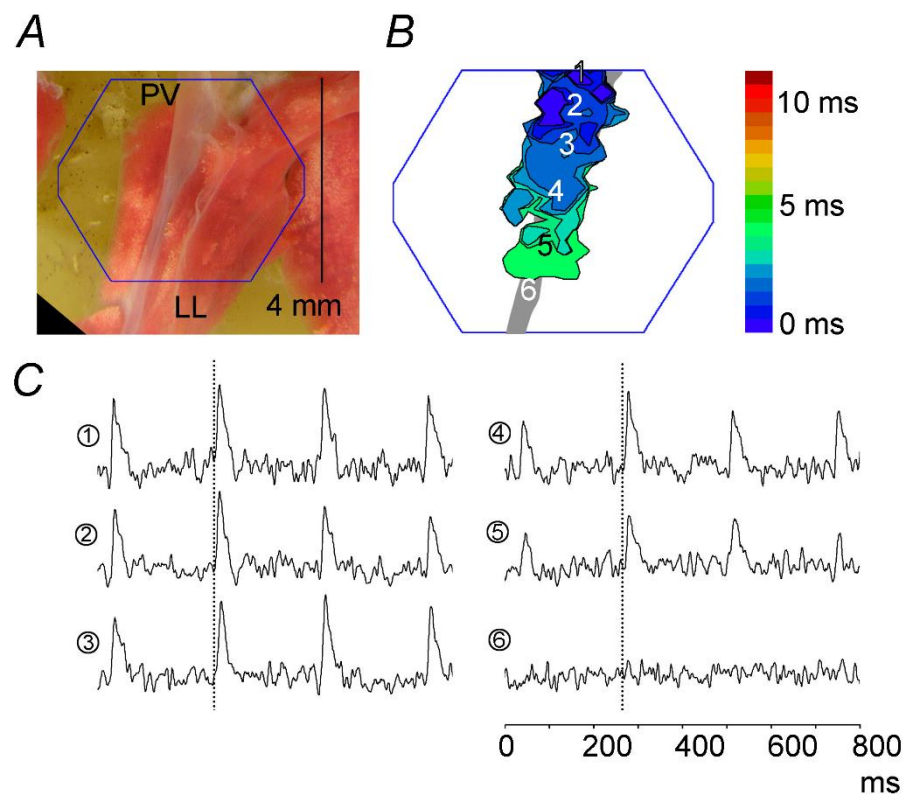


Рис. 4.3.4. Активация и проведение волны возбуждения в аксиальной внутрилегочной вене крысы. **А.** Фотография картируемого участка аксиальной вены левой доли легкого. **В.** Изохронная карта активации внутрилегочного участка ЛВ. **С.** Оптические сигналы, регистрируемые во внутрилегочном участке ЛВ в точках (1-6), отмеченных на изохронной карте. LL – левая доля легкого; PV – легочная вена.

4.3.1.2. Локальная гетерогенность проведения волны возбуждения в изолированных сегментах стенки легочных вен

Нарушение интактности миокардиального рукава легочной вены, изменение натяжения и/или напряжения в стенке вены существенно влияет на способность ткани к проведению волны возбуждения. Паттерн активации в развернутых, изолированных сегментах ствола легочной вены отличается повышенной гетерогенностью по сравнению с таковым, наблюдаемым в интактных легочновенозных препаратах.

При стационарном режиме активации в сегментах ЛВ во всех экспериментах ($n=7$) были обнаружены участки, характеризующиеся значительным снижением скорости проведения, а также зоны с полным прекращением проведения (Рис. 4.3.5, *справа*), которые могут быть представлены как частичные либо полные «блоки» проведения возбуждения. Амплитуда оптических сигналов в зонах существенно ниже, чем в окружающей ткани, демонстрирующей «нормальное» проведение (Рис.4.3.5.). Низкая амплитуда сигнала обусловлена тем, что в данных областях изменение мембранного потенциала происходит пассивно, за счет электротонических воздействий.

Зоны нарушенного проведения в сегментах ЛВ имели различную локализацию и протяженность. Локализация блоков оставалась стабильной в последовательных циклах активации ткани на протяжении всего эксперимента. В части (2 из 7) экспериментов зоны нарушенного проведения «пересекали» всю картируемую область (Рис.4.3.6, *справа*, «1»).

В большей части (5 из 7) случаев участки нарушенного проведения выявлялись только в небольшом, протяженностью 1,5-3 мм ($2,2\pm 0,8$ мм), участке картируемого сегмента ЛВ (Рис.4.3.6, *справа*, «2, 3»). Наличие частичных или полных блоков проведения приводит к фракционированию и искривлению фронта волны возбуждения. Время активации в сегментах ЛВ было больше, чем в препаратах левого предсердия: $14\pm 2,7$ и $10,4\pm 3,5$ мс, соответственно. Увеличение t_{act} , вероятно, связано с наличием блоков проведения возбуждения. Соответственно, $\theta_{ср}$ в сегментах ЛВ была существенно ниже, чем в интактных препаратах - - 37 ± 7 см/с.

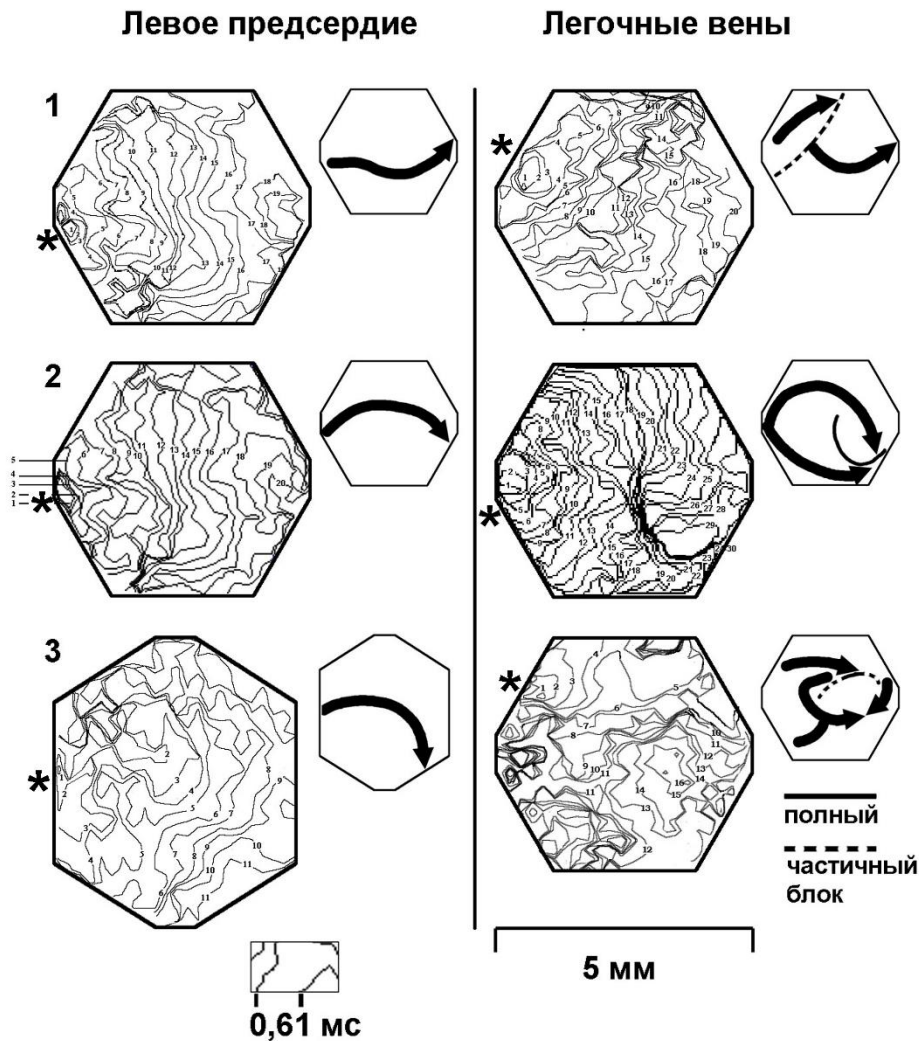


Рис. 4.3.5. Репрезентативные примеры карты антероградной активации стенки сегмента ствола легочной вены при стационарном режиме стимуляции (длительность цикла – 300 мс). На вставках (справа от каждой изохронной карты) показано преимущественное направление проведения (стрелкой), а также локализация частичных и полных блоков проведения возбуждения. Слева даны репрезентативные примеры изохронных карт активации гладкостенного участка левого предсердия. *- место расположения стимулирующих электродов.

4.3.1.3. Длина волны возбуждения в миокардиальной ткани легочных вен при стационарной активации

Для расчета длины волны возбуждения (λ) использовали данные о скорости проведения полученные с помощью оптического картирования. Данные о длительности рефрактерности получали с помощью микроэлектродной техники, поскольку длительность флуоресцентных сигналов (оптических ПД) значительно отличается от реальных значений длительностей ПД. Следует учесть, что величина рефрактерного периода (РП) различна в разных участках миокардиальной обкладки легочных вен, а также зависит от протокола его оценки. Длительность РП в данной серии экспериментов определяли в центральной части

ствола ЛВ левой легочной доли, а также в гладкостеночной части левого предсердия при использовании динамического протокола. Рефрактерный период в левом предсердии составил 44 ± 3 мс ($n=10$), в легочных венах 60 ± 3 мс ($n=15$). Длительность РП в левом предсердии значительно меньше ($p(U) < 0.05$), чем в легочной вене. Однако, длина волны в предсердии и легочных венах оказывается одинаковой. Величина λ_r , рассчитанная с использованием θ_{sr} , для левого предсердия равняется $22,9 \pm 4$ мм, для легочных вен – $22,2 \pm 6$ мм. В свою очередь, λ_m , рассчитанная с использованием θ_m , для левого предсердия составляет 37 ± 5 мм, для легочных вен – $42,6 \pm 7$ мм (Рис. 4.3.7). Таким образом, λ в предсердном миокарде и миокарде ЛВ практически одинаковы ($p > 0,1$). Следует отметить, что длины волн, рассчитанные на основе θ_r и θ_m , различаются практически в два раза.

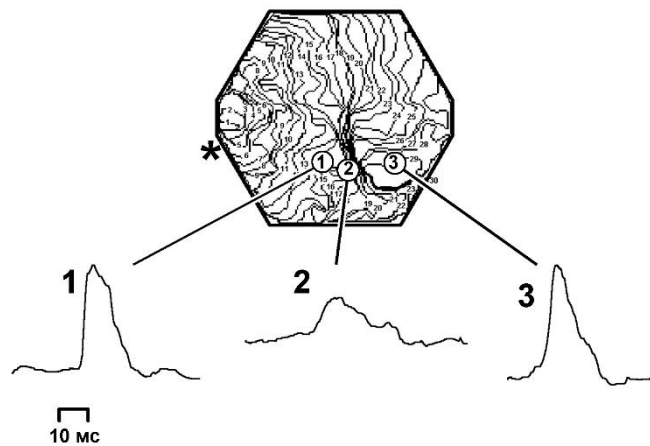


Рис. 4.3.6. Оптические сигналы в участках с «нормальным» проведением и в зонах блока в сегменте стенки легочной вены крысы. 1, 2 – оптические ПД (сигналы) из областей, демонстрирующих быстрое проведение волны возбуждения; 3 – пример оптического ПД из зоны блока проведения. *- место расположения стимулирующих электродов.

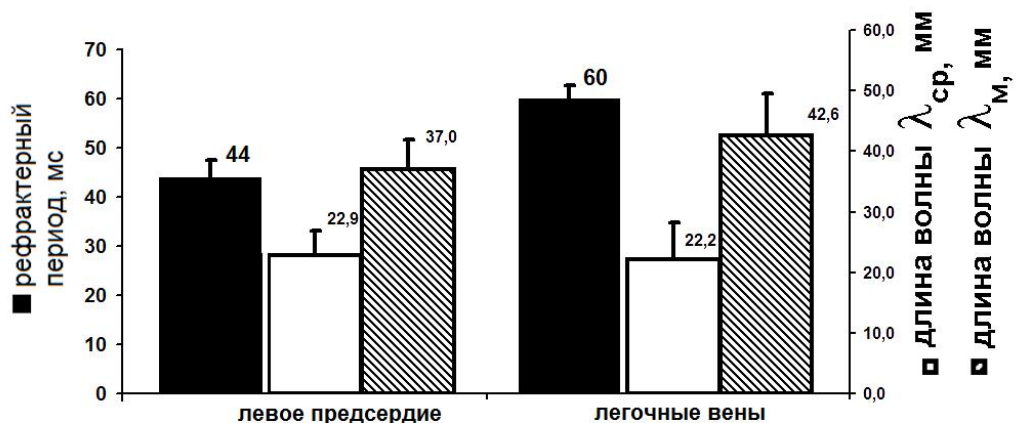


Рис. 4.3.7. Длительность рефрактерного периода и длина волны возбуждения в миокарде легочных вен крысы.

4.3.1.4. Влияние режима активации на проведение возбуждения в миокардиальной ткани легочных вен

Нарушение стабильности и периодичности активации существенным образом влияет на характер проведения возбуждения в легочных венах. Кратковременное прекращение стационарной стимуляции ($S1S1=300$ мс), приводит к нарушению проведения возбуждения при последующем возобновлении ритмического возбуждения в ЛВ, но не в предсердном миокарде. В части экспериментов, прекращение электрической стимуляции и переход миокардиальной ткани ЛВ в покоеющееся состояние приводит к снижению скорости проведения возбуждения на $17\pm 6\%$ ($p < 0.05$, $n=7$, Рис.4.3.8, Рис.4.3.9 А, Б). Важно, что увеличение периода покоя от 1 вплоть до 5 мин не влияло на скорость проведения возбуждения после восстановления электрической стимуляции ЛВ. При возобновлении стационарной электрической стимуляции восстановление исходной скорости, после периода сниженной скорости проведения, происходило в течение 6 ± 2 мин ($n=7$). Периоды покоя не индуцировали снижения скорости проведения в рабочем миокарде левого предсердия ($p > 0.5$, $n=5$).

Снижение скорости проведения в ЛВ крысы после периода покоя обусловлено спонтанной деполяризацией потенциала покоя.

Следует отметить, что более длительный период покоя 10-15 мин и более приводит к прекращению проведения возбуждения в проксимальных и дистальных отделах ЛВ крысы, т.е. развитию невозбудимости.

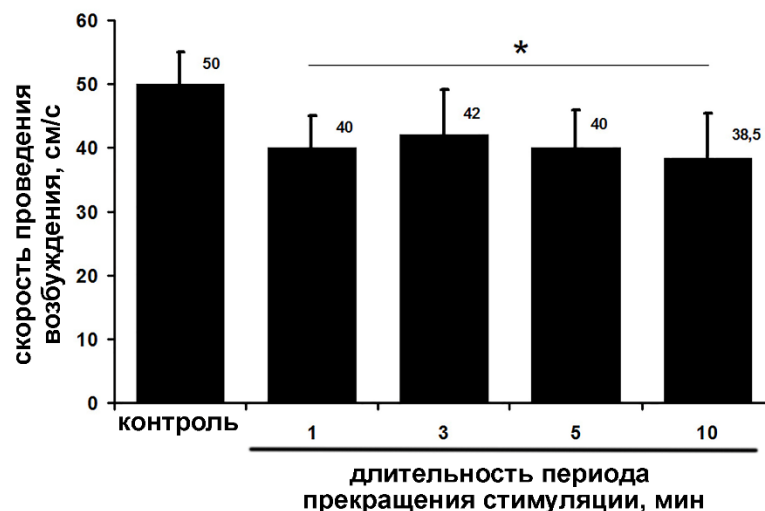


Рис. 4.3.8. Влияние кратковременного (1-10 мин) прекращения электрической стационарной стимуляции ($S1S1$) на скорость проведения возбуждения на ЛВ. Переход миокарда ЛВ в покоеющееся состояние приводит к снижению скорости проведения возбуждения, наблюдаемой при восстановлении стимуляции.

Кратковременный переход в покое состояние (1 мин) в части препаратов ЛВ (n=3) приводил возникновению транзиторных, функциональных блоков проведения. Такие блоки при возобновлении стимуляции возникали только в области бифуркации легочных вен или в ветвях легочной вены (Рис.4.3.9. В, Г, Таблица 1). Проведение возбуждения в области бифуркации возобновлялось в течение 4 ± 2 мин стационарной стимуляции. Контроль – скорость проведения возбуждения при стационарной активации. 1-10 – длительность периода покоя в мин. * - $p < 0.05$ (однофакторная ANOVA, контроль vs любой интервал покоя).

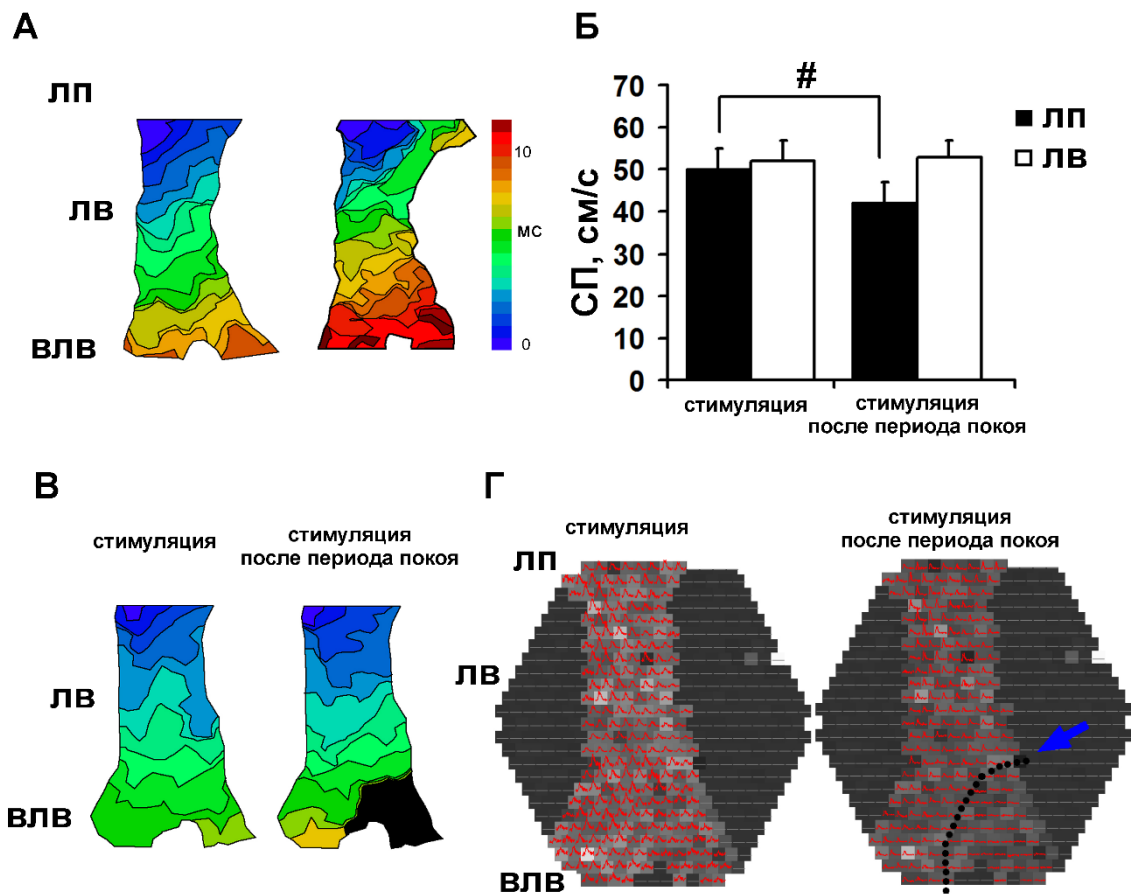


Рис. 4.3.9. Влияние нарушения периодичности активации на проведение возбуждения в миокарде легочных вен. **А.** Примеры изохронных карт активации миокарда ЛВ при стационарной стимуляции ($S1S1=300$ мс, слева) и в первую минуту после периода покоя длительностью в 1 мин (справа). **Б.** Кратковременное прекращение регулярной стимуляции вызывает снижение скорости проведения (СП) в ЛВ, но не предсердном миокарде (ЛП). **В.** Пример изохронной карты активации ЛВ в том случае, когда кратковременное прекращение ритмической стимуляции и активации (слева) индуцирует блоки проведения возбуждения (справа). **Г.** Прекращение ритмической стимуляции индуцирует возникновение областей функциональной невозбудимости в части миокарда ЛВ. Показаны области съемки PDA-матрицы и оптические ПД, регистрируемые каждым фотодиодом. Стрелка и пунктирная линия отграничивают невозбудимую зону в миокарде ЛВ. ВЛВ – ветвь легочной вены. # - $p < 0.05$ (двухфакторная ANOVA).

4.3.1.5. Хронотопография возбуждения в миокарде легочных вен при нестационарной активации

Характер проведения возбуждения и паттерн активации в легочных венах слабо изменяется при уменьшении длительности интервалов между возбуждающими импульсами от 500 до 70 ± 10 мс при использовании т.н. динамического протокола стимуляции. Дальнейшее уменьшение межимпульсных интервалов ($S1S1 < 70$ мс) приводит к возникновению циклических изменений паттерна активации и длительностей ПД (ДПД) в большинстве экспериментов (11 из 13). Такие повторяющиеся в последовательных циклах возбуждений изменения параметров электрической активности, т.е. осцилляции (иначе поударные альтернации - «beat-to-beat alternans»), 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 легочных венах указывает на функциональную, динамическую неоднородность данной ткани при интервалах стимуляции близких к ФРП.

В том случае, когда длительность периода между возбуждающими стимулами устанавливали на 2-5 мс меньше длительности ФРП, в миокарде всегда ЛВ устанавливалась периодика Венкебаха. В таких случаях блок возбуждения в ответ на каждый второй импульс происходил 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 значительно и 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 в данной серии). Следует, однако, отметить, что при активации с интервалом равным ФРП значительно возрастал пространственный разброс локальных скоростей (θ_m) проведения в ЛВ (что наглядно демонстрирует разброс изохронных линий на картах активации - Рис.4.3.11). Поэтому, уменьшение θ_{cr} лишь отчасти отражает изменения, вызываемые ростом частоты активации в ЛВ.

Осцилляции электрической активности возникали не во всех препаратах легочных вен. На рис. 4.1.10 приведены примеры, демонстрирующие стабильность паттерна активации и ДПД в основном стволе, зоне бифуркации и ветвях ЛВ при длительности межимпульсных интервалов равной ФРП.

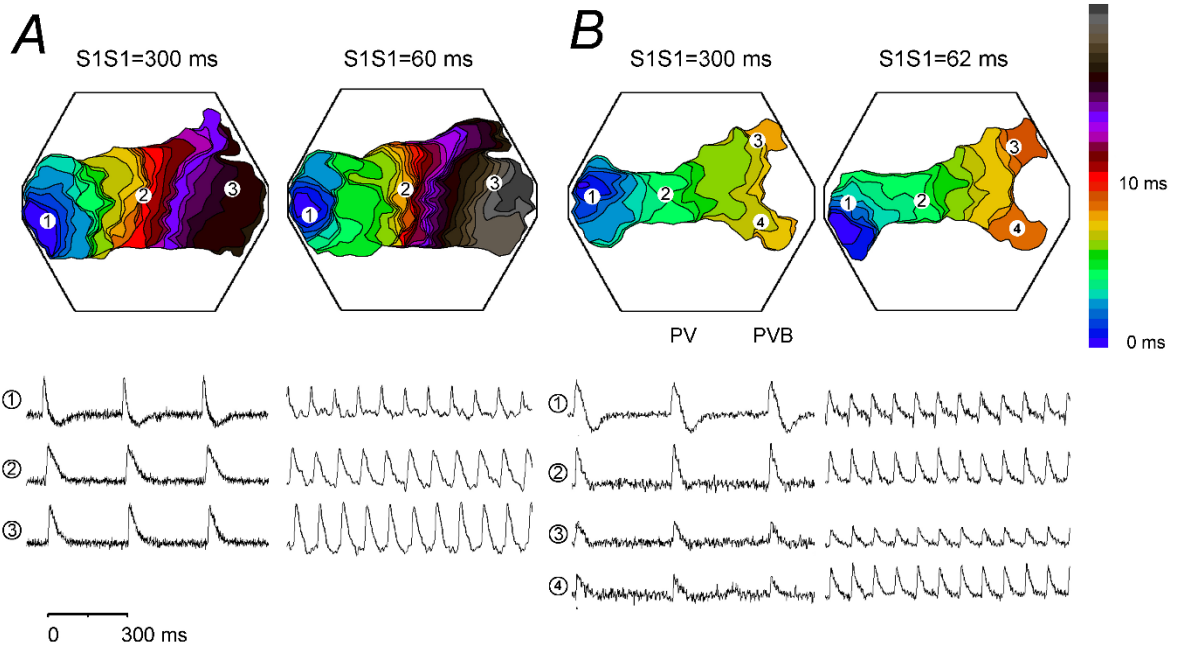


Рис. 4.3.10. Репрезентативные примеры изохронных карт активации (*сверху*) в двух препаратах легочных вен крысы при длительности между возбуждающими стимулами 300 мс (*слева в А и В*), а также при величине межимпульсного интервала равной длительности функционального рефрактерного периода (*справа в А и В*, 60 и 62 мс). Снизу показаны записи оптических ПД для нескольких последовательных циклов возбуждения, регистрируемые в точках, отмеченных в изохронных картах активации (1 – в области устья вены, 2 – в общем стволе легочной вены, 3 – в области бифуркации или ветвях ЛВ) при двух разных длительностях циклов активации. PV – легочная вена, PVB – ветви легочных вен.

Как указано выше, осцилляции паттерна активации и ДПД возникали в большей части экспериментов и наблюдались на уровне общего ствола или ветвей ЛВ (Рис. 4.3.11). 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 (Рис. 4.3.12).

Активация с интервалами близкими к ФРП в части экспериментов приводила к индукции блоков проведения возбуждения в ветвях, но не в стволе или области устья легочных вен. В части экспериментов динамически-индуцированные (функциональные) блоки проведения возникали циклически, реципрокно (поочередно) в одной из двух ветвей основного ствола ЛВ в дополнение к альтернациям хронотопографии возбуждения.

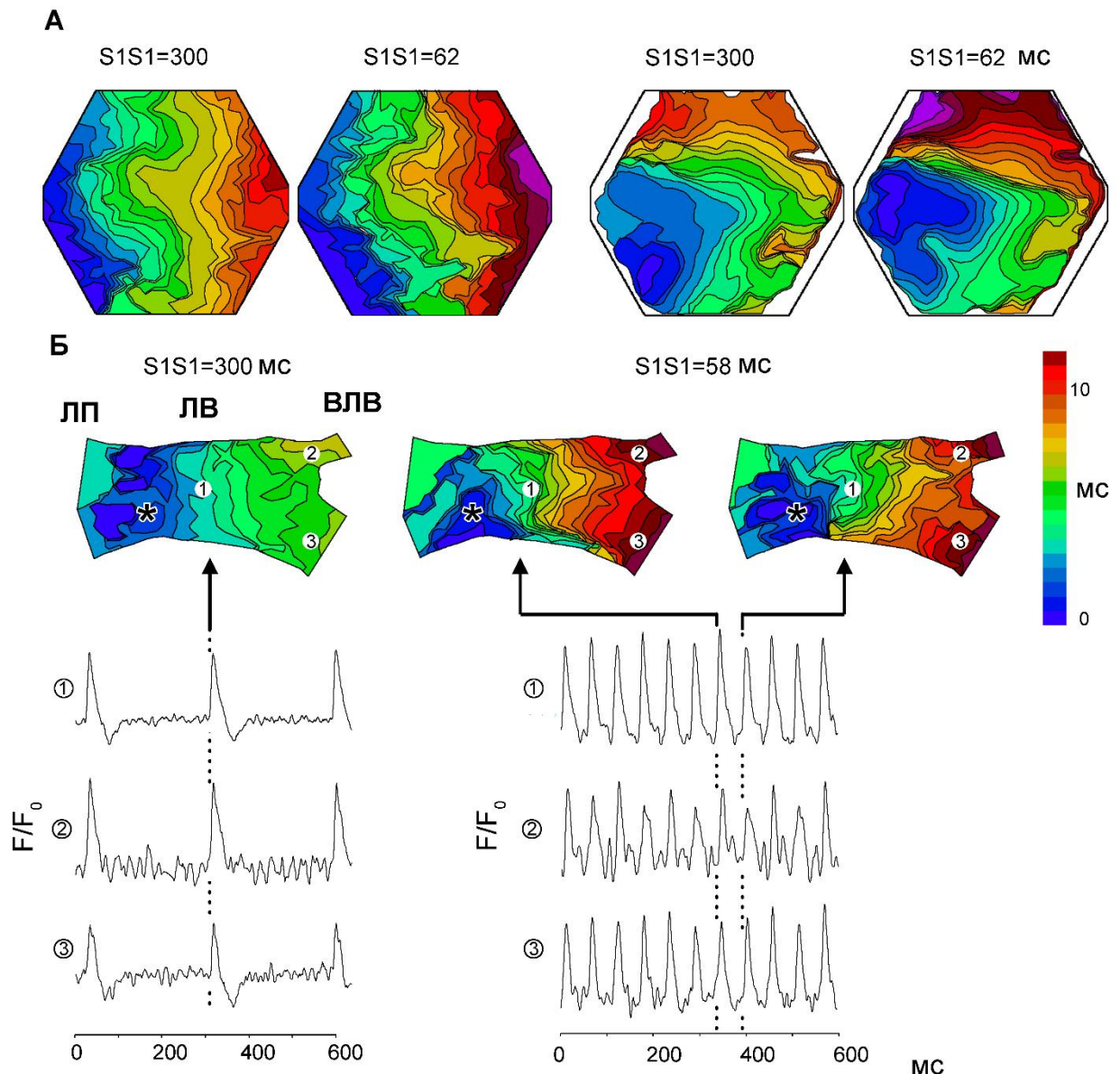


Рис. 4.3.11. Осцилляции (альтернации) паттерна активации и ПД в легочных венах (ЛВ). **А.** Репрезентативные примеры изохронных карт активации двух различных препаратов миокарда левого предсердия при длительности межимпульсных (S1S1) интервалов равной 300 мс (слева) и длительности, соответствующей величине функционального рефрактерного периода (ФРП, справа). **Б.** Репрезентативные пример изохронных карт активации миокарда легочной вены при длительности межимпульсных интервалов равной 300 мс (слева), а также активации в двух последовательных циклах при длительности межимпульсных интервалов, соответствующей величине ФРП (справа). Длительность ФРП в стволе ЛВ в данном эксперименте составила 58 мс. Видно, что паттерн активации в ЛВ при S1S1=58 мс существенно различается в двух последовательных циклах. Снизу показаны записи оптических ПД для нескольких последовательных циклов возбуждения, регистрируемые в точках, отмеченных в изохронных картах активации (1 – в области ствола вены, 2, 3 – в ветвях ЛВ). *- место расположения стимулирующих электродов. F/F_0 – нормализованная флуоресценция. ЛП – левое предсердие; ВЛВ – ветвь легочной вены.

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. Следует отметить, что левое предсердие состоит из двух эмбрионально и фенотипически различных типов миокарда, первый из которых (ANP-продуцирующий, трабекуляризованный) формирует ушко левого предсердия (УЛП), а второй (ANP-непродуцирующий, нетрабекуляризованный) – гладкостенную «свободную» стенку камеры. Для выявления альтернаций электрической активности эксперименты проводили таким образом, чтобы граница между УЛП и свободной стенкой левого предсердия оказывалась в центре картируемой области.

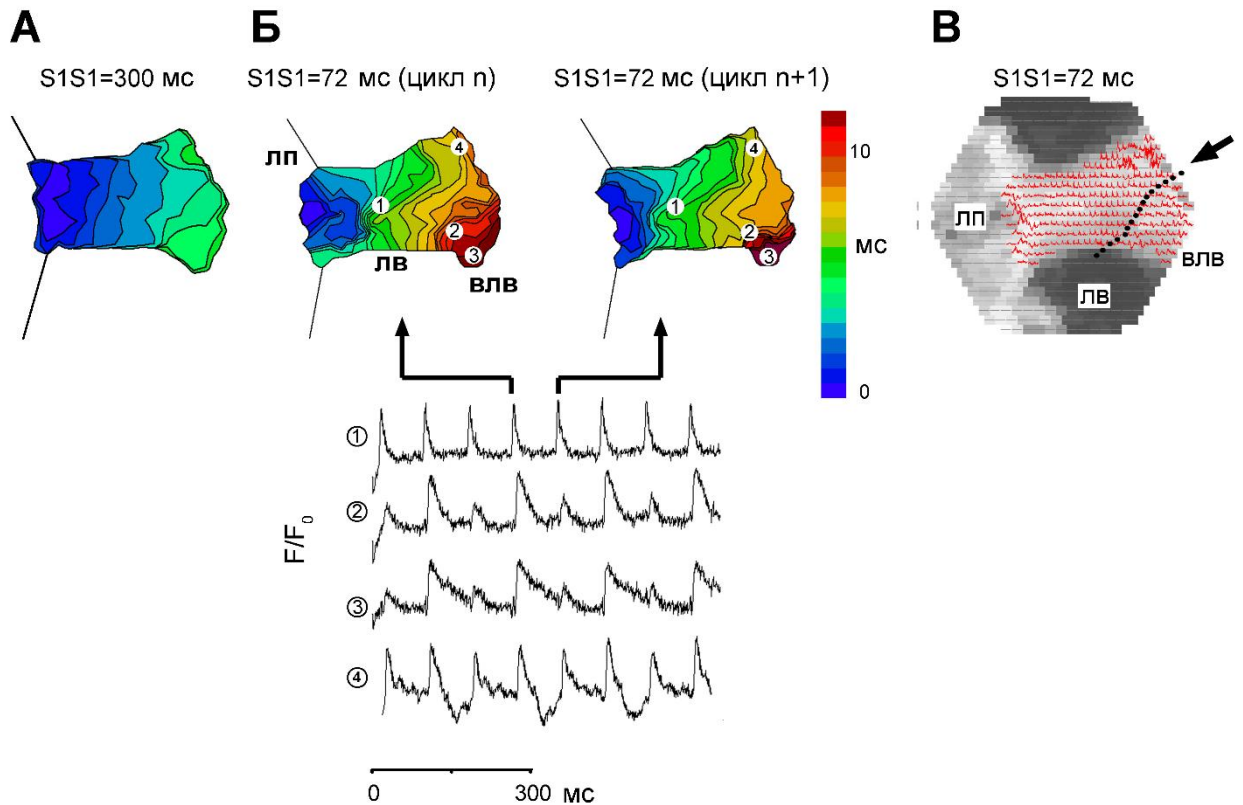


Рис. 4.3.12. Осцилляции (альтернации) паттерна активации и ПД в ветвях легочных вен. **А.** Репрезентативный пример изохронной карты активации легочной вены при длительности межимпульсных интервалов равной 300 мс. **Б.** Карты активации ЛВ для двух последовательных циклов возбуждения (n и $n+1$) при длительности межимпульсных интервалов, соответствующей величине ФРП. Длительность ФРП в стволе ЛВ в данном эксперименте составила 72 мс. Снизу показаны записи оптических ПД для нескольких последовательных циклов возбуждения, регистрируемые в точках, отмеченных в изохронных картах активации (1 – в области ствола вены, 2, 3, 4 – в основании ветвей ЛВ). Видно, что альтернации паттерна активации и оптических ПД при S1S1=72 мс возникают в основании ветви ЛВ. **В.** Область съемки ьРДА-матрицы и оптические ПД, регистрируемые каждым фотодиодом. Стрелкой и пунктирной линией отграничена область, где наблюдаются альтернации. Участок левого предсердия не показан на изохронных картах, так как сигналы в нем искажены сократительными артефактами. ЛП – левое предсердие; ВЛВ – ветвь легочной вены. F/F_0 – нормализованная флюоресценция.

Установлено, что при уменьшении интервалов между возбуждающими стимулами, наибольшее изменение паттерна активации в левом предсердии наблюдается именно в пограничной зоне. На границе УЛП и гладкостенной части предсердия происходит наибольшее снижение скорости проведения возбуждения (Рис.4.3.13) при межимпульсных интервалах, близких к ФРП, тем не менее, заметной осцилляции ДПД и паттерна возбуждения не наблюдается даже в этой зоне.

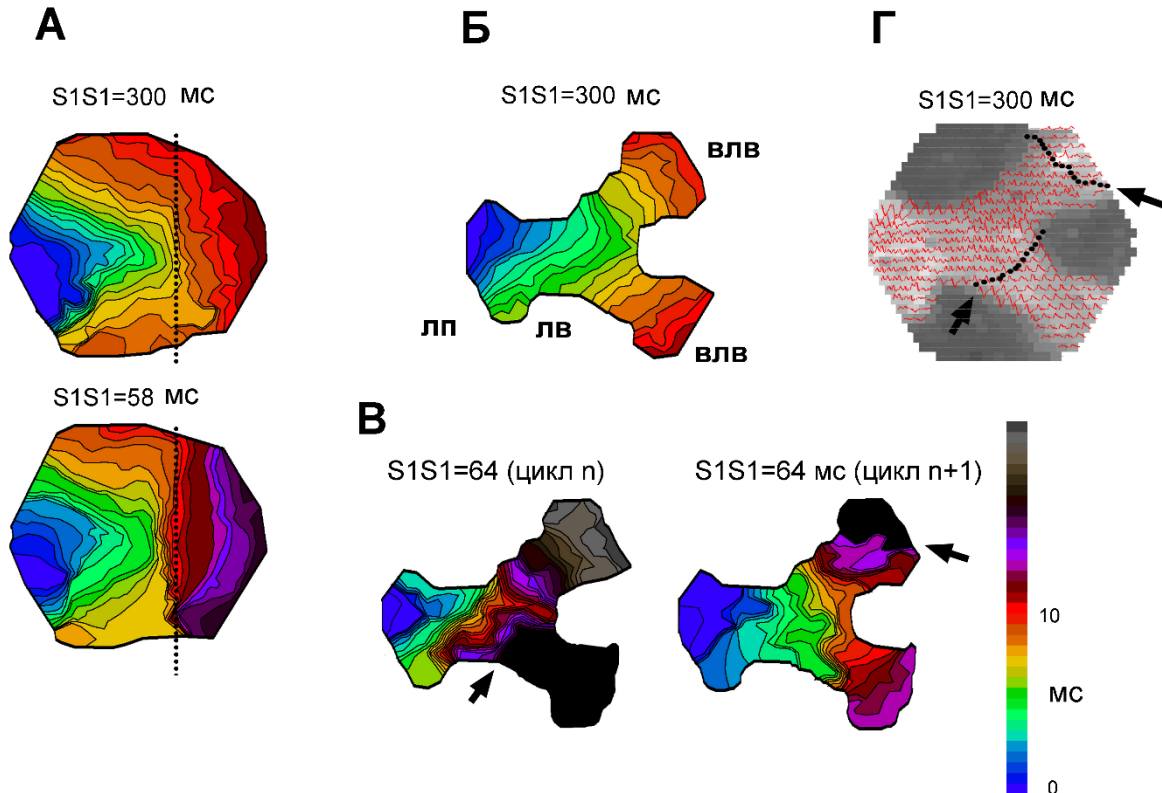


Рис. 4.3.13. Функционально-индуцированные реципрокные, периодические блоки проведения возбуждения в ветвях легочной вены. **А.** Репрезентативные примеры изохронных карт активации участка левого предсердия, включающего часть ушка (слева в каждой карте, отделено пунктиром) и часть свободной стенки (справа 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.

При достижении ФРП в левом предсердии, в том числе и в пограничной зоне ЛП, происходило резкое установление периодики Венкебаха. Блок проведения возбуждения в переходной зоне между УЛП и свободной стенкой предсердия наблюдали только в одном эксперименте (1 из 11).

Сведения о частоте возникновения того или иного вида нарушения хронотопографии возбуждения в легочных венах и левом предсердии и активации с частотой равной ФРП, приведены в Таблице 1.

4.3.1.6. Хронотопография возбуждения в миокарде легочных вен при нанесении внеочередных возбуждающих стимулов

Как указано выше, нарушение периодичности активации значительно влияет на характер активации миокарда. В экспериментальных условиях периодичность активации может быть нарушена нанесением внеочередного (т.н. «экстрасистолического») возбуждающего стимула. Внеочередные возбуждающие стимулы могут служить триггерами для формирования контуров циркуляции возбуждения (re-entry), а внеочередные ПД (или экстра-ПД), возникающие в миокарде *in vivo* по той или иной причине - триггером тахикардий.

Возбуждающий стимул является внеочередным (S2), если он наносится в одном из циклов в определенный момент времени между регулярными (S1 или прекодиционирующими) возбуждающими стимулами. Если интервал времени между регулярным (S1) и внеочередным (S2) стимулом мал, то внеочередной ПД возникает в фазу относительной рефрактерности и имеет низкую скорость нарастания фронта (деполяризации), а индуцированная им внеочередная волна возбуждения, имеет искаженный фронт и распространяется с низкой скоростью. Самую низкую скорость распространения имеет волна возбуждения, возникающая в результате нанесения внеочередного стимула (S2_{ERP}) через интервал времени (S1S2_{ERP}), соответствующий длительности эффективного рефрактерного периода (ЭРП) для данного участка миокарда. В таком случае S1S2 будет являться наименьшим интервалом времени, после которого возможна активация миокарда.

Характер активации миокарда легочных вен крысы в ответ на нанесение экстрасимула существенно отличался от такового, наблюдаемого при нанесении регулярных, прекодиционирующих стимулов, следующих, например, с интервалами 300 мс. В данной серии экспериментов наименьший интервал между очередным и внеочередным стимулом, приводящий к активации легочных вен, составлял S1S2_{ERP}=50±12 мс (n=10). Таким образом, длительность эффективного рефрактерного периода в ЛВ (стволе

ЛВ), существенно меньше, чем длительность функционального рефрактерного периода (50 ± 12 и 60 ± 3 мс, соответственно, $p(U) < 0.05$). Такое соотношение ФРП и ЕРП характерно и для других участков предсердного и желудочкового миокарда. Как и ожидалось, скорость проведения возбуждения, возникающего в ЛВ в ответ на $S2_{ERP}$, существенно снижена. Θ р составляла в данных экспериментах 23 ± 8 см/с.

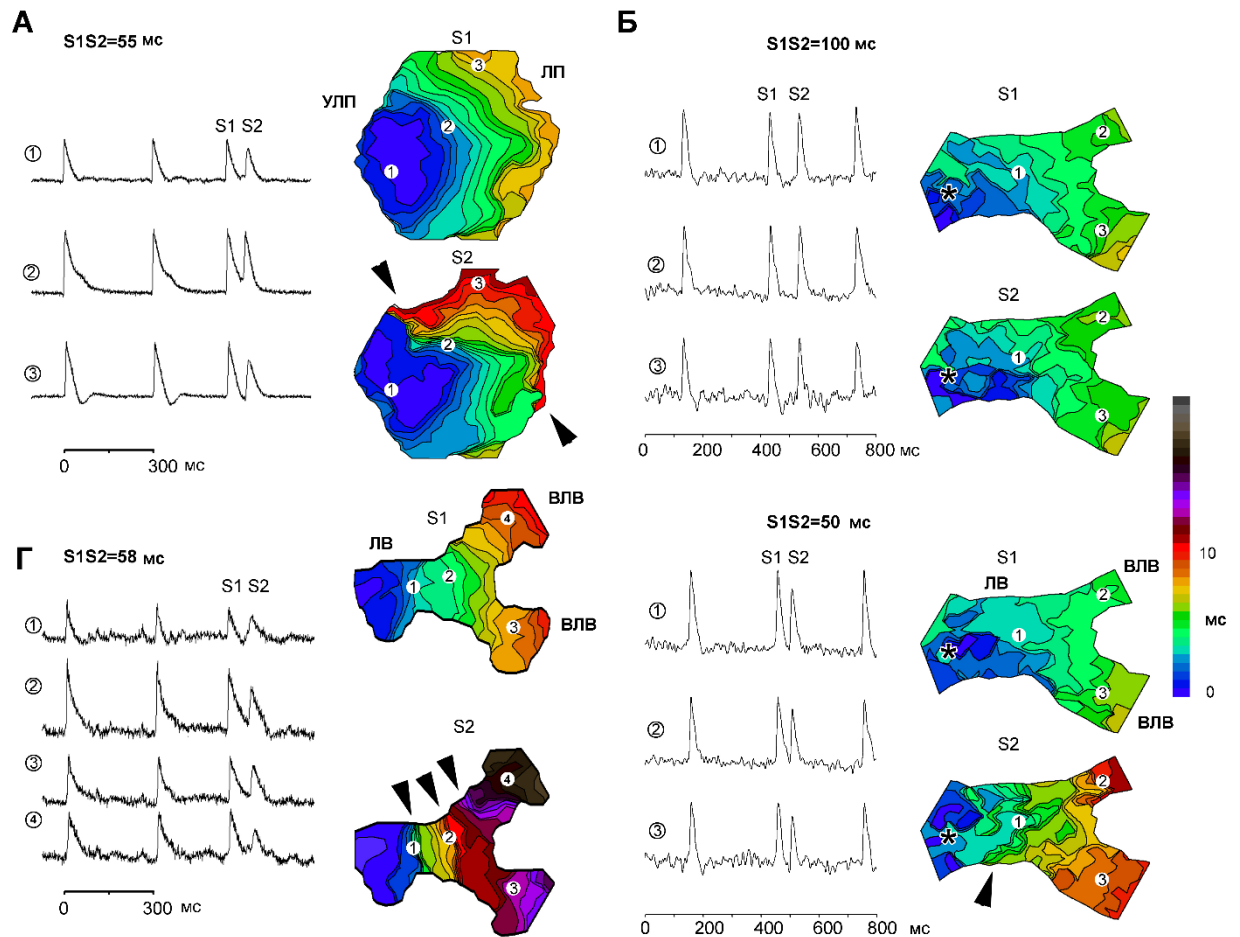


Рис. 4.3.14. Активация миокарда левого предсердия и легочных вен крысы в ответ на внеочередной ($S2$, «экстрасистолический») стимул, наносимый после прекодиционирующего ($S1$) стимула с интервалом, равным длительности эффективного рефрактерного периода (ЭРП, $S1S2$). **А.** Записи оптических ПД (слева) для нескольких последовательных циклов возбуждения, регистрируемые в точках, отмеченных в изохронных картах активации (справа) левого предсердия. **Б, В.** Записи оптических ПД (слева) для нескольких последовательных циклов возбуждения, регистрируемые в точках, отмеченных в изохронных картах активации (справа) легочных вен. На Б и В показаны два репрезентативных примера для ЭРП=58 (Б) и 50 мс (В). *- место расположения стимулирующих электродов. УЛП – ушко левого предсердия, ЛП – гладкостенная часть левого предсердия (граница между ушком и гладкостенной частью соответствует отметке «2»); ЛВ – легочная вена, ВЛВ – ветвь легочной вены. Стрелками обозначены зоны выраженного снижения скорости проведения в левом предсердии и легочной вене.

Паттерн активации как предсердного миокарда, так и миокарда легочных вен при возбуждении в ответ на $S2_{ERP}$ существенно изменен, по сравнению с таковым,

наблюдаемым в ответ на прекодиционирующий стимул (Рис. 4.3.14). В левом предсердии изменение паттерна активации является локальным и происходит в пограничной области между трабекуляризованным и гладкостенным участком миокарда (Рис. 4.3.14.А). В отличие от предсердного миокарда, в ЛВ обнаруживается несколько участков (ствол, ветви ЛВ), где наблюдается замедление проведения и искривление фронта волны возбуждения (Рис.4.3.1.4. Б, В, Табл. 1). Примечательно, что в пограничной зоне между предсердием и легочной веной, т.е. в устье ЛВ паттерн проведения в ответ на $S2_{ERP}$ был изменен в наименьшей степени. Примечательно также, что в области устьев ЛВ ни в одном из экспериментов не наблюдали блоков проведения в ответ на $S2_{ERP}$ -стимул.

4.3.1.7. Холинергическая регуляция проведения возбуждения в миокардиальной ткани легочных вен

Ацетилхолин (АЦХ) не оказывает заметного влияния на характер активации и скорость проведения возбуждения в легочных венах в условиях стационарной, 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 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. В присутствии ацетилхолина (1 мкМ, $n=7$) либо карбахола (1 мкМ, $n=3$) скорость проведения возбуждения в начальный период возобновления стимуляции (5-30 с) не отличается от таковой в контрольных условиях (Рис. 4.3.15). Ацетилхолин предотвращает снижение скорости проведения возбуждения, вызванное пребыванием ткани в состоянии покоя.

Высокочастотная (100, 200 Гц) стимуляция интрамуральных постганглионарных волокон в тканевых препаратах ЛВ приводит к быстрому (6 ± 3 с, $n=3$) восстановлению проведения возбуждения после периода покоя (скорость проведения возбуждения за несколько циклов электрической стимуляции восстанавливается до значения 70 ± 10 см/с). Этот эффект наблюдали как в присутствии пропранолола (1 мкМ, $n=3$), так и селективного блокатора β_1 -адренорецепторов атенолола (1 мкМ, $n=3$).

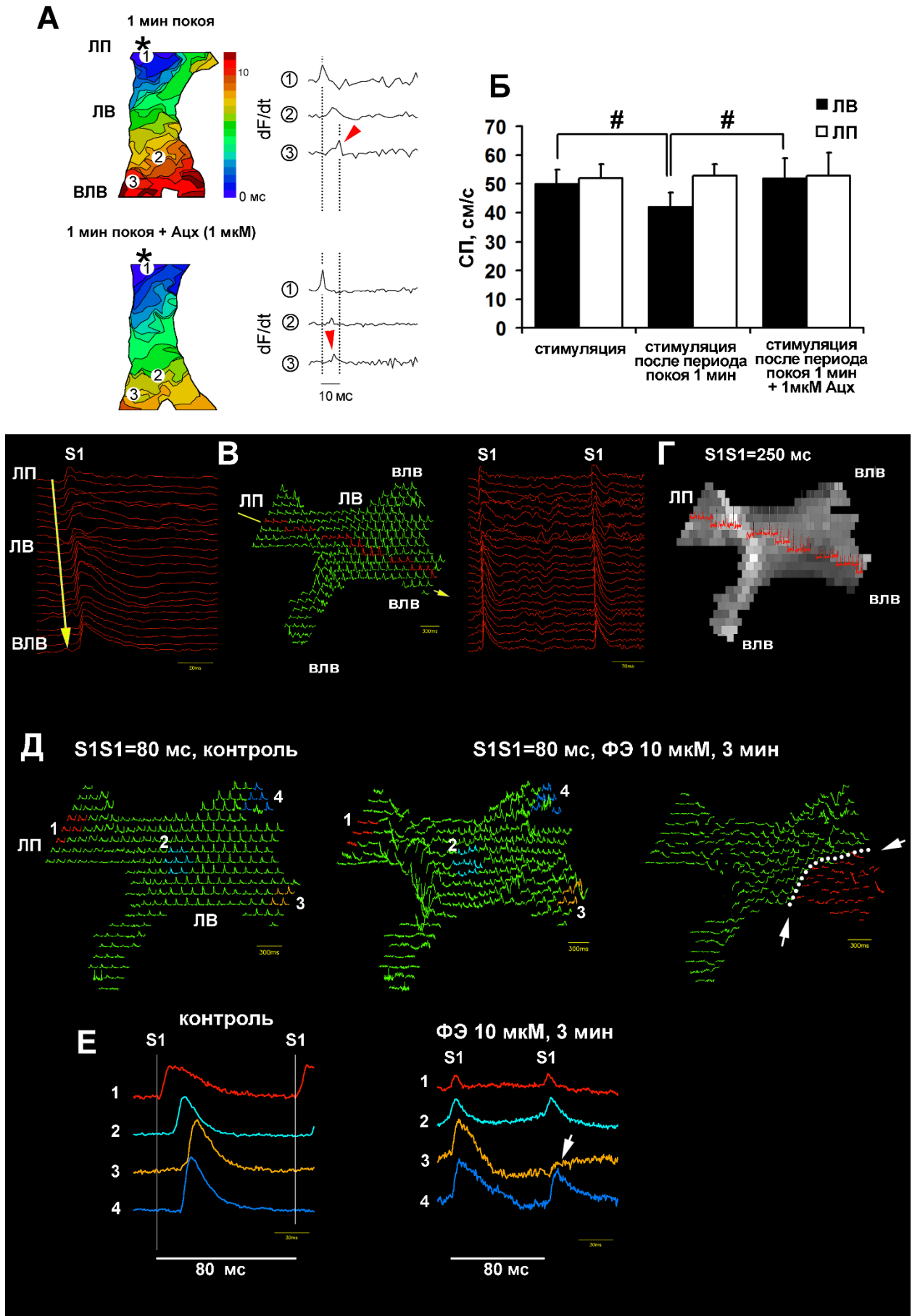


Рис. 4.3.15. Влияние ацетилхолина (Ацх) и агониста $\alpha 1$ -адренорецепторов фенилэфрина (ФЭ) на проведение возбуждения в миокардиальной ткани легочных вен.

А. Репрезентативный пример изохронной карты 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), полученные из точек, отмеченных на картах активации (1, 2, 3). * - расположение стимулирующих электродов. Красными стрелками показано уменьшение временного интервала между активацией предсердия и ветви ЛВ под действием Ацх. **Б.** Скорость проведения (СП) возбуждения в миокарде ЛВ и левом предсердии при стационарной электрической стимуляции (стимуляция); 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 сигналы (оптические ПД), регистрируемые в предсердии, устье ЛВ, легочной вене и ее ветви (показаны также красным на схеме картируемой области *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, следующих с интервалом 250 мс.

Д. Схемы картируемой области с оптическими ПД, регистрируемыми фотодиодами PDA-матрицы при стимуляции тканевого препарата ЛВ с интервалами 80 мс. Потенциалы действия 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 фенилэрфина 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.** Усредненные 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.

ЛП – гладкостенная часть левого предсердия, ЛВ – легочная вена, ВЛВ – ветвь легочной вены.

4.3.1.8. Влияние активации адренорецепторов $\alpha 1$ -типа на характер проведения возбуждения в легочных венах крысы

Адренергическая стимуляция вызывает существенные изменения паттерна активации миокарда ЛВ у крыс. Активация $\alpha 1$ -адренорецепторов индуцирует блоки проведения возбуждения в ветвях легочных вен, но не в предсердном миокарде или устьях ЛВ при длительности межимпульсных интервалов, близкой к ФРП (Рис. 4.3.15). Индуцированные фенилэфрином (10 мкМ) блоки проведения возникали во всех экспериментах ($n=10$), преимущественно в дистальной части ЛВ. При стационарной электрической стимуляции (S1S1=250 мс) и антероградном проведении возбуждения ФЭ снижает $\theta_{ср}$ на $24 \pm 5\%$ ($n=10$, $p(T) < 0,05$). Активация $\alpha 1$ -адренорецепторов приводила в экспериментах с оптическим картированием, как и в микроэлектродных экспериментах, к увеличению длительности оптических ПД; этот эффект был наибольшим в дистальной части ЛВ (Рис. 4.3.15, Е). 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.

4.3.1.9. Влияние октанола на проведение возбуждения в предсердном миокарде и миокарде легочных вен крысы

Многоатомные спирты, такие как гептанол либо октанол, подавляют проводимость щелевых контактов, поэтому используются в экспериментальных условиях как «разобщители» электрической связи кардиомиоцитов в ткани. Величина и скорость формирования эффекта разобщающего агента пропорциональна количеству щелевых контактов между клетками и степени их электрической сопряженности. При перфузии миокардиальных препаратов раствором, содержащим октанол, происходит постепенное снижение их возбудимости и прекращение электрической активности.

Октанол (1,6 мМ) вызывал полное подавление возбудимости (т.е. возникновение электрически вызванных ПД и распространение волны возбуждения) в тканевых препаратах левого предсердия и «развернутых» сегментах легочных вен через $12,7 \pm 3,8$ мин ($n=6$) и $11,3 \pm 3,4$ мин ($n=8$), соответственно. Таким образом, длительность периода поддержания возбудимости при действии октанола в миокарде предсердия и ЛВ оказалась одинаковой ($p > 0,1$, Рис.4.1.16). Известно, что синоатриальный узел (САУ) характеризуется низкой степенью электрической связи кардиомиоцитов и низким уровнем экспрессии белков щелевых контактов. В отличие от левого предсердия и ЛВ, в миокардиальных тканевых препаратах межвенной области правого предсердия, включающих САУ, подавление спонтанной активности (т.е. прекращение спонтанных ПД и спонтанной активации ткани САУ) наступало через $4,5 \pm 0,9$ мин ($n=4$) после начала подачи октанола, что существенно меньше ($p < 0,01$), чем в левом предсердии и ЛВ.

Следует учесть, что и для препаратов ЛП и для ЛВ свойственен значительный разброс значений длительности сохранения электрической активности. Поэтому, использование данного параметра для оценки степени электрической сопряженности кардиомиоцитов в ткани является малопригодным.

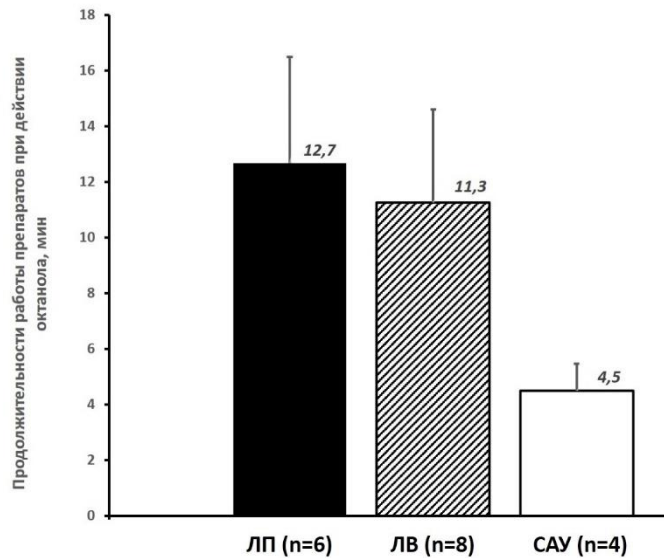


Рис. 4.3.16. Длительность периодов сохранения электрической активности в миокарде левого предсердия, легочных вен и в области синоатриального узла (САУ) после начала перфузии раствором, содержащим многоатомный спирт октанол (1,6 мМ). * - $p < 0.01$ (однофакторная ANOVA).

Средняя скорость проведения возбуждения в контрольных условиях, определенная в данной серии экспериментов, в предсердном миокарде ($n=6$) и в сегментах ЛВ ($n=8$) составила $63,3 \pm 4,5$ и $61,5 \pm 4,2$ см/с, соответственно. После начала перфузии раствором, содержащим октанол, $\theta_{ср}$ снижается и в предсердии, и в ЛВ. Снижение $\theta_{ср}$ при действии октанолола имеет явно двухкомпонентный экспоненциальный характер. В ходе первой фазы продолжительностью $6 \pm 1,4$ мин $\theta_{ср}$ снижается быстро; в ходе второй фазы, скорость проведения остается почти постоянной на протяжении $7 \pm 2,1$ мин до момента подавления возбудимости тканевого препарата. В течение всего периода действия октанолола скорость проведения в левом предсердии оказывается ниже, чем в сегментах легочных вен (Рис. 4.3.17, А).

Степень снижения $\theta_{ср}$, вызванного действием октанолола, оценивали в момент окончания первой фазы (т.е. на 6 мин действия октанолола). В ткани левого предсердия $\theta_{ср}$ снизилась до $28,4 \pm 2,9$ ($n=5$, $p < 0.05$), в ткани легочных вен до $40,8 \pm 4,7$ см/с ($n=6$, $p < 0.05$), соответственно. Таким образом, в легочных венах скорость проведения возбуждения, снижается в меньшей степени, чем в левом предсердии ($p < 0.05$, Рис. 4.3.17. Б).

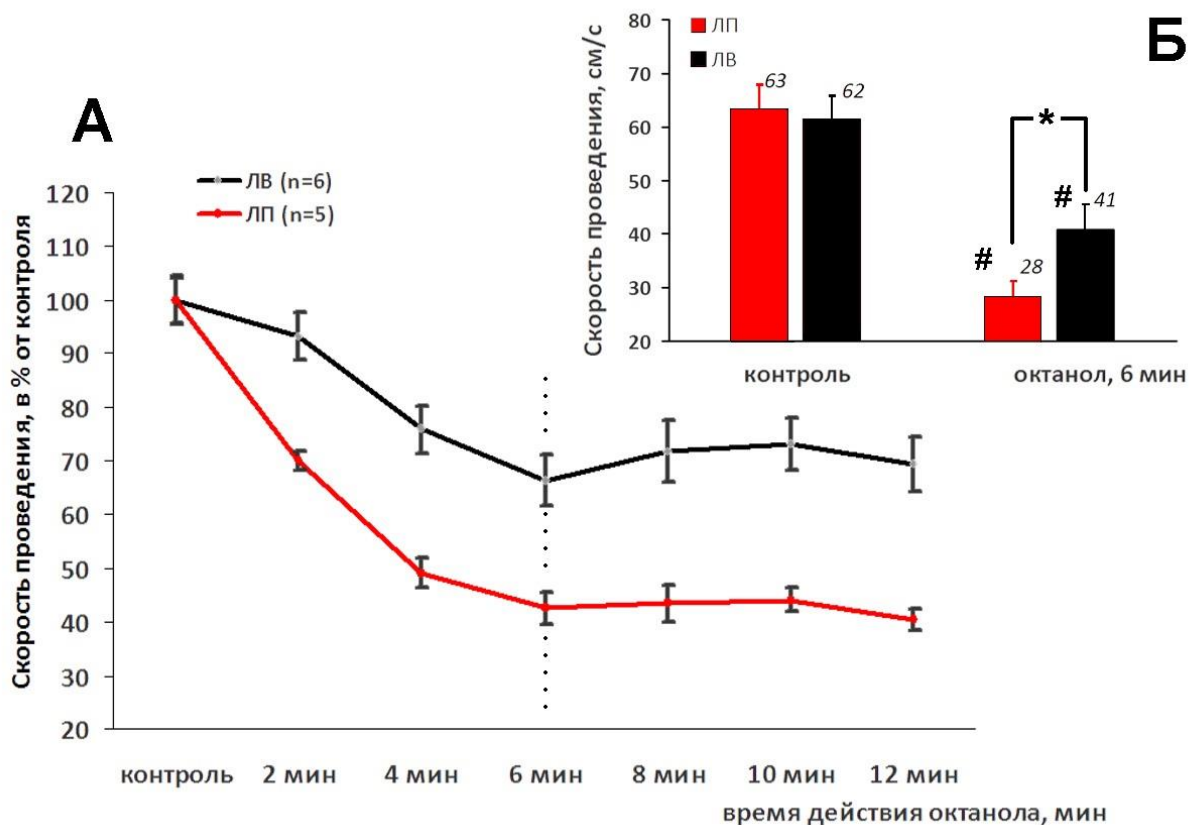


Рис. 4.3.17. А. Относительное изменение средней скорости проведения возбуждения под действием октанола в легочных венах и левом предсердии (среднее по мин); Б. Средняя скорость проведения возбуждения в ЛП и ЛВ в контроле и через 6 мин после начала перфузии р-ром, содержащим 1,6 мМ октанола. Результаты представлены в виде ср. \pm ст.ош.ср.,* - $p < 0.05$, # - $p < 0.05$.

Как в предсердном миокарде, так и в миокарде ЛВ, вплоть до момента потери возбудимости, октанол не приводит к формированию блоков проведения возбуждения, фрагментации фронта волны возбуждения. Октанол также незначительно влияет на гетерогенность проведения как в предсердном миокарде, так и в ЛВ (что можно наблюдать как степень равномерности распределения изохрон в контрольных и экспериментальных картах активации одинакова, Рис. 4.3.18).

В данной серии экспериментов помимо $\theta_{ср}$ оценивали анизотропию скорости проведения возбуждения (т.е. отношение $\theta_{п}/\theta_{\perp}$, где $\theta_{п}$ – скорость в преимущественном направлении движения волны возбуждения, а θ_{\perp} – скорость в направлении, перпендикулярном к $\theta_{п}$) Октанол не влияет на $\theta_{п}/\theta_{\perp}$ в левом предсердии ($1,18 \pm 0,11$ и $1,24 \pm 0,18$, $n=5$, $p > 0.1$), однако увеличивает анизотропию скорости в сегментах легочных вен ($1,09 \pm 0,09$ и $1,61 \pm 0,14$, $n=6$, $p < 0,01$, Рис.4.1). При действии октанола значительно уменьшается скорость проведения в направлении перпендикулярном продольной

анатомической оси вены. Меньшее снижение $\theta_{ср}$ при действии октанола в легочных венах, видимо, обусловлено увеличением анизотропии проведения возбуждения.

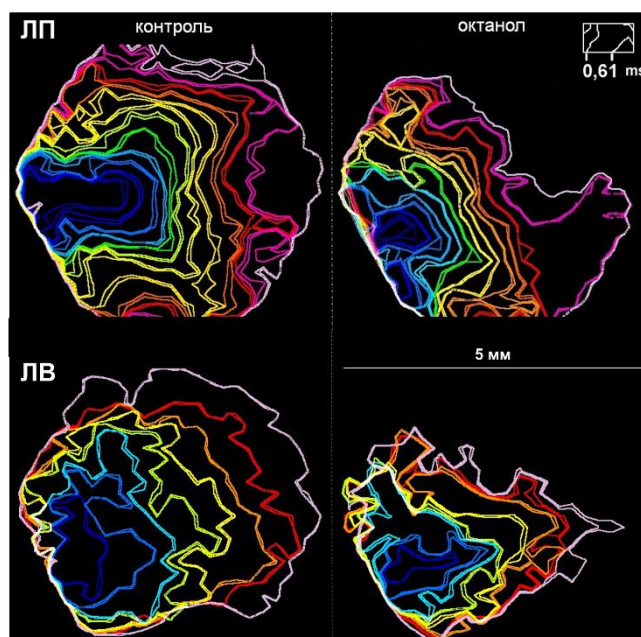


Рис. 4.3.18. Репрезентативные примеры изохронных карт активации тканевых препаратов левого предсердия и в «развернутых» сегментах легочных вен в контроле и через 6 мин после начала перфузии р-ром, содержащим 1,6 мМ октанола (т.е. в момент времени, соответствующий окончанию первой фазы его действия). Интервалы между изохронами – 0,61 мс. Для карт каждого из препаратов приведено одинаковое количество изохрон: на фоне октанола возбуждением охвачена меньшая площадь ткани, чем в контрольных условиях за тот же самый временной интервал. Синий цвет – начальный момент «активации» тканевого препарата.

Следует отметить, что изменения возбудимости и скорости проведения не связаны с влиянием октанола на потенциалы действия в миокардиальных препаратах. В предварительных экспериментах октанол вплоть до концентрации 6,4 мМ не оказывал влияния на длительность ПД предсердного миокарда крысы (длительность ПД на уровне 90% реполяризации - 59 ± 5 мс и 54 ± 7 мс в контроле и при действии октанола в течение 10 мин, соответственно, $n=5$). Максимальная скорость фронта ПД (скорость деполяризации) при действии 6,4 мМ октанола также изменялась незначительно (285 ± 26 В/с и 255 ± 40 В/с, $n=5$, Рис.4.3.19..

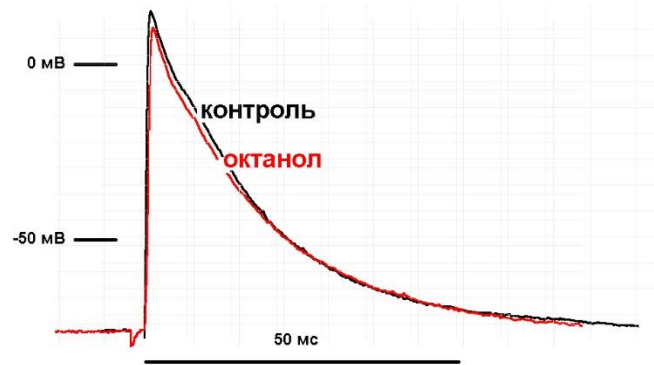


Рис. 4.3.19. Характерные примеры потенциалов действия левого предсердия крысы, регистрируемые в контрольных условиях и при действии 6,4 мМ октанола (10 минут).

4.3.2. Распространение возбуждения в миокардиальной ткани легочных вен мышы

4.3.2.1. Хронотопография возбуждения при антероградном режиме активации

Хронотопография возбуждения легочных вен исследована с использованием мышей линии BALB/C. У мышей способностью проводить волну возбуждения (Рис. 4.3.20.А) и, соответственно, генерировать ПД (Рис. 4.3.20.Б, В) обладают все участки легочных вен. Как и в миокарде ЛВ крыс, в результате поступления возбуждения из САУ или в результате нанесения возбуждающих электрических импульсов в миокарде левого предсердия, волна возбуждения распространяется антероградно от предсердной части препарата через протяженную область устья в зону ветвления и дистальные отделы легочных вен без каких-либо заметных аббераций, невозбудимых зон, блоков проведения. Волна возбуждения достигает синхронно дистальных участков легочных вен всех долей легких.

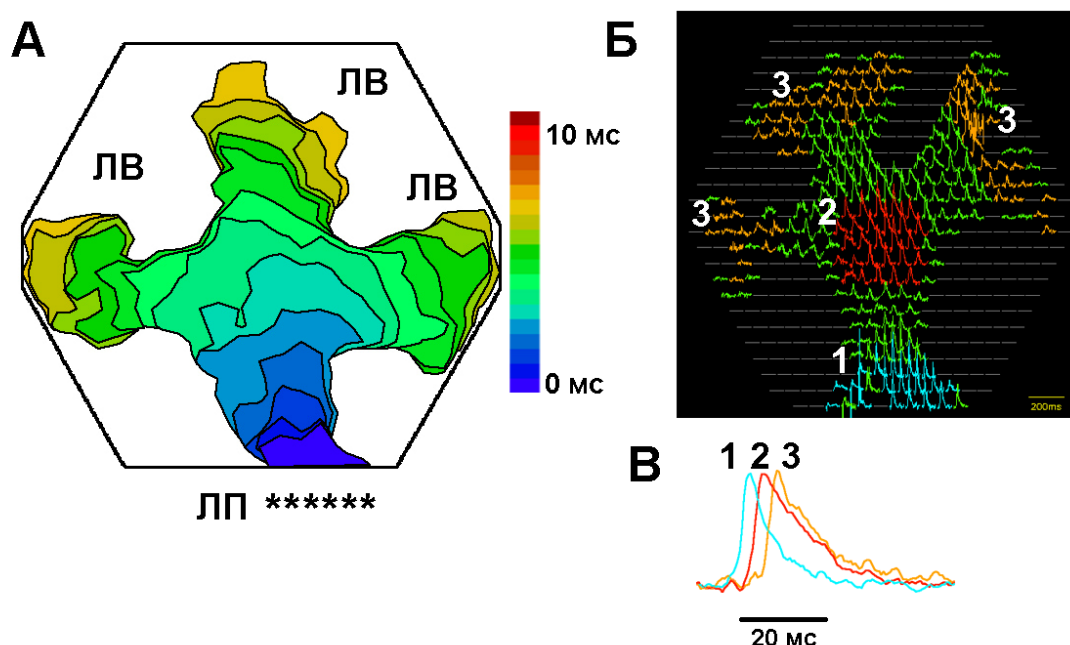


Рис. 4.3.20. Активация миокарда легочных вен мыши. **А.** Пример изохронной карты активации области устья и легочных вен мыши при антероградном проведении волны возбуждения при стационарной стимуляции с интервалами 200 мс. ЛП – левое предсердие, ЛВ – легочная вена, ***- расположение стимулирующих электродов. **Б.** Индивидуальные оптические сигналы в миокардиальной ткани легочных вен мыши. **В.** Усредненные оптические сигналы от области устья ЛВ (1), зоны ветвления ЛВ (2) и дистальных участков легочных вен (3).

В экспериментах с оптическим картированием средняя антероградная скорость проведения возбуждения при стационарной активации ($S1S1=200$ мс) составила 57 ± 17 см/с ($n=10$), что несколько меньше величины, наблюдаемой в ЛВ крыс. Средняя скорость проведения у мышей статистически не различалась в ЛВ, стенке левого предсердия и его ушке ($n=9$, 42 ± 18 , 45 ± 12 см/с, $p > 0.1$).

Тем не мене, локальная скорость проведения сильно варьирует: наименьшая θ_m наблюдается в области ветвления ЛВ (21 ± 5 см/с), а наибольшая – в области устья (110 ± 14 см/с) и в дистальных участках ЛВ, прилегающих к долям легких. Антероградная θ_{sr} значительно зависела от длительности межимпульсных интервалов: при $S1S1=80$ мс скорость проведения была ниже, чем при $S1S1=200$ мс и составляла 25 ± 6 см/с.

4.3.2.2. Хронотопография возбуждения при ретроградном режиме активации

При нанесении возбуждающих стимулов в одной из легочных ветвей, дистальнее зоны ветвления основного ствола волна возбуждения распространялась ретроградно из дистального участка легочной вены в направлении левого предсердия.

При нанесении возбуждающих стимулов с интервалами 200 мс (т.е. с частотой, близкой к таковой, генерируемой САУ *in vivo*) средняя скорость проведения ретроградной волны возбуждения в ЛВ мышей оказалась существенно ниже (16 ± 6 см/с, $n=10$), чем скорость антероградной волны (65 ± 12 см/с, $n=10$, $p(T) < 0,05$). Кроме того, в 6 из 10 случаев при ретроградной активации в области ветвления легочных вен возникали блоки проведения возбуждения (Рис. 4.3.21).

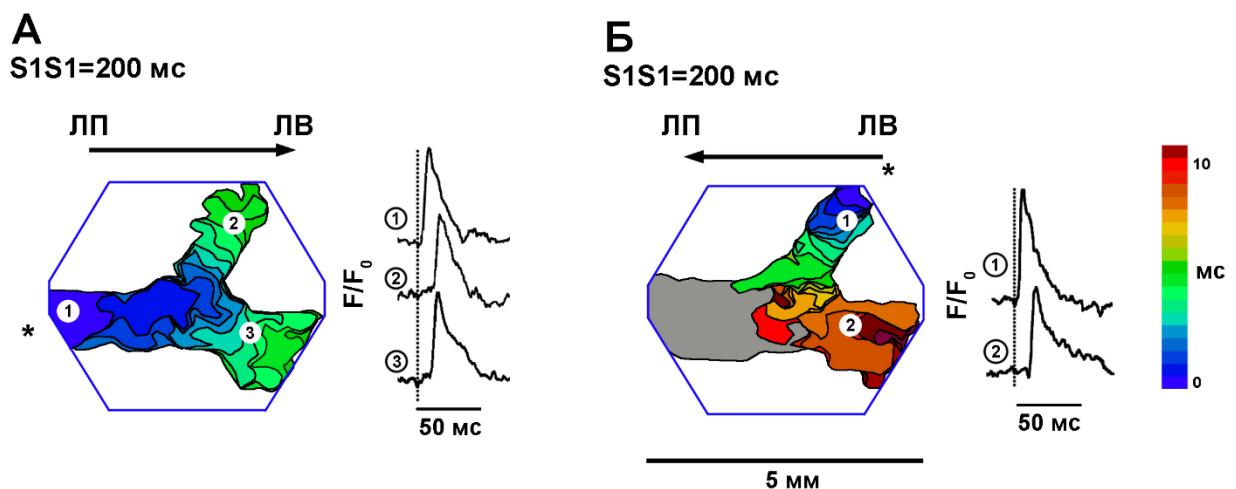


Рис. 4.3.21. Антероградное и ретроградное проведение волны возбуждения в легочных венах (ЛВ) мыши. **А.** Изохронная карта активации устья и общего ствола ЛВ при антероградном проведении возбуждения, а также оптические сигналы (справа), регистрируемые в точках, отмеченных в изохронных картах активации (1 – в области устья вены, 2 – в ЛВ, дистальнее зоны ветвления). **Б.** То же, что в А, но при ретроградном проведении возбуждения (1, 2 – ЛВ, дистальнее зоны ветвления). ЛП – левое предсердие, * – место расположения стимулирующих электродов. F/F_0 – нормализованная флюоресценция.

В случае возникновения таких блоков предсердный миокард, а также миокард одной или нескольких ветвей ЛВ оставались неактивированными. Для тех случаев, в которых в

области ветвления возникали блоки проведения возбуждения, был характерен значительный разброс длительности оптических ПД в легочных венах.

Таким образом, характер активации ЛВ мышей зависит от локализации источника возбуждения (ЛП или дистальные участки легочных вен). Как ранее описано, анизотропия паттерна активации ЛВ при частоте возбуждения, близкой к естественной, в отличие от мышей, не характерна для ЛВ крыс.

4.3.2.3. Хронотопография возбуждения в миокарде легочных вен мыши при нанесении внеочередных возбуждающих стимулов

Наименьший интервал между очередным и внеочередным стимулом, приводящий к активации ЛВ (т.е. ЕРП) у мышей составлял $S1S2_{ERP}=55\pm 11$ мс ($n=6$). Скорость проведения возбуждения, возникающего в ЛВ в ответ на $S2_{ERP}$, была существенно снижена и составляла 19 ± 4 см/с.

Характер активации миокарда ЛВ мыши в ответ на нанесение экстрастимула ($S2$) существенно отличался от такового, наблюдаемого при нанесении регулярных, прекондиционирующих стимулов ($S1$), следующих с интервалами 200 мс (Рис. 4.3.22). В области устьев ЛВ обнаруживается участок, где наблюдается замедление проведения и искривление фронта волны возбуждения. В дистальных участках ЛВ паттерн проведения в ответ на $S2_{ERP}$ был изменен в наименьшей степени. В области устья и дистальных участках ЛВ ни в одном из экспериментов не наблюдали блоков антероградного проведения возбуждения в ответ на $S2_{ERP}$ -стимул.

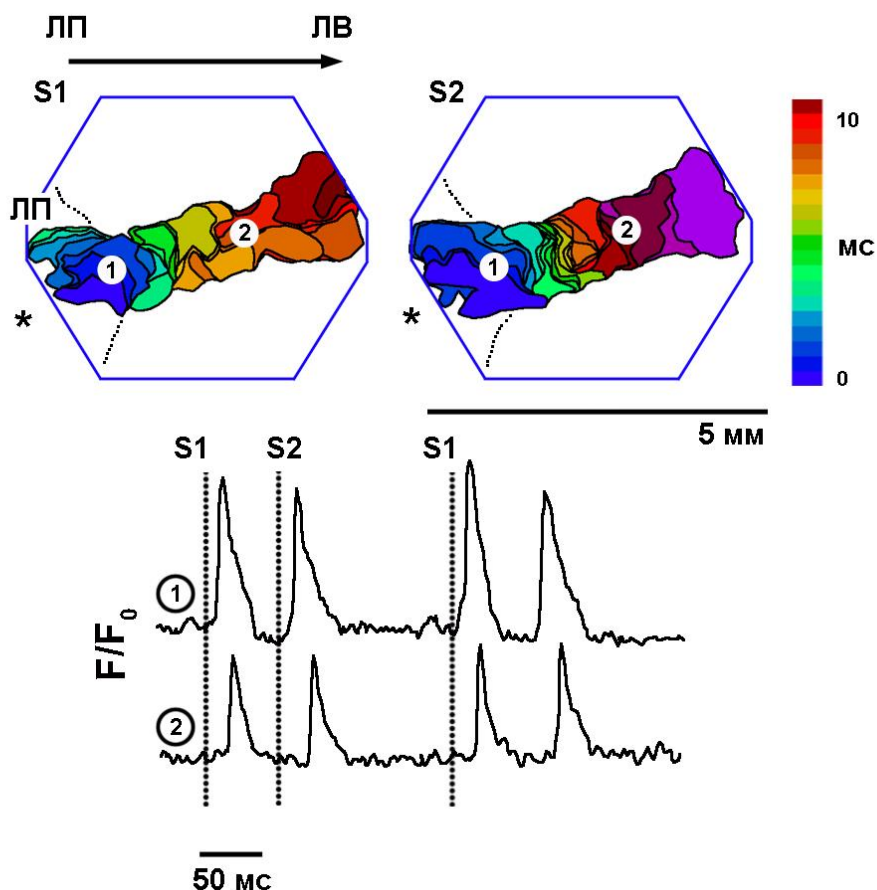


Рис. 4.3.22. Активация миокарда легочных вен мыши в ответ на внеочередной (S2, «экстасистолический») стимул, наносимый после прекондиционирующего (S1) стимула с интервалом, равным длительности эффективного рефрактерного периода (ЭРП, S1S2). **А.** Репрезентативные карты активации в ответ на S1 и S2 стимулы. **Б.** Записи оптических ПД, возникающих в ответ на S1 и S2 стимулы и регистрируемые в точках, отмеченных в изохронных картах активации легочных вен. *- место расположения стимулирующих электродов. ЛП – левое предсердие. Антероградный режим проведения возбуждения.

4.3.2.4. Влияние активации адренорецепторов $\alpha 1$ -типа на характер проведения возбуждения в легочных венах мыши

Активация адренорецепторов $\alpha 1$ -типа фенилэфрином (ФЭ, 10 мкМ) оказывает влияние на скорость проведения возбуждения, характер активации, а также длительность оптических ПД в миокарде ЛВ мышей. При стационарной электрической стимуляции (S1S1=200 мс) и антероградном проведении возбуждения ФЭ снижает $\theta_{ср}$ на 15% (до 35 ± 5 см/с, $n=5$ $p(T) < 0,05$). Действие ФЭ сопровождается альтернациями паттерна активации. Поударные осцилляции паттерна активации наблюдали в области устья ЛВ во всех экспериментах ($n=5$. Рис. 4.3.23), но ФЭ у мышей не индуцировал блоков проведения возбуждения. Активация $\alpha 1$ -адренорецепторов приводила к увеличению длительности оптических ПД; этот эффект был наибольшим в дистальной части ЛВ (Рис. 4.3.23, Б, *справа*). Отметим, что как указано в предыдущем разделе, длительность ПД в

суправентрикулярном миокарде мыши крайне неоднородна, а наибольшая ДПД90 в контрольных условиях наблюдается в области устья ЛВ проксимальнее зоны ветвления легоччных вен. Таким образом, зоны максимальной ДПД и наибольшего удлинения ПД при действии ФЭ не совпадают у мышей.

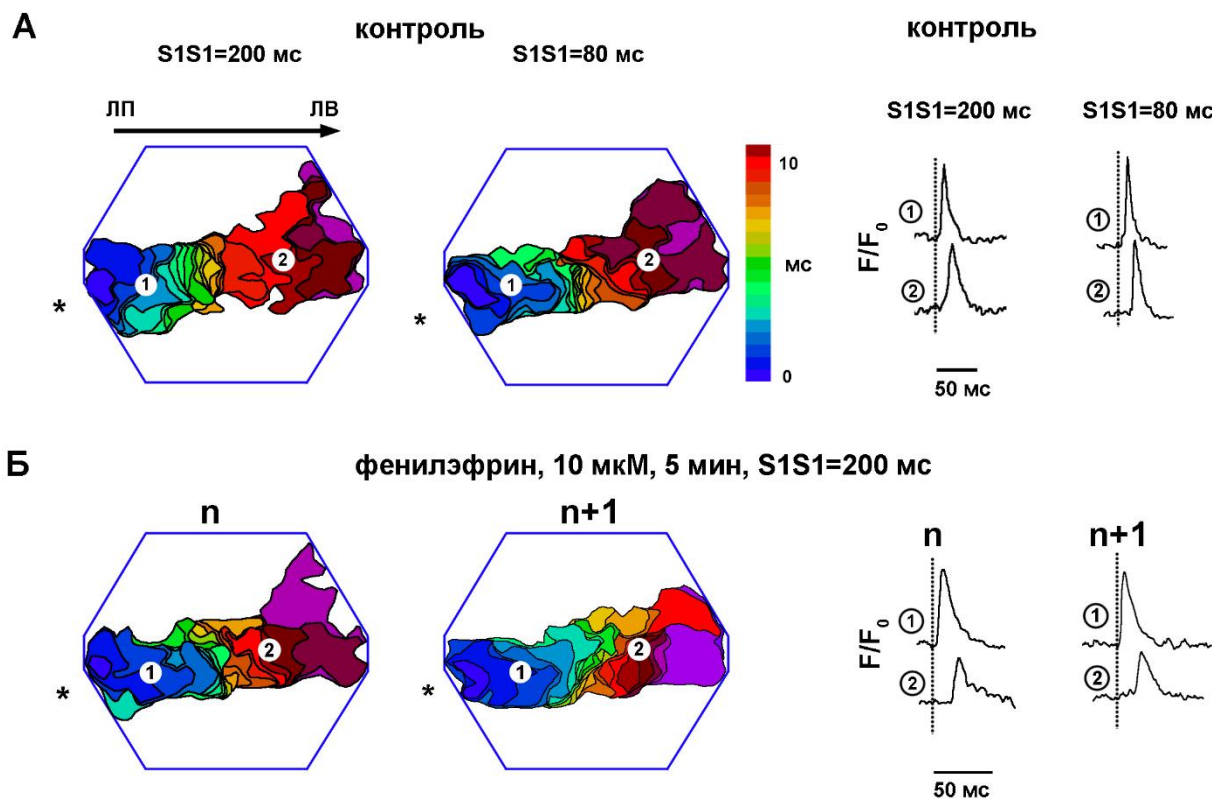


Рис. 4.3.23. Хронотопография возбуждения в легочных венах мыши при активации аднерорецепторов $\alpha 1$ -типа. **А.** Репрезентативные примеры изохронных карт активации ЛВ при длительности межимпульсных (S1S1) интервалов равной 200 и 80 мс, а также оптические ПД, регистрируемые в точках, отмеченных в изохронных картах. **Б.** Репрезентативные изохронные карты активации ЛВ, построенные для двух последовательных циклов возбуждения (n - слева и n+1 - справа) при действии агониста аднерорецепторов $\alpha 1$ -типа фенилэфрина, а также оптические ПД, регистрируемые в соответствующих точках. *- место расположения стимулирующих электродов. ЛП –левое предсердие. Антероградный режим проведения возбуждения.

4.3.2.5. Эктопическая активация миокардиальной ткани легочных вен мыши при адренергической стимуляции

Отдельная серия экспериментов с использованием метода оптического картирования была направлена на выяснение локализации очагов (фокусов) эктопической активности в ЛВ при адренергической стимуляции.

Норадреналин (10 μM), фенилэфрин (10 μM), а также изопротеренол (10 μM) индуцировали эктопическую активность в 100% экспериментов. Во всех экспериментах адренергическая стимуляция приводила к формированию монофокальных эктопических

очагов (Рис. 4.3.24). При адренергической стимуляции миграция эктопических очагов не наблюдается. Индуцированные в каждом из экспериментов очаги локализируются в пределах определенного участка ЛВ на протяжении всего периода действия НА (или какого-либо селективного агониста адренорецепторов), а также при повторном его действии.

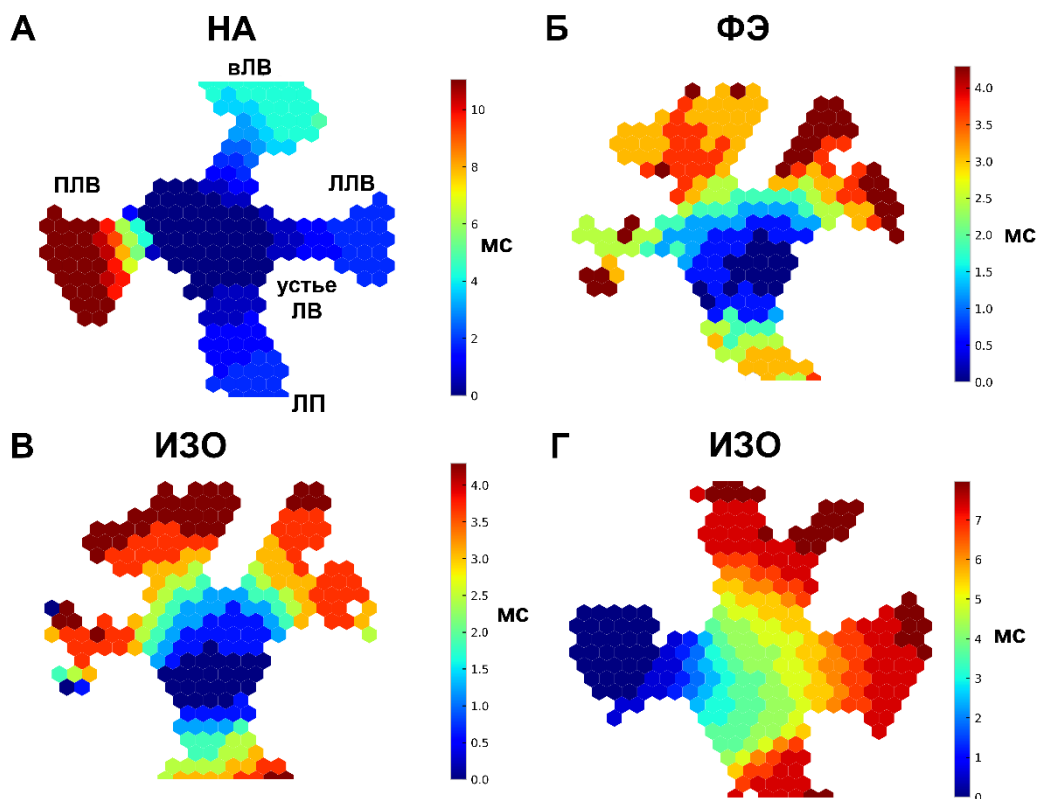


Рис. 4.3.24. Репрезентативные примеры изохронных карт распространения возбуждения в миокарде ЛВ мышей BALB/c при действии агонистов адренорецепторов: норадреналина (НА), фенилэфрина (ФЭ), изопротеренола (ИЗО). Синий цвет соответствует месту возникновения возбуждения. Для ИЗО приведены примеры возникновения возбуждения как в устье ЛВ (слева, В), так и в дистальной части ЛВ (справа, Г).

При действии НА (5 из 5) и фенилэфрина (6 из 6 экспериментов) эктопические очаги локализовались в области устья ЛВ (Рис 4.3.25. А, Б). В этих экспериментах волна возбуждения распространялась в направлении предсердного миокарда и в направлении ветвей ЛВ «радиальным» образом. Эктопический источник, таким образом, приводил к возбуждению как предсердного миокарда, так и миокарда ЛВ. При действии изопротеренола формировались стабильные, монофокальные очаги в области устья (4 из 5), либо в дистальном участке ЛВ (1 из 5) правой легочной доли (Рис 4.3.25. А, В).

Площадь зоны первичной активации при адренергической стимуляции существенно варьировала, и статистически значимых различий этой величины при действии НА, ФЭ и ИЗО обнаружено не было. В отдельных экспериментах, время активации тканевых препаратов легочных вен при действии НА (3 из 5, 11-15.5 мс) и ИЗО (2 из 5, 8 мс) было

существенно больше, чем в результате распространения волны возбуждения, вызванной электрической стимуляцией (6 ± 2 мс). Следует указать, что увеличение t_{act} наблюдается несмотря на гиперполяризацию ПП, вызываемую активацией адренорецепторов. Несмотря на увеличение t_{act} ни в одном из экспериментов при эктопической активации ЛВ в ответ на НА, ФЭ, ИЗО не наблюдали блоков проведения возбуждения или re-entry.

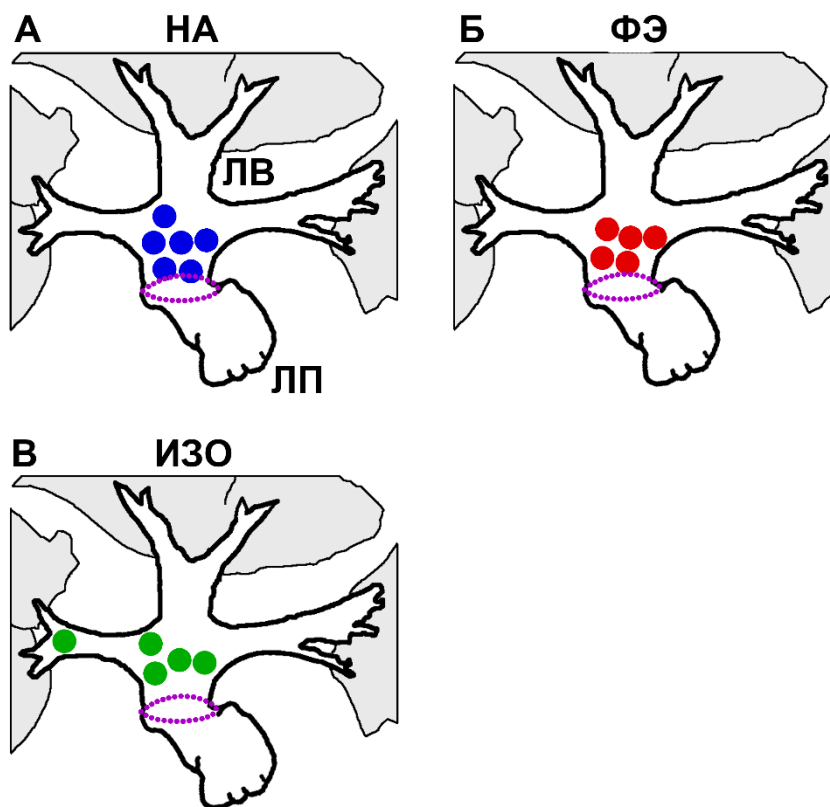


Рис. 4.3.25. Схематичные рисунки, отображающие локализацию эктопических очагов (отмечены цветными точками), индуцированных агонистами адренорецепторов (А, Б, В) - норадреналином (НА), фенилэфрином (ФЭ), изопротеренолом (ИЗО) - в миокардиальной ткани ЛВ мышей BALB/c.

4.3.2.6. Эктопические очаги в миокардиальной ткани легочных вен мыши, индуцированные стимуляцией постганглионарных интрамуральных нервов

Высокочастотная стимуляция постганглионарных нервных волокон (СПН), осуществляемая в присутствии атропина, приводила к индукции эктопической активности в ЛВ в 2 из 6 экспериментов. В этих случаях эктопический очаг располагался между устьем и зоной ветвления легочных вен (Рис.4.3.26, А). Как и в случае с агонистами адренорецепторов, СПН приводила к возникновению монофокальных очагов: паттерн активации ЛВ при СПН крайне сходен с таковым, наблюдаемым при действии НА или ФЭ. Длительность эпизодов эктопической активности, индуцированной СПН в ЛВ, составляла

1-2 с. Частота спонтанных разрядов варьировала от 12 Гц в начале до 3 Гц в конце эпизода индуцированной эктопической активности (Рис. 4.3.26. Б).

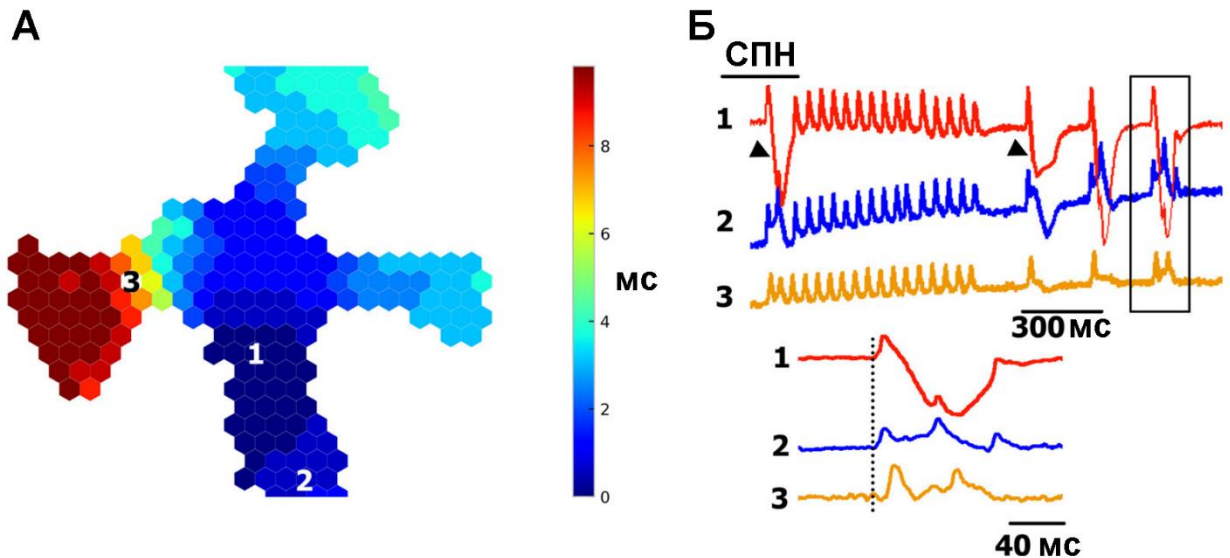


Рис. 4.3.26. Эктопическая активация ткани легочных вен мышей BALB/c при стимуляции постганглионарных интрамуральных нервов. **А.** Репрезентативный пример изохронной карты активации ЛВ в результате одного из повторяющихся эктопических возбуждений, индуцированных стимуляцией интрамуральных нервов. Синий цвет соответствует месту возникновения возбуждения. Эктопический очаг локализуется в участке между устьем вен и зоной ветвления. **Б.** Записи оптических сигналов из точек (1-3), отмеченных в изохронной карте. Сегмент записи, ограниченный черным прямоугольником, показан внизу с большей временной разверткой. СПН – момент стимуляции постганглионарных нервов.

4.3.3. Распространение возбуждения в миокардиальной ткани легочных вен кролика

В экспериментах с оптическим картированием электрической активности установлено, что у кролика антероградное распространение волны возбуждения возможно лишь на небольшое расстояние (3-5 мм) от устьев легочных вен (как при электрической стимуляции, так в комплексных препаратах включающих САУ и способных к автоматической активности). Возбудимостью обладает весь периметр устьев ЛВ. Нанесение возбуждающих стимулов на расстоянии более 4-5 мм от устьев ЛВ не приводит к возбуждению ткани. Преобладающая часть (внелегочные сегменты) легочных вен у кролика является электрически невозбудимой. Электрически возбудимым является лишь небольшой кольцевой сегмент, прилегающий к устьям ЛВ, к миокарду левого предсердия и, фактически, являющийся преддверием (антрумом) левого предсердия. При антероградном распространении (из левого предсердия) за пределами устьев ЛВ (иначе, за пределами антрума предсердия) волна возбуждения угасает, а активный ответ, сменяется пассивным сдвигом мембранного потенциала, наблюдаемым в пределах 0,1-1 мм (Рис. 4.3.27).

Таким образом, у кролика четкое выделение миокардиальных рукавов легочных вен, как самостоятельных структур, демонстрирующих биоэлектрическую активность, затруднено. Невозбудимость большей части ЛВ, очевидно, обусловлена отсутствием миокардиальных слоев или тяжей в их стенке. Наибольший интерес представляет оценка паттерна активации именно в устьях ЛВ. Однако, вследствие небольшой протяженности переходной зоны, возможна лишь грубая оценка локальных параметров проведения возбуждения.

Параметры проведения волны возбуждения в свободной стенке левого предсердия и возбудимом участке устьев ЛВ (антруме) сопоставимы. Скорость проведения составляет 69 ± 11 (n=5) и 65 ± 7 мм/с (n=5), соответственно; длина волны возбуждения составляет в этих участках миокарда - 45-65 мм (59 ± 12 мм, n=5). Таким образом, протяженность миокардиализированных участков в области устьев ЛВ у кролика существенно меньше длины волны возбуждения. Ни в одном из экспериментов (n=5) не наблюдали блоков проведения или формирования контуров циркуляции возбуждения в области устьев ЛВ при стационарной электрической стимуляции с длительностью межимпульсных интервалов $S1S1=300$ мс. Также не наблюдали вышеуказанных нарушений проведения возбуждения при длительности межимпульсных интервалов равной ФРП (150 ± 25 мс). Снижение длительности межимпульсных интервалов приводит к формированию периодики Венкебаха в возбудимых участках ЛВ и прилегающем предсердном миокарде.

Ретроградное возбуждение и проведение (т.е. из ЛВ в предсердие) возможно только при размещении стимулирующих электродов непосредственно в области устьев легочных вен, прилегающей к предсердию (антруме левого предсердия). Ретроградная скорость проведения в антруме сходна с величиной антероградной скорости (61 ± 7 см/с при $S1S1=300$ мс, $p > 0,1$, $n=5$).

В отличие от крыс, кратковременное прекращение стационарной электрической стимуляции устьев ЛВ кролика не приводит к подавлению проведения возбуждения (при последующем возобновлении ритмического возбуждения). Антероградная скорость проведения возбуждения в антруме и устьях ЛВ после периода покоя (1-5 мин) существенно не снижается ($p > 0,1$, 60 ± 15 см/с при $S1S1=300$ мс, $n=5$). Как ранее показано, для покоящейся ткани устьев ЛВ кролика характерна лишь незначительная ($6,5 \pm 2,4$ мВ) спонтанная деполяризация потенциала покоя. Менее лабильный ПП в ЛВ у кролика, чем у крыс, вероятно, определяет незначительное влияние режима активации на $\theta_{ср}$.

Также, в отличие от крысы, ацетилхолин (1 мкМ, $n=3$) и изопротеренол (10 мкМ, $N=3$) не оказывают существенного влияния на среднюю скорость проведения возбуждения в устьях ЛВ ни при постоянной стимуляции, ни ее возобновлении после периода покоя.

Согласно литературным данным, для кардиомиоцитов легочных вен, миокардиальных препаратов легочных вен кролика свойственна спонтанная (автоматическая) активность *ex vivo* и, возможно, аритмогенная активность *in vivo*. Вероятно, такими электрофизиологическими свойствами обладает миокард из области устьев ЛВ. В наших экспериментах при использовании комплексных тканевых препаратов в условиях покоя (т.е. без электрической стимуляции) в 6 из 7 случаев возникала спонтанная активность. В 3 случаях эктопический источник спонтанной активности действительно располагался в области устьев легочных вен. В этих экспериментах возбуждение охватывало устья легочных вен, затем свободную стенку и ушко левого предсердия. В остальных случаях источник автоматии располагался в предсердном миокарде за пределами зоны картирования, т.е. за пределами устьев ЛВ.

Согласно нашим наблюдениям, небольшие участки миокарда в легочных венах кролика, с точки зрения проведения возбуждения, представляют собой продолжение предсердного миокарда. Таким образом, миокардиальные рукава легочных вен крысы и кролика существенно различаются не только анатомически, но и функционально.

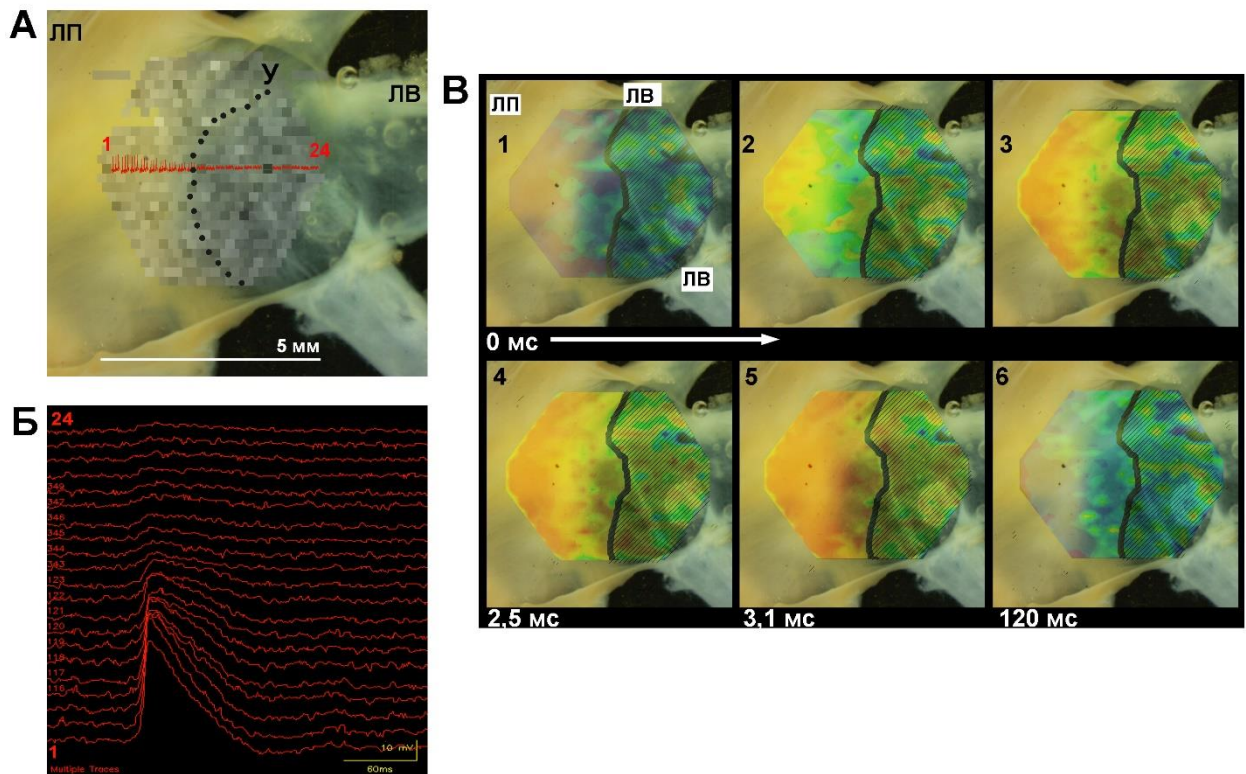


Рис. 4.3.27. Активация устья легочной вены кролика. **А.** Область картирования и индивидуальные оптические сигналы (1-24) в области устья легочной вены кролика. Пунктиром обозначена условная, визуально определяемая, граница между предсердным миокардом и легочной веной в области ее устья (У). Оптические ПД наблюдаются лишь на небольшом удалении (1-1,5 мм) от устья легочной вены. **Б.** Оптические сигналы, регистрируемые при картировании по линии, обозначенной красным цветом на «А». Оптический сигнал «1» зарегистрирован в предсердном миокарде; оптический сигнал «24» зарегистрирован дистальнее устья ЛВ. **В.** Последовательные картины, соответствующие активации левого предсердия, устья и легочной вены кролика. Вертикальная изогнутая линия отграничивает возбудимую (слева) и невозбудимую (справа, заштриховано) область. Деполяризованная область ткани показана желтым, оранжевым и красным цветом. Граница возбудимой и невозбудимой областей соответствует устью легочной вены.

4.3.4. Распространение возбуждения в миокардиальной ткани легочных вен морской свинки

4.3.4.1. Хронотопография активации легочных вен морской свинки при стационарной и нестационарной активации

У морских свинок, как и у крыс, способностью проводить волну возбуждения обладают все участки легочных вен. Как при естественном способе активации, т.е. в результате поступления возбуждения из САУ и правого предсердия, так и при искусственной активации, вызываемой нанесением возбуждающих электрических импульсов от биполярных электродов, расположенных в миокарде левого предсердия, волна возбуждения распространяется от предсердной части препарата через область устья в проксимальные и дистальные отделы легочных вен (**Рис.4.3.28**).

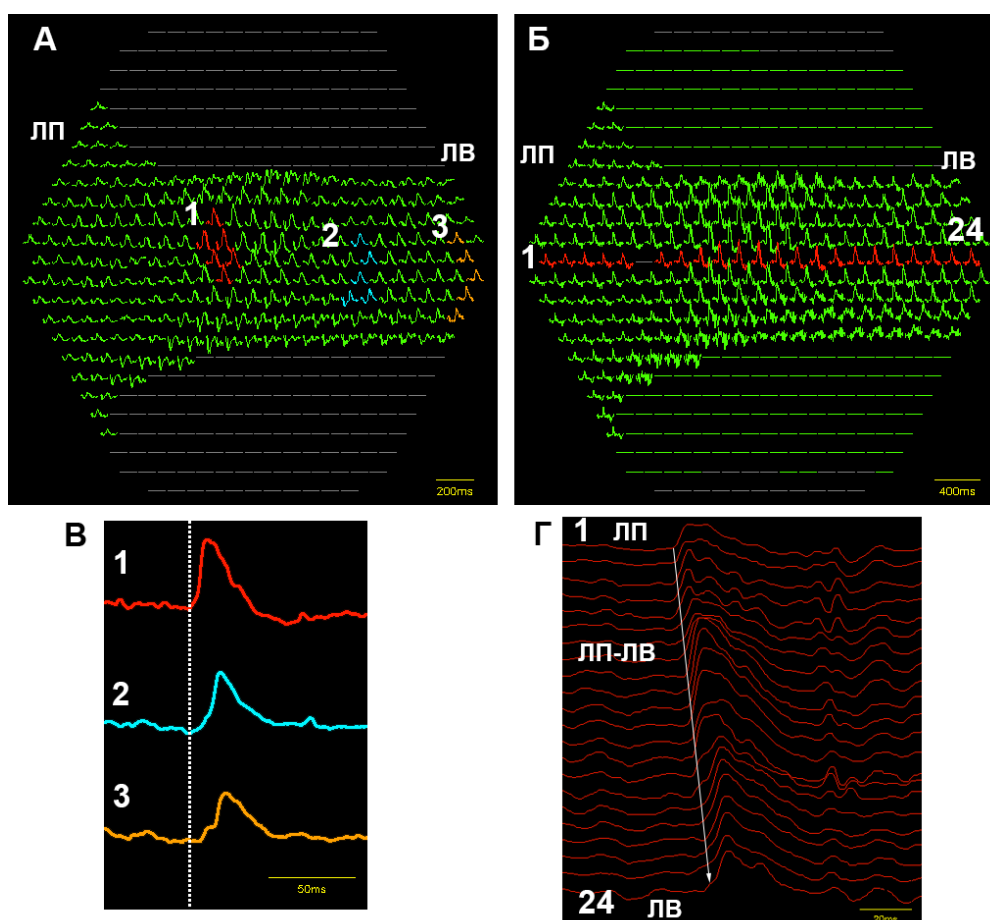


Рис.4.3.28. Активация миокардиальной ткани в области устья и дистального участка ствола легочной вены морской свинки. **А, Б.** Индивидуальные оптические сигналы – оптические ПД в миокардиальной ткани легочных вен. **В.** Усредненные оптические сигналы, регистрируемые в области устья ЛВ (1), в стволе легочной вены (2, 3). **Г.** Индивидуальные оптические сигналы (1-24, выделено красным цветом), регистрируемые при распространении волны возбуждения из левого предсердия (ЛП) в дистальные участки ЛВ. Стрелкой показана последовательность активации и индукции ПД в картируемом участке тканевого препарата.

Следует отметить, что в том случае, когда частота нанесения возбуждающих стимулов была близка к естественной частоте возбуждений у данных животных (240-300 удм/мин или 3,3-6,6 Гц), антероградная скорость проведения возбуждения в предсердном миокарде и миокарде легочных вен различалась незначительно (41 ± 10 и 45 ± 8 см/с, $n=5$). Однако, величина $\theta_{ср}$ в легочных венах морской свинки оказалась статистически значимо меньше, чем в ЛВ крысы и мыши ($p < 0,05$). Паттерн активации устьев и дистальных участков легочных вен у морской свинки сходен с таковым, характерным для свободной стенки левого предсердия: в легочных венах не наблюдается блоков проведения, искривления фронта волны возбуждения. Для ЛВ морской свинки характерна высокая степень «равномерности» проведения волны возбуждения в стационарном режиме возбуждения (Рис.4.3.28.Г). Локальная скорость проведения возбуждения одинакова в устьях ЛВ, стволе легочных вен, а также в области их бифуркации (42 ± 7 , 44 ± 11 , 39 ± 12 см/с, соответственно, $n=5$, $p > 0,1$).

Волна возбуждения при антероградном режиме активации распространяется через область бифуркации вен и охватывает все ветви ЛВ. В зоне бифуркации ни в одном из экспериментов ($n=6$) не наблюдали блоков проведения возбуждения, снижения скорости проведения или формирования невозбудимых зон (Рис.4.3.29).

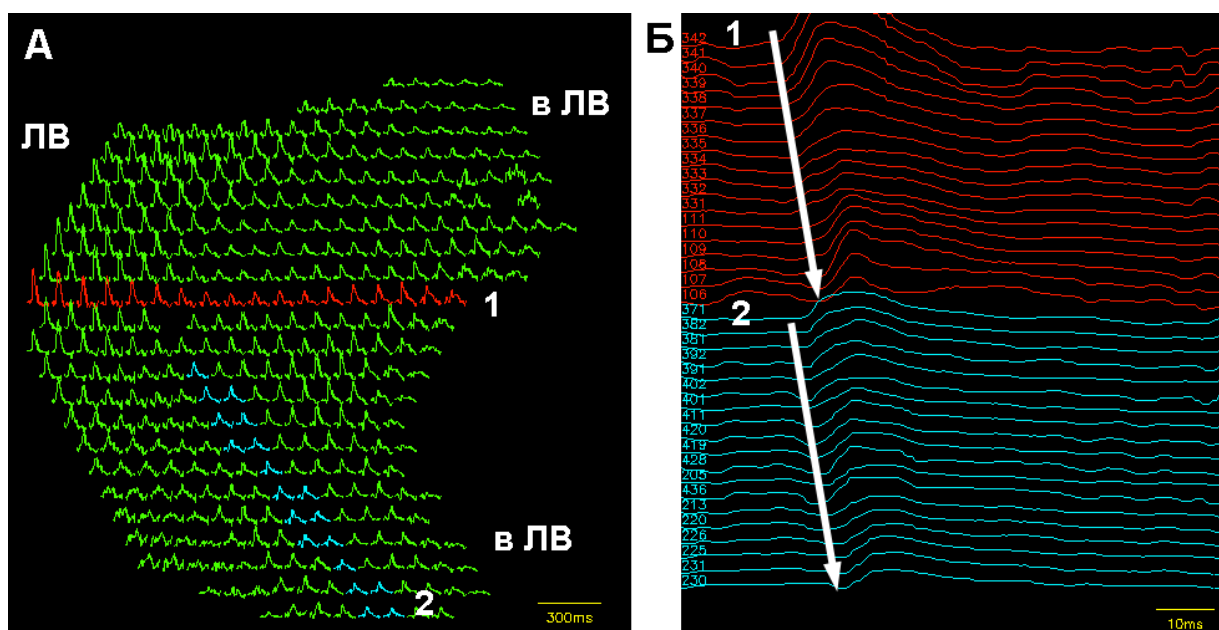


Рис.4.3.29. Активация миокардиальной ткани в области бифуркации легочной вены морской свинки. **А.** Индивидуальные оптические сигналы – оптические ПД в миокардиальной ткани легочных вен. **Б.** Индивидуальные оптические сигналы, регистрируемые в областях, выделенных красным и голубым цветом на А при распространении волны возбуждения из ствола легочной вены (ЛВ) через бифуркацию ЛВ в ветви ЛВ (в ЛВ). Стрелкой (1, 2) показаны последовательности активации и индукции ПД в картируемом участке тканевого препарата.

При длительности межимпульсных интервалов близкой ФРП (ФРП в данной серии экспериментов составлял 80 ± 7 мс, $n=11$) средняя скорость проведения возбуждения в ЛВ морской свинки оказывалась незначительно (34 ± 7 см/с, $n=16$, $p(T) > 0.05$) сниженной по сравнению со скоростью при $S1S1=250$ мс. При достижении ФРП в формировалась периодика Венкебаха: только каждая вторая волна возбуждения успешно охватывала миокард легочных вен и левого предсердия. В таких случаях блок возбуждения в ответ на каждый второй импульс происходил в непосредственной близости к месту расположения стимулирующих электродов (в области устьев ЛВ, Рис.4.3.30). Следует отметить, что при активации с частотой, близкой к ФРП в легочных венах морской свинки не наблюдали заметных альтернаций паттерна активации, осцилляций длительностей ПД.

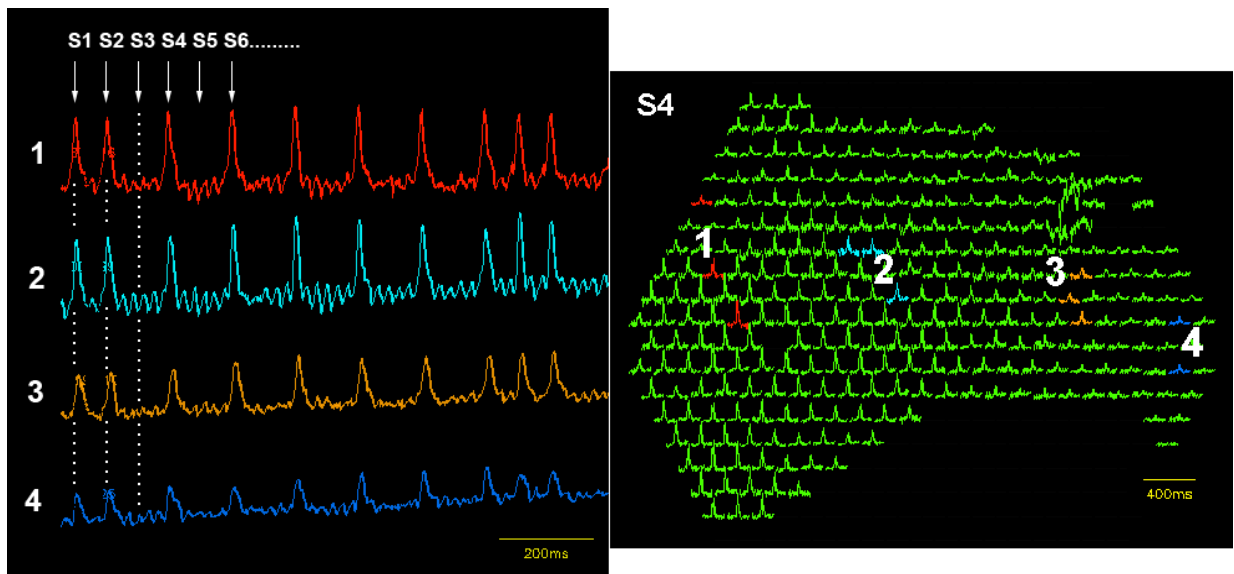


Рис.4.3.30. Периодика Венкебаха в легочных венах (ЛВ) морской свинки при электрической стимуляции с интервалами, равными длительности функционального рефрактерного периода. **А.** Оптические сигналы (оптические ПД), регистрируемые в левом предсердии (1), устье ЛВ (2) и стволе ЛВ (3, 4) в моменты нанесения возбуждающих стимулов ($S1, S2 \dots$). Все участки картируемого миокарда генерируют ПД в ответ на стимулы $S1, S2, S4, S6$, но ни один не отвечает возбуждением на стимулы $S3, S5$. **Б.** Индивидуальные оптические сигналы (оптические ПД) в миокардиальной ткани легочных вен, возникающие в ответ на стимул $S4$.

В данной серии экспериментов, наименьший интервал между очередным и внеочередным стимулом, приводящий к активации легочных вен, составлял $S1S2ERP=78 \pm 12$ мс ($n=5$). Длительность эффективного рефрактерного периода в ЛВ (стволе ЛВ), незначительно меньше, чем длительность ФРП ($p(U) > 0.1$). Скорость проведения возбуждения, возникающего в ЛВ в ответ на $S2ERP$, существенно снижена - $\theta_{ср}$ составляла в данных экспериментах 21 ± 11 см/с. Тем не менее, характер активации миокарда легочных вен морской свинки в ответ на нанесение внеочередного стимула несущественно отличался от такового, наблюдаемого при нанесении регулярных,

прекондиционирующих стимулов (Рис.4.3.31): ни в пограничной зоне между предсердием и легочной веней (в устье ЛВ), ни в стволе или области бифуркации ЛВ не наблюдали искажения фронта волны проведения, либо блоков проведения возбуждения в ответ на S2ERP-стимул. Таким образом, для миокардиальных рукавов ЛВ морской свинки характерен крайне стабильный паттерн активации; миокардиальная ткань различных участков ЛВ морской свинки демонстрирует высокую однородность и проведения волны возбуждения как при стационарном, так и при нестационарном режиме активации.

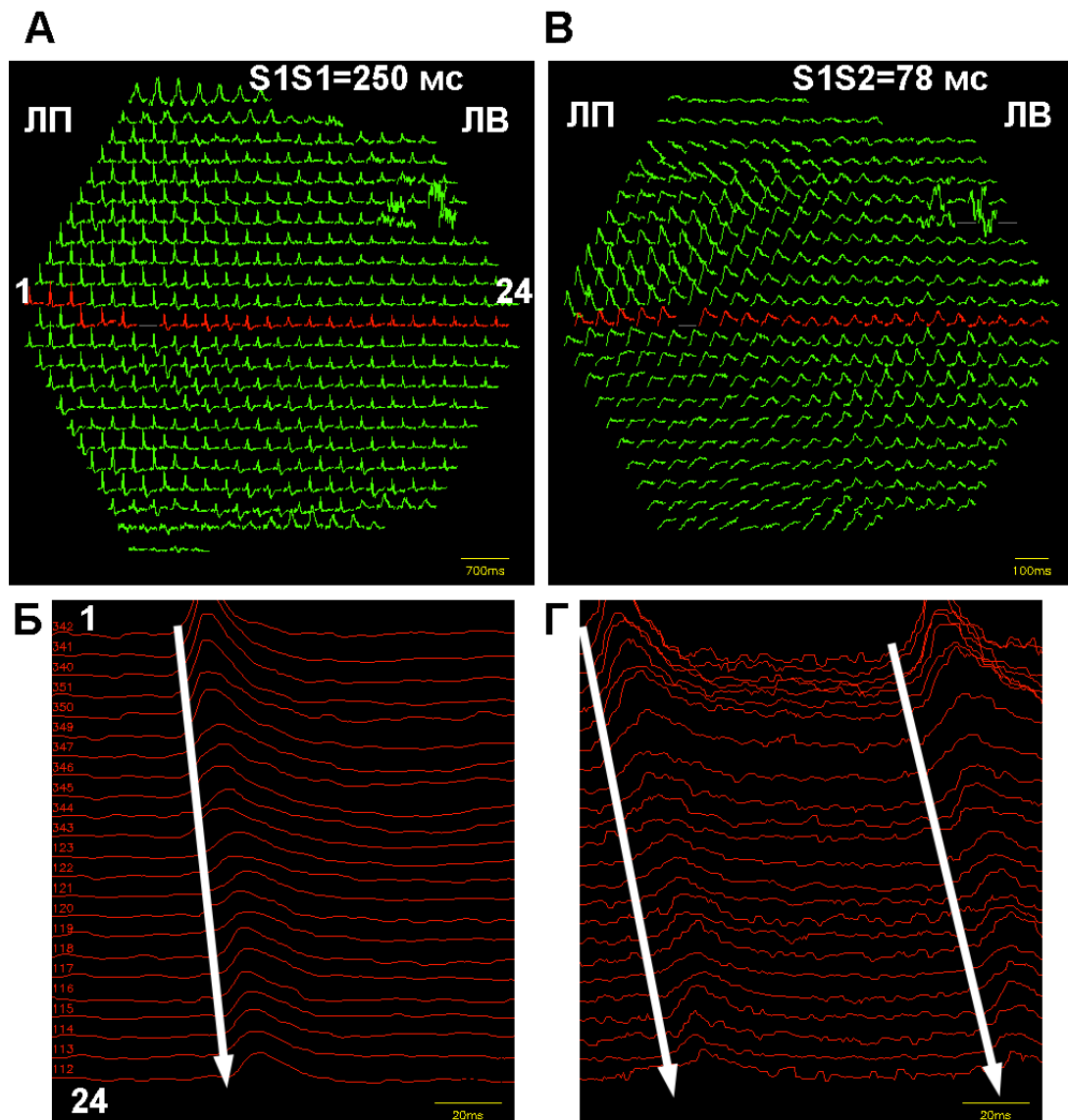


Рис. 4.3.31. Активация миокарда легочных вен морской свинки в ответ на внеочередной (S2, «экстрасистолический») стимул, наносимый после прекодиционирующего (S1) стимула с интервалом, равным длительности эффективного рефрактерного периода (ЭРП, S1S2=78 мс). **А, Б.** Индивидуальные оптические сигналы (оптические ПД), регистрируемые в миокардиальной ткани легочных вен в ответ на прекодиционирующий возбуждающий стимул (S1). Стрелкой показана последовательность (1-24) активации и индукции ПД в участке тканевого препарата, выделенном красным цветом. **В, Г.** То же, что и в А, Б, но для прекодиционирующего (S1) и внеочередного (S2) стимула, нанесенного через 78 мс после S1.

4.3.4.2. Хронотопография активации легочных вен морской свинки при холинергическом воздействии

Ацетилхолин (1-10 мкМ) не приводил к заметному изменению характера активации миокарда легочных вен морской свинки при стационарной стимуляции. При действии АЦХ, ни в устьях, ни в области бифуркации, ни в дистальных участках легочных вен не происходило возникновения зон невозбудимости, задержек, блоков проведения или искажения фронта волны возбуждения (Рис.4.3.32). Наоборот, ацетилхолин вызывал небольшое увеличение $\theta_{ср}$ в миокарде ЛВ: от 45 ± 8 см/с в контроле (n=5), до 51 ± 8 см/с при действии 10 мкМ АЦХ (n=3). Как и в контрольных условиях, при действии АЦХ для миокардиальной ткани легочных вен и предсердий характерен крайне сходный паттерн активации.

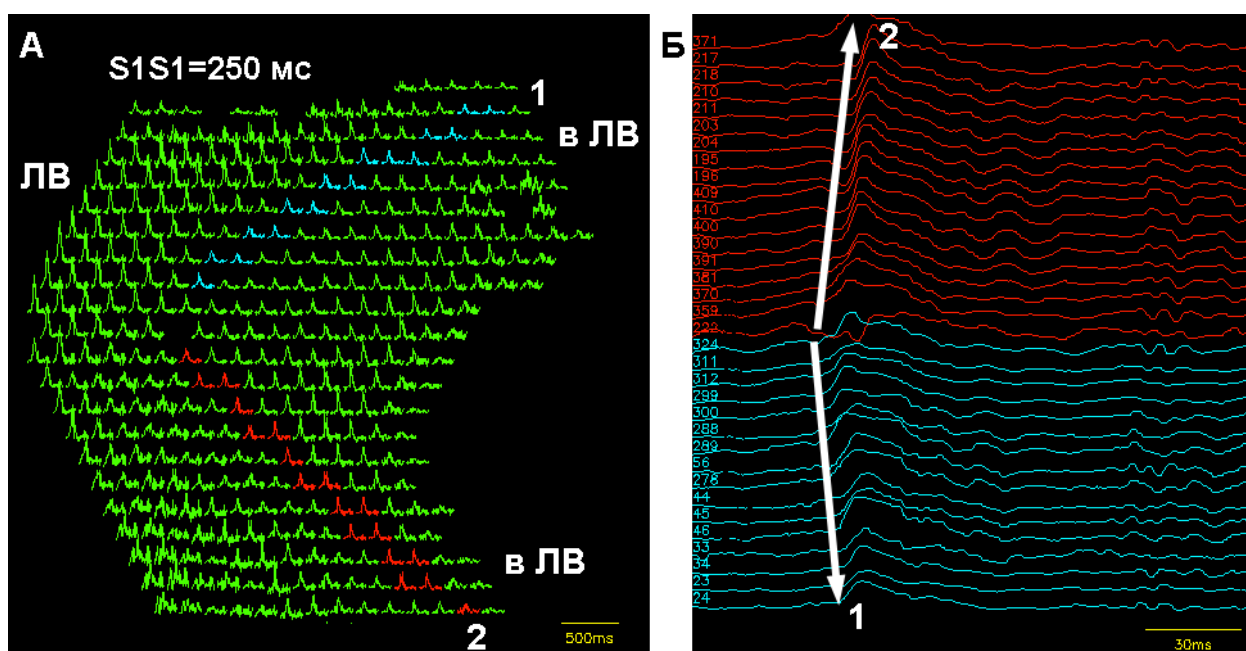


Рис.4.3.32. Активация миокардиальной ткани в области бифуркации легочной вены морской свинки при действии ацетилхолина (1 мкМ). **А.** Индивидуальные оптические сигналы (оптические ПД) в миокардиальной ткани легочных вен. **Б.** Индивидуальные оптические сигналы, регистрируемые в областях, выделенных красным и голубым цветом на А при распространении волны возбуждения из ствола легочной вены (ЛВ) через бифуркацию ЛВ в ветви ЛВ (в ЛВ) на фоне действия АЦХ. Стрелкой (1, 2) показаны последовательности активации и индукции ПД в картируемом участке тканевого препарата.

Таблица 1. Нарушения хронотопографии активации миокарда легочных вен и предсердия при различных (нестационарных) режимах возбуждения.

	S1S1-протокол; интервалы между S1 стимулами близки к ФРП										S1S2-протокол; интервалы между S1 и S2 стимулами близки к ЭРП				Кратковременное (1 мин) прекращение стимуляции	
	Блоки проведения возбуждения		осцилляции (альтернации) паттерна активации		Осцилляции (альтернации) длительности ПД		локальные нарушения характера проведения		стабильный паттерн активации		блоки проведения возбуждения		локальные нарушения характера проведения		блоки проведения возбуждения	
	n=11										n=7				n=5	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
участок миокарда левое предсердие	1	9	0	0	0	0	5	45	6	55	0	0	4	57	0	0
	n=5+6*										n=5+5*				n=10	
устье ЛВ	0	0	0	0	0	0	3*	50	2	18	0	0	4*	80*	0	0
ствол ЛВ	0	0	6	54	5	50	6	55	2	18	0	0	5	50	0	0
ветви ЛВ	3	27	3 (из 8)	37	4 (из 8)	50	9	82	2	18	0	0	4	40	3	30

Под «локальными нарушениями характера проведения» подразумевается локальное снижение скорости проведения без заметных осцилляций паттерна активации. * - в расчет взяты только те случаи, когда возбуждение было инициировано в предсердном миокарде и волны возбуждения распространялась через устье в ствол легочной вены. n – количество тканевых препаратов.

4.3.5. Пассивные электрические характеристики миокарда легочных вен

Определение пассивных электрических свойств, в частности константы длины (или постоянной затухания электротонического потенциала, λ), имеет принципиальное значение для понимания процессов распространения возбуждения в миокарде легочных вен, теоретического и практического обоснования механизмов формирования нарушений ритма в этой ткани.

Прямая оценка λ с помощью двухэлектродных отведений затруднена, вследствие гистологической или электрической гетерогенности ткани, крайне малых физических размеров областей ткани. Именно такие свойства характерны для участков миокарда легочных вен грызунов, используемых в экспериментальных исследованиях. 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 (t_k) в точке регистрации электрически вызванных ПД с учетом некоторых упрощений (см. раздел материалы и методы).

В Табл. 2 представлены значения t_k , а также рассчитанные значения константы длины для левого предсердия и легочных вен трех видов животных. Характерные примеры изменения мембранного потенциала в ходе «допороговой» фазы ПД в предсердиях и ЛВ крысы, кролика, морской свинки приведены на Рис. 4.3.33.

	ткань	t_k , мс, ср±ст.ош.ср.	θ_m , м/с	λ , мм, ср±ст.ош.ср.
Крыса	ЛП (n=9)	0,29±0,03	0,84	0,25±0,02
	устья ЛВ (n=5)	0,31±0,02	0,8	0,25±0,02
	ЛВ (n=6)	0,15±0,02	0,71	0,10±0,01
Кролик	ЛП (n=5)	0,18±0,03	0,72	0,13±0,02
	Устья ЛВ (n=5)	0,50±0,16	0,72	0,36±0,12
	ЛВ (n=5)	0,33±0,11	0,72	0,24±0,08
Морская свинка	ЛП (n=3)	0,18±0,01	0,37	0,07±0,01
	ЛВ(n=3)	0,33±0,06	0,4	0,13±0,02

Таблица 2. Значения константы скорости пассивного изменения потенциала (t_k), максимальные значения скорости проведения возбуждения (θ_m , для данной серии экспериментов) и константа длины (λ) у крысы, кролика и морской свинки. ЛП – левое предсердие, ЛВ – легочные вены.

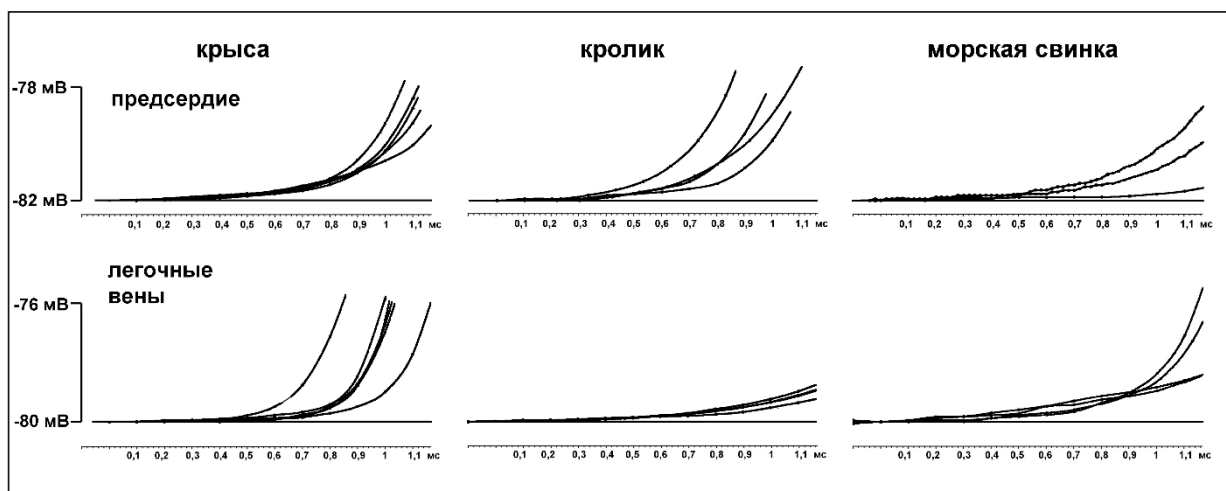


Рис. 4.3.33. Примеры «допороговых» фаз (фаз пассивного, электротонического сдвига мембранного потенциала) ПД в предсердии и легочных венах крысы, кролика и морской свинки. Для пассивного сдвига мембранного потенциала на одну и ту же величину необходимы разные интервалы времени.

Константа длины в предсердии ($n=9$) и устьях ЛВ ($n=6$) крысы имеет вдвое большее значение, чем таковое в дистальных участках ЛВ ($n=6$) – $0,25 \pm 0,02$, $0,25 \pm 0,02$ и $0,10 \pm 0,01$ мм, соответственно ($p(U) < 0,05$). Константа длины в предсердном миокарде кролика составляет $0,13 \pm 0,02$ мм ($n=6$), что существенно ($p(U) < 0,05$) меньше, чем в «устьях» и наиболее дистальных участках ЛВ, демонстрирующих электрическую возбудимость ($0,36 \pm 0,12$ и $0,24 \pm 0,08$ мм, соответственно). У морской свинки, как и у кролика, λ меньше в предсердном миокарде, чем в ЛВ ($0,13 \pm 0,02$ и $0,07 \pm 0,01$ мм, соответственно, $n=4$), (Рис. 4.3.34).

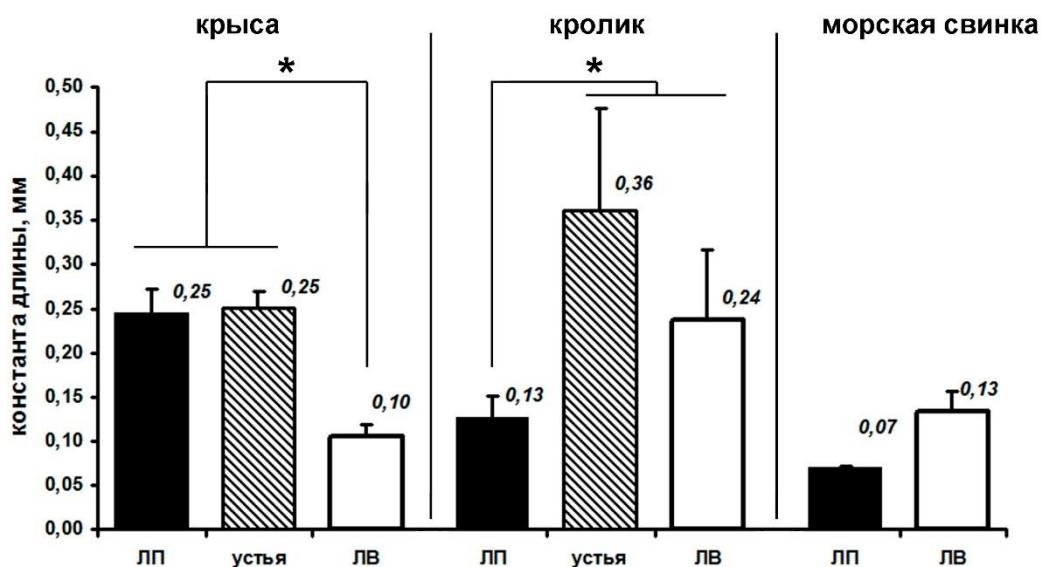


Рис. 4.3.34. Константа длины в левом предсердии (ЛП), устьях и миокардиальных рукавах легочных вен (ЛВ) крысы, кролика, морской свинки. *- $p < 0,05$.

4.4. Иммуноэкспрессия белков щелевых контактов в миокардиальной ткани легочных вен

Для рабочего (непейсмерного) миокарда левого и правого предсердия характерен высокий уровень экспрессии белков щелевых контактов (коннексинов) высокой проводимости – Сх43. У взрослых животных (в т.ч. крыс) иммунофлюоресценция Сх43 в срезах выявляется в виде характерных линий, располагающихся в полярных (иначе, торцевых) областях кардиомиоцитов (Рис. 4.4.1, А, Б, Г). Линии специфической флюоресценции соответствуют локализации интеркалярных дисков между кардиомиоцитами. В то же время, для рабочего предсердного миокарда не характерна экспрессия белков щелевых контактов Сх45, типичных для миокарда сино-атриального узла и имеющих низкую проводимость. В срезах предсердного миокарда взрослых крыс иммунофлюоресцентными методами экспрессия Сх45 не выявляется (Рис. 4.4.1., В).

Как и в рабочем миокарде предсердий, в стенке легочных вен (снаружи от внутренней оболочки и небольшого слоя гладкомышечных клеток) обнаруживается интенсивная иммуноэкспрессия белков 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. 4.4.2. А, Б). 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, рассчитанное на площадь 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 не обнаружена экспрессия белков коннексинов Сх45 (Рис. 4.4.2 Б, В, Рис. 4.4.3).

В предсердном рабочем (непейсмерном) миокарде предсердий взрослых крыс иммуногистохимическими методами экспрессия высокопроводящего коннексина Сх40 не обнаруживается (Рис. 4.4.4). В отличие от взрослых животных, в срезах предсердного миокарда, полученных от новорожденных крыс (1 сут постнатальной жизни), отчетливо выявляется специфическая флюоресценция Сх40. Зоны флюоресценции обнаруживаются в виде цепочек отдельных «пятен», располагающихся по периферии неонатальных

кардиомиоцитов, включая их торцевые и латеральные участки (Рис. 4.4.5). Такой тип экспрессии белков щелевых контактов типичен для неонатального миокарда.

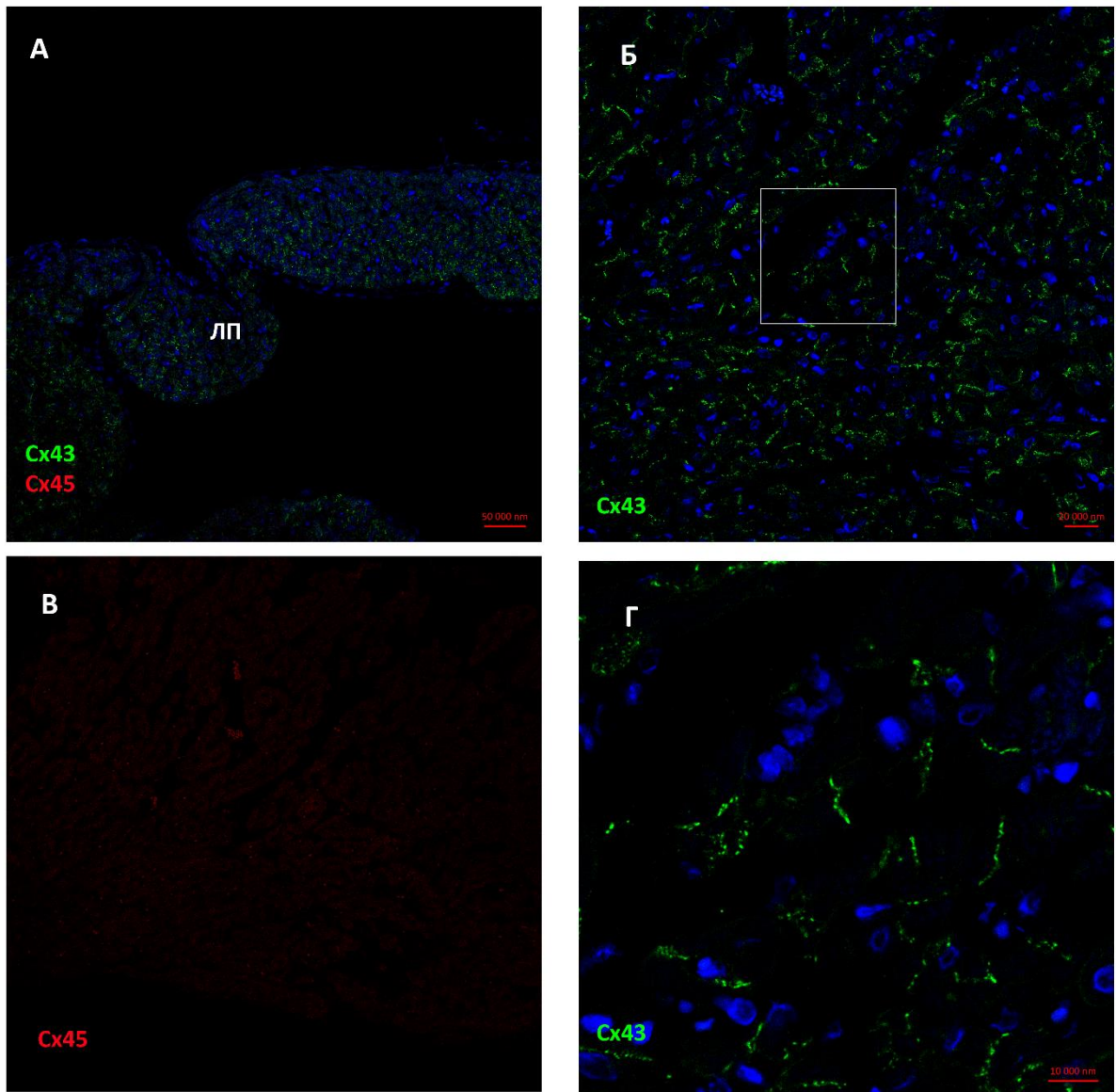


Рис. 4.4.1. Иммуноэкспрессия белков щелевых контактов Cx43 и Cx45 в миокарде правого предсердия взрослых крыс. Репрезентативные изображения, полученные с помощью конфокальной микроскопии. **А, Б.** Участки стенки левого предсердия при разном увеличении. Флюоресценция Cx43, показанная зеленым псевдоцветом, обнаруживается в виде полос в области контактов между кардиомиоцитами. **В, Г.** Область миокарда левого предсердия, ограниченная квадратной рамкой на Б при большом увеличении. Специфическая флюоресценция Cx45 отсутствует (красный псевдоцвет). Ядра окрашены DAPI (синий псевдоцвет).

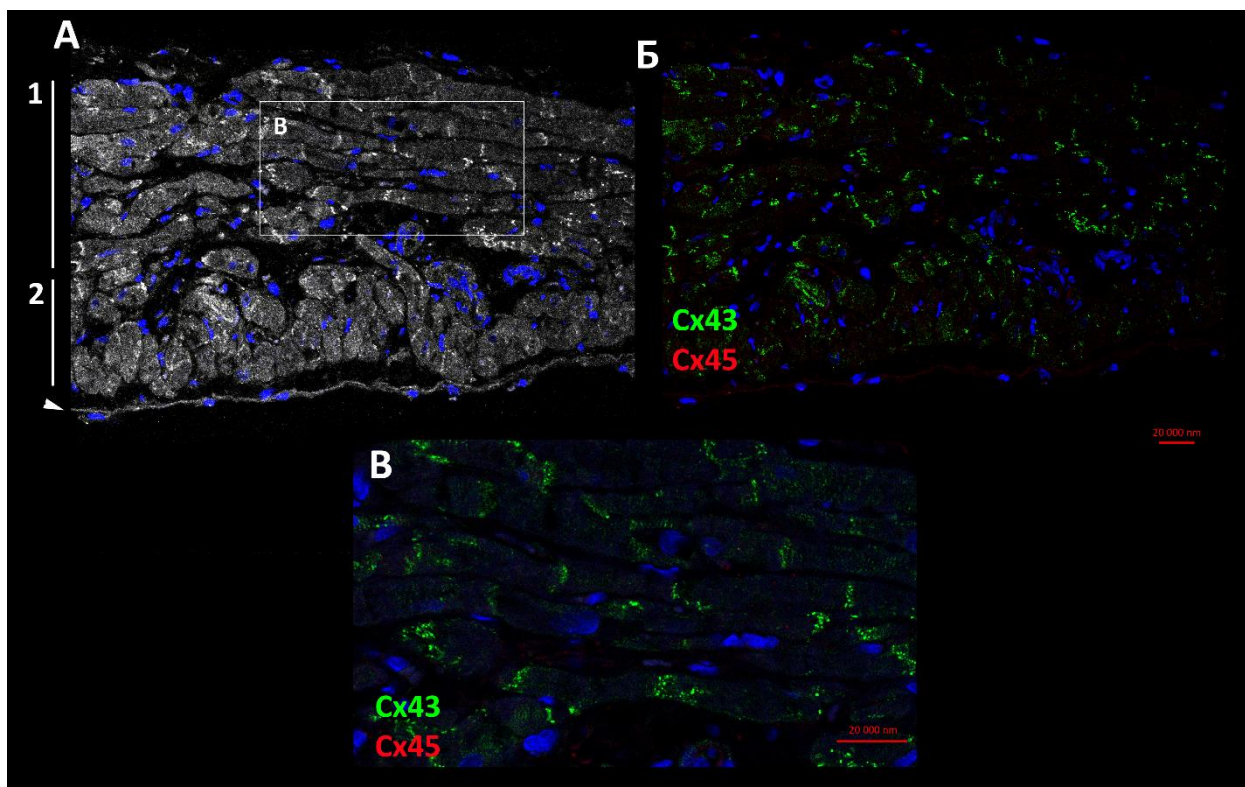


Рис. 4.4.2. Иммуноэкспрессия белков щелевых контактов Cx43 и Cx45 в миокарде легочных вен взрослых крыс. Репрезентативные изображения, полученные с помощью конфокальной микроскопии. **А.** Структура стенки легочной вены. 1 – внешний, радиальный слой кардиомиоцитов; 2 – внутренний, продольный (коаксиальный) слой миокардиальной ткани в ЛВ. Стрелка указывает на внутреннюю оболочку (*tunica intima*) стенки вены и слой гладкомышечных клеток. **Б, Б'.** Участки стенки легочной вены при разном увеличении. Флюоресценция Cx43, показанная зеленым псевдоцветом, обнаруживается в виде полос в области контактов между кардиомиоцитами. Специфическая флюоресценция Cx45 отсутствует (красный псевдоцвет). Ядра окрашены DAPI (синий псевдоцвет).

Как и в предсердиях, в миокарде легочных вен взрослых крыс не обнаружена специфическая флюоресценция, источником которой являются коннексины Cx40. Однако, в миокардиальной стенке легочных вен неонатальных животных (1 сут постнатальной жизни) выявляется интенсивная специфическая флюоресценция Cx40. Как и в предсердном миокарде, иммуноэкспрессия Cx40 обнаруживается в виде цепочек «пятен» на периферии кардиомиоцитов (Рис. 4.4.6).

Таким образом, предсердный миокард и миокард ЛВ крыс являются крайне сходными в плане экспрессии основных белков щелевых контактов, а также в плане онтогенетического этого изменения паттерна.

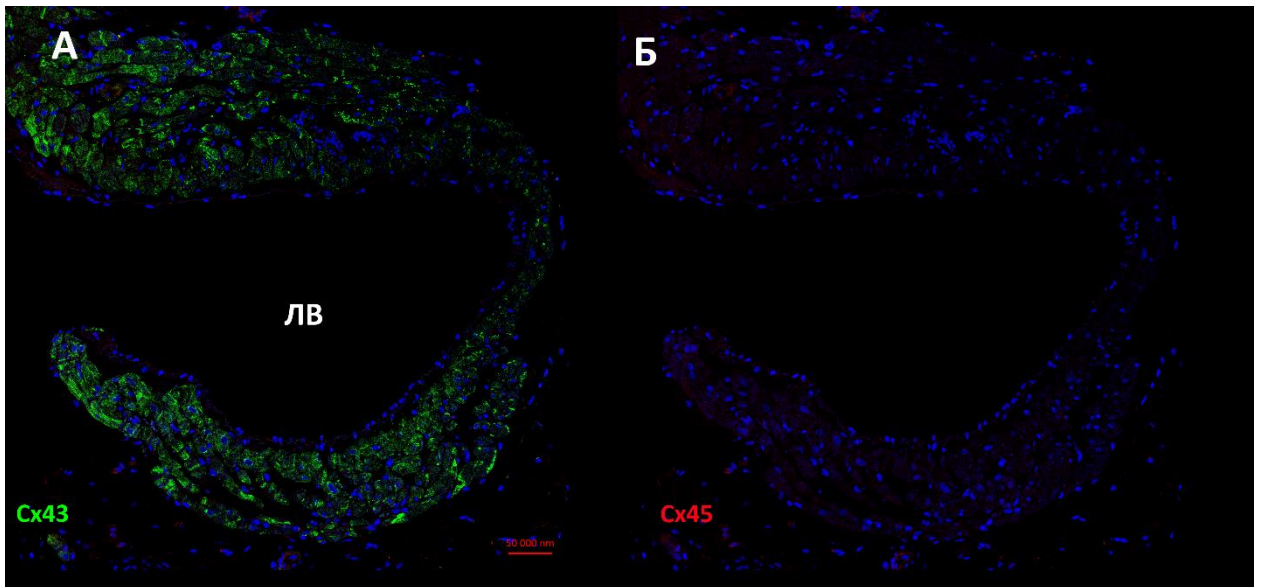


Рис. 4.4.3. Иммуноэкспрессия белков щелевых контактов Sx43 и Sx45 в миокарде легочных вен взрослых крыс. Репрезентативные конфокальные изображения среза легочной вены левой легочной доли, полученного из ветви ЛВ дистальнее зоны бифуркации. **А.** Флюоресценция Sx43, показанная зеленым псевдоцветом обнаруживается в виде полос в области контактов между кардиомиоцитами. **Б.** Специфическая флюоресценция Sx45 отсутствует (красный псевдоцвет).

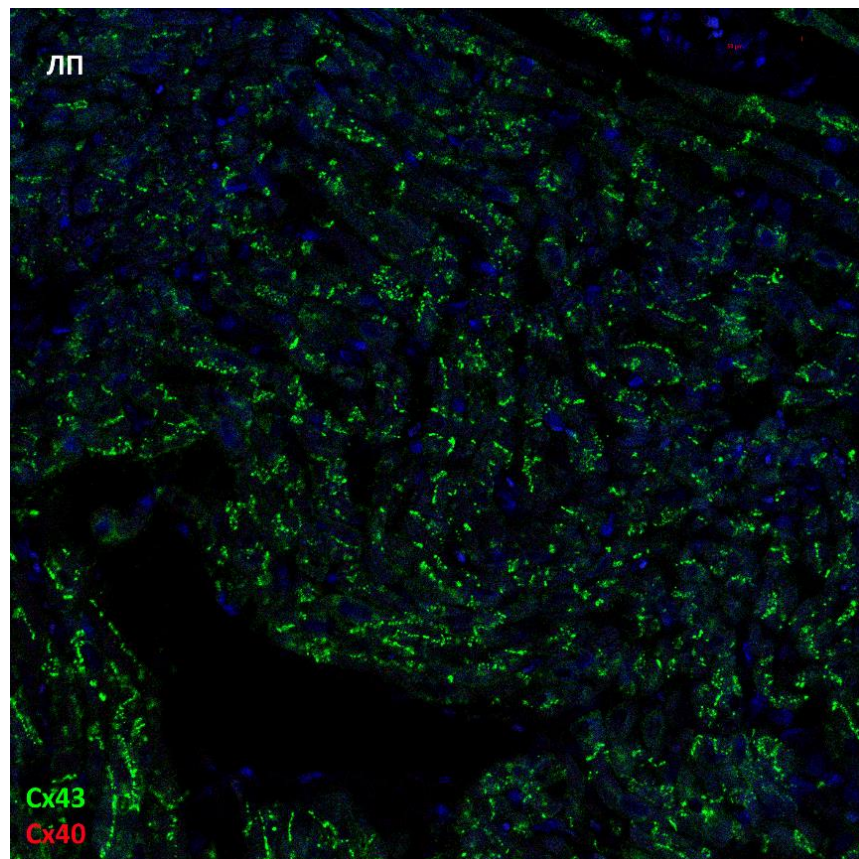


Рис. 4.4.4. Иммуноэкспрессия белков щелевых контактов Sx43 (зеленый псевдоцвет) и Sx40 (красный псевдоцвет) в миокарде правого предсердия взрослых крыс. Репрезентативное изображение, полученное с помощью конфокальной микроскопии. Ядра окрашены DAPI (синий псевдоцвет). Специфическая флюоресценция Sx40 отсутствует.

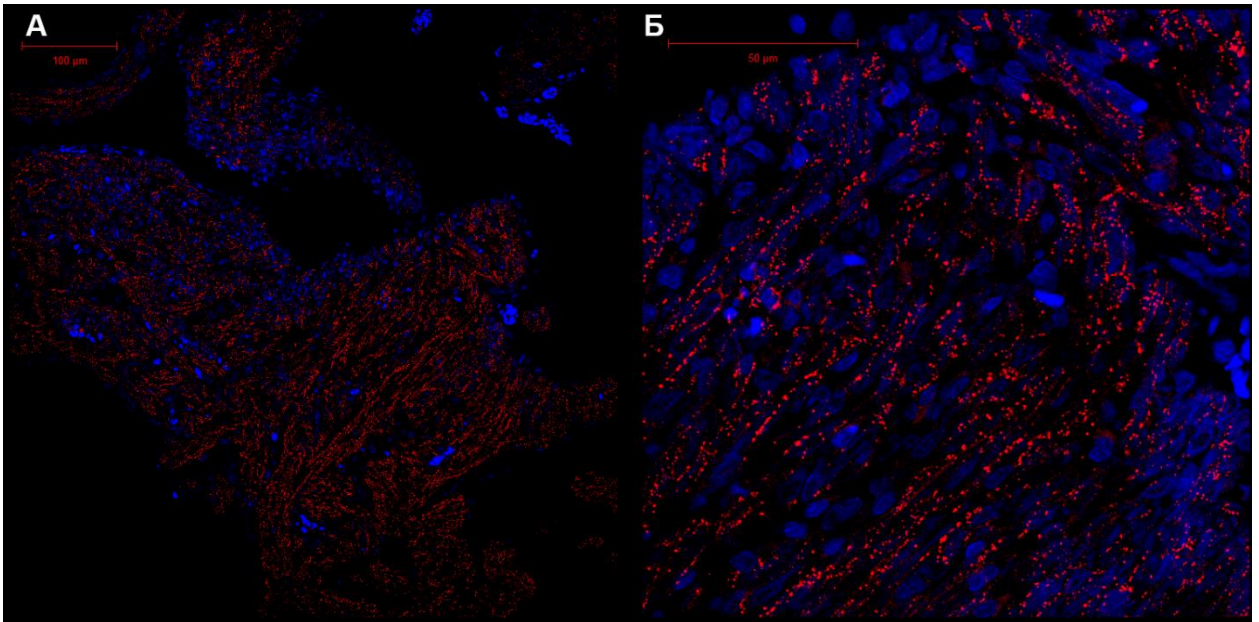


Рис. 4.4.5. Иммуноэкспрессия белков щелевых контактов Sx40 в миокарде правого предсердия неонатальных (1 сут постнатальной жизни) крыс при разном увеличении (А, Б). Флюоресценция Sx40 показана красным псевдоцветом. Ядра окрашены DAPI (синий псевдоцвет). Масштабная шкала – 100 мкм на А, 50 мкм на Б.

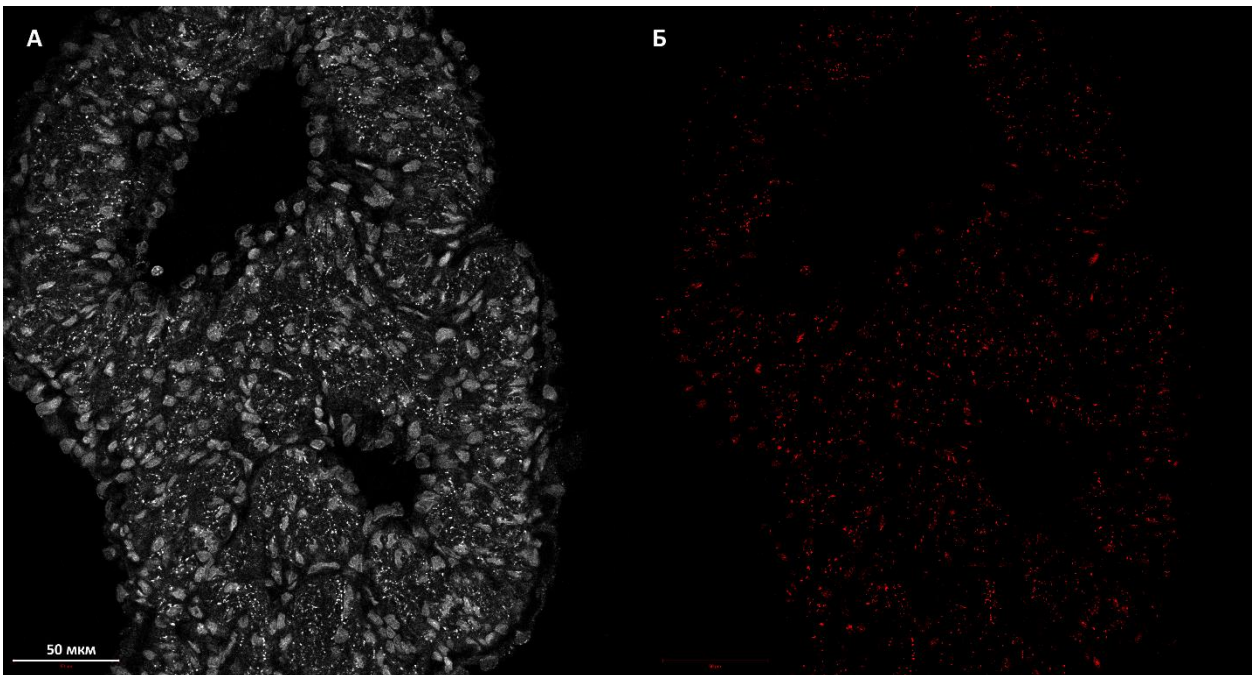


Рис. 4.4.6. Иммуноэкспрессия белков щелевых контактов Sx40 в миокарде легочных вен неонатальных (1 сут постнатальной жизни) крыс. А. Структура среза легочной вены. Подсвечены ядра неонатальных кардиомиоцитов. Б. Флюоресценция Sx40 показана красным псевдоцветом.

4.5. СИМПАТИЧЕСКАЯ ИННЕРВАЦИЯ ЛЕГОЧНЫХ ВЕН

4.5.1. Симпатическая иннервация миокардиальной ткани легочных вен крыс

Флюоресцирующие аддукты глиоксиловой кислоты и катехоламинов выявляются как в стенке предсердий, так и в стенке легочных вен. В тканевых миокардиальных препаратах специфическая флюоресценция обнаруживается в виде пятен, цепочек пятен или ветвящихся волокон. Вышеуказанные структуры имеют типичный вид, характерный для постганглионарных интрамуральных катехоламинэргических нервных окончаний. Таким образом, флюоресценция катехоламиновых аддуктов выявляет симпатическую иннервацию миокардиальной ткани.

Протяженность сети катехоламин-содержащих волокон пропорциональна развитости симпатической иннервации участка миокарда. Цепочки флюоресцирующих пятен соответствуют расширениям симпатических волокон (т.н. «варикозам») и являются признаком наличия зон накопления и высвобождения норадреналина (НА) в ткани.

Катехоламин-содержащие волокна в левом предсердии взрослых крыс формируют густую сеть и располагаются в толще миокарда, включая трабекулы, на различном расстоянии от эпи- и эндокардиальной поверхности (Рис.4.5.1). Таким образом, предсердный миокард взрослых крыс имеет богатую симпатическую иннервацию. Варикозы и, соответственно, активные зоны высвобождения НА в предсердном миокарде крыс обнаруживаются, начиная с 7 дня после рождения, а на 14 сут постнатальной жизни их количество достигает уровня, характерного для взрослых животных (Рис. 4.5.2).

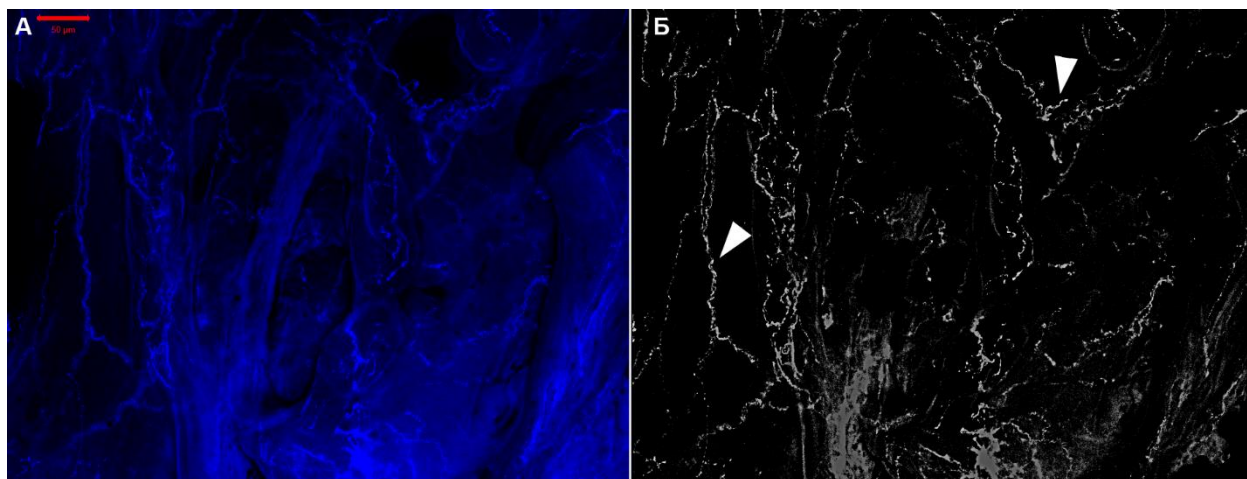


Рис. 4.5.1. Катехоламин-содержащие (симпатические) волокна в миокарде левого предсердия взрослой крысы. **А.** Изображение трабекулярзованной эндокардиальной поверхности участка левого предсердия (автофлюоресценция миокардиальных клеток и флюоресценция катехоламин-содержащих волокон). **Б.** Сеть катехоламин-содержащих волокон. Стрелками показаны типичные, ветвящиеся симпатические волокна. Стековая z-проекция, полученная с помощью алгоритма деконволюции и совмещения пикселей максимальной яркости. Флюоресценция аддуктов глиоксиловой кислоты и катехоламинов.

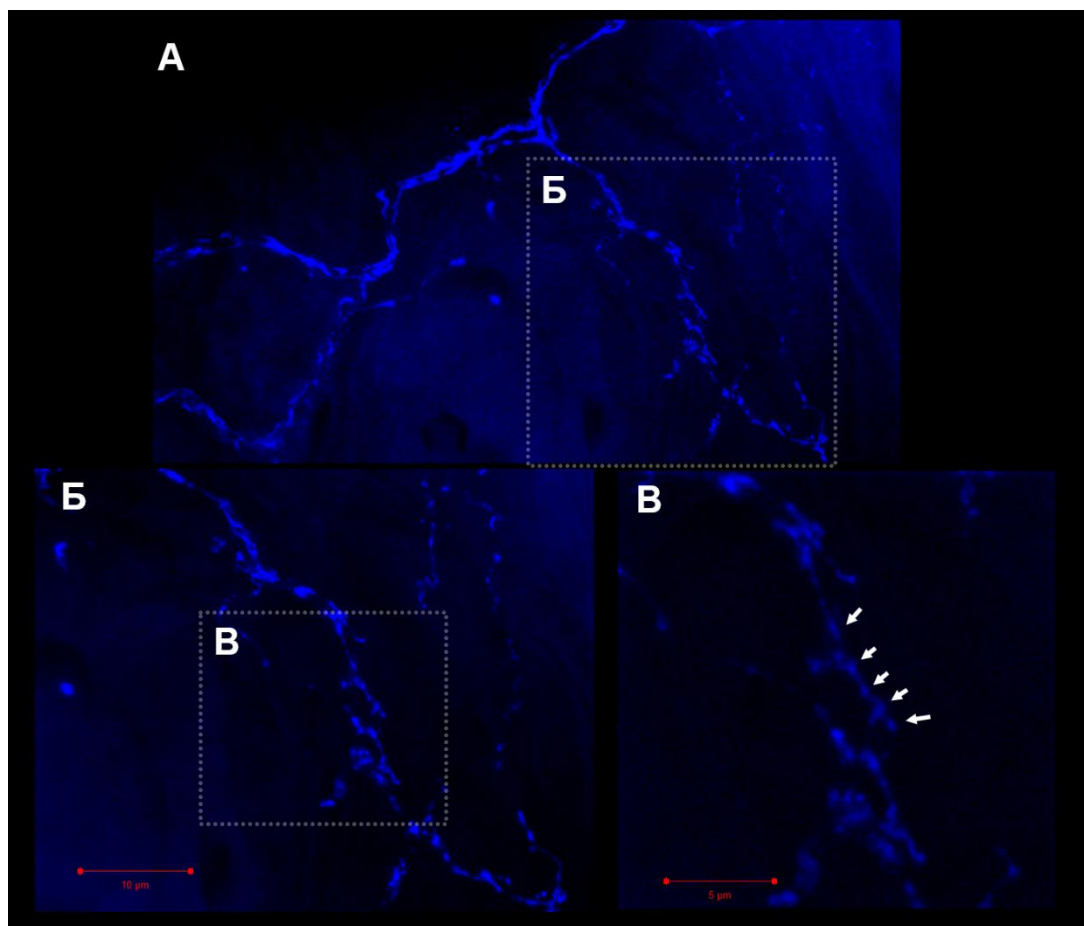


Рис. 4.5.2. Катехоламин-содержащие (симпатические) волокна и локальные расширения волокон (варикозы, показаны стрелками) в миокарде левого предсердия крысы возрастом 14 сут. А, Б, В. Показано при разном увеличении.

У взрослых крыс в стенке легочных вен обнаруживается густая сеть катехоламин-содержащих волокон. Цепочки флюоресцентных пятен, соответствующие симпатическим варикозам, присутствуют как в области устья ЛВ, так и в ветвях легочных вен (Рис. 4.5.3).

Катехоламин-содержащие волокна располагаются в стенке вен снаружи от миокардиальных слоев. Примечательно, что плотность сети волокон одинакова (статистически неразличима) как в устье, так и в зонах бифуркаций, в сегментах ветвей ЛВ непосредственно перед легочными долями (Рис. 4.5.4). В стенке ЛВ взрослых крыс, таким образом, не обнаруживаются участков, с повышенной или сниженной «плотностью» симпатической иннервации.

Плотность сети катехоламин-содержащих волокон в стенке ЛВ крыс увеличивается в ходе постнатального онтогенеза. У неонатальных животных (1-5 сут жизни) катехоламин-содержащие волокна в ЛВ отсутствуют. Как и в предсердном миокарде первые слабоветвящиеся волокна, а также мелкие, единичные варикозы в ЛВ обнаруживаются, начиная с 7-х сут постнатальной жизни (Рис.4.5.5). Интенсивность специфической флюоресценции катехоламинов значительно возрастает в период с 7 по 14 сут развития и

оказывается максимальной на 60 сут постнатальной жизни (Рис.4.5.6). Степень ветвления волокон, плотность сети волокон, а также количество варикоз в ЛВ также возрастает в период с 7 по 14 сут постнатальной жизни. Таким образом, симпатическая иннервация ЛВ крыс формируется постнатально в период, соответствующий второй неделе постнатального развития.

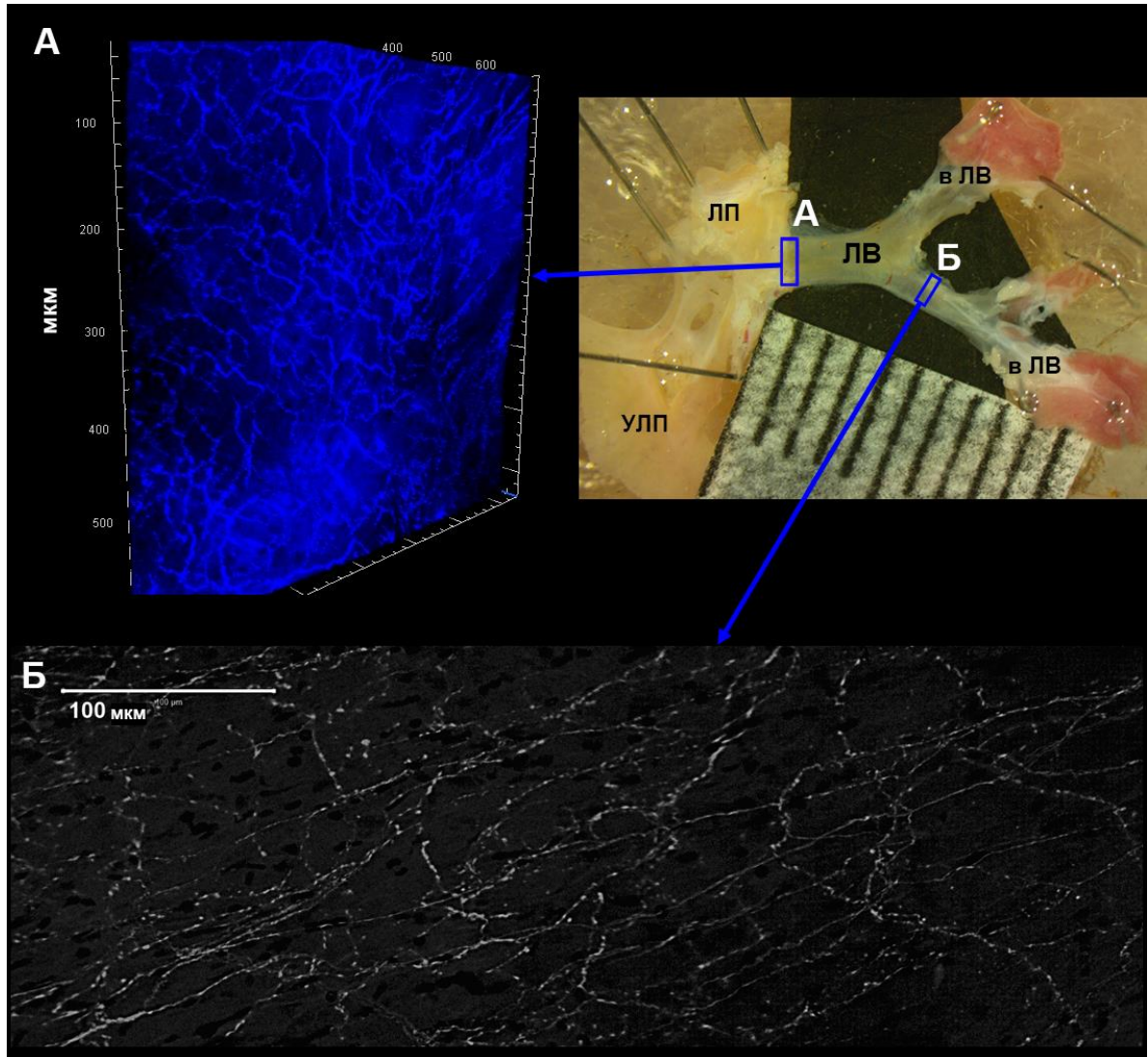


Рис. 4.5.3. Катехоламин-содержащие (симпатические) волокна в легочных венах крысы. **А.** Сеть катехоламин-содержащих волокон (показана синим псевдоцветом, 405/480-нм, совмещенное стековое псевдо-3D изображение) в стенке области устья легочной вены взрослой крысы. **Б.** Сеть катехоламин-содержащих волокон в дистальном (постбифуркационном) участке стенки легочной вены взрослой крысы. Стековая z-проекция (16 стеков, толщина стека - 1,2 мкм, 405/480- нм), полученная с помощью алгоритма деконволюции и совмещения пикселей максимальной яркости.

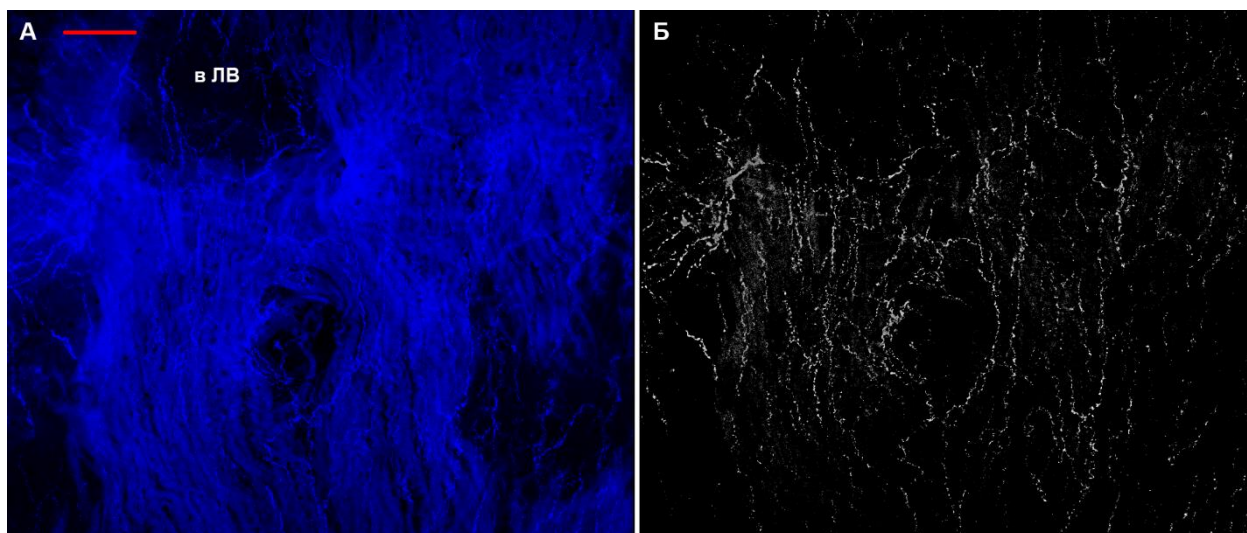


Рис. 4.5.4. Катехоламин-содержащие (симпатические) волокна в области бифуркации легочной вены взрослой крысы. **А.** Изображение эндокардиальной поверхности ЛВ (автофлюоресценция миокардиальных клеток и флюоресценция катехолимин-содержащих волокон). **Б.** Сеть катехоламин-содержащих волокон. Стековая z-проекция, полученная с помощью алгоритма деконволюции и совмещения пикселей максимальной яркости. в ЛВ – устье ветви легочной вены. Шкала масштаба – 50 мкм.

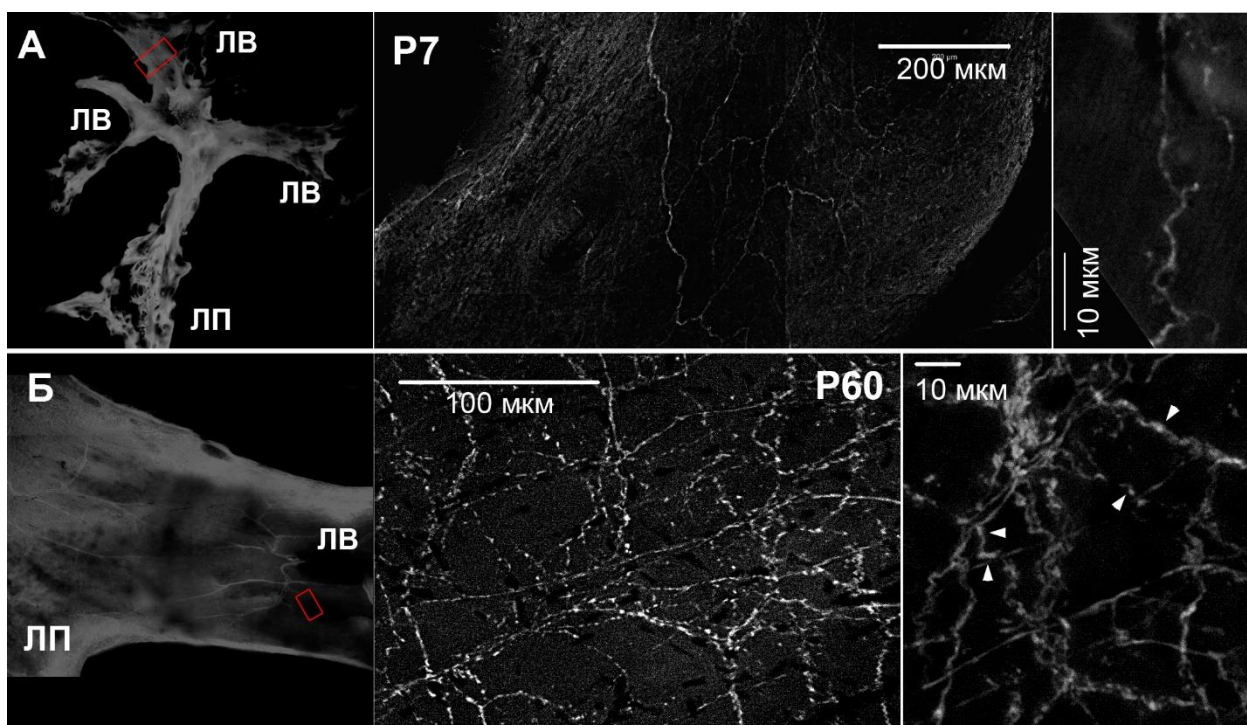


Рис. 4.5.5. Катехоламин-содержащие (симпатические) волокна в стенке легочных вен крысы возрастом 7 (P7, **А**) и 60 (P60, **Б**) сут. На **А** и **Б**: в *слева* показан общий вид препаратов; в *центре* показана сеть волокон в участках, ограниченных красным прямоугольником на панелях слева. *Справа* показаны участки ЛВ при большом увеличении. Стрелками показаны расширения волокон («варикозы») типичные для норадреналин-продуцирующих постганглионарных интрамуральных нервов. Стековая z-проекция (16 стеков, толщина стека - 1,2 мкм, 405/480- нм), полученная с помощью алгоритма деконволюции и совмещения пикселей максимальной яркости.

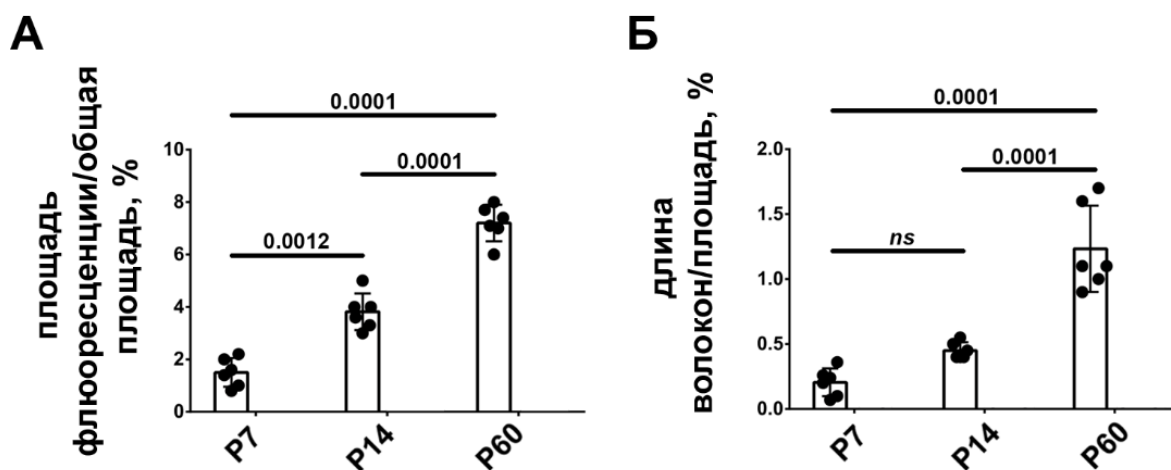


Рис. 4.5.6. Рост количества катехоламин-содержащих волокон в стенке легочных вен крысы в ходе постнатального развития. **А.** Площадь флюоресценции аддуктов катехоламинов с глиоксиловой кислотой в поперечных срезах стенки легочных вен крыс возрастом 7, 14 и 60 сут (P7, P14, P60). Площадь флюоресценции нормализована на общую проанализированную площадь срезов. **Б.** Суммарная длина катехоламин-содержащих волокон в поперечных срезах стенки легочных вен крыс возрастом 7, 14 и 60 сут. Длина нормализована на проанализированную площадь срезов. Значения *p* (однофакторная ANOVA с множественными апостериорными сравнениями) указаны на графиках.

4.5.2. Симпатическая иннервация миокардиальной ткани легочных вен мышей

Известно, что линии мышей существенно различаются в аспекте вегетативной регуляции работы сердечно-сосудистой системы. Особенности симпатической иннервации в предсердном миокарде и миокарде легочных вен исследованы у трех линий мышей: BALB/C, C57Bl/С и СВА. У всех трех линий мышей в предсердном миокарде, а также в различных участках стенки легочных вен обнаружена обширная сеть катехоламин-содержащих волокон, что подтверждает богатую симпатическую иннервацию данных отделов миокарда. Катехоламин-содержащие волокна располагаются в стенке ЛВ снаружи от слоя миокардиальной ткани. Неиннервированных участков миокарда у мышей не обнаружено. У всех линий в ЛВ присутствуют плотные цепочки, катехоламин-содержащих варикоз, что служит признаком интенсивного накопления и высвобождения норадреналина в ткани ЛВ (Рис.4.5.7).

По крайней мере у отдельных линий мышей, плотность сети катехоламин-содержащих волокон различается в отделах суправентрикулярного миокарда. У мышей линии BALB/C площадь «катехоламинвой» флюоресценции, а также протяженность катехоламин-содержащих волокон в устьях и дистальных сегментах ЛВ была существенно выше, чем в ушке и вестибуле левого предсердия (Рис. 4.5.8, Рис. 4.5.9). Однако различий в интенсивности иннервации (различий в суммарной протяженности волокон) между устьями и дистальными участками ЛВ у данной линии мышей обнаружено не было.

Интенсивность иннервации статистически не различалась также, при сравнении между легочными венами отдельных легочных долей. Кроме того, локальная плотность сети волокон у мышей BALB/C в непосредственной окрестности (100 мкм) устьев ветвей ЛВ слабо отличается от плотности сети волокон стенки основного ствола легочных вен (Рис. 4.7.10).

У мышей линий C57Bl/6 и СВА (Рис. 4.7.9) различий в количестве катехоламин-позитивных волокон между предсердным миокардом и стенкой легочных вен обнаружено не было.

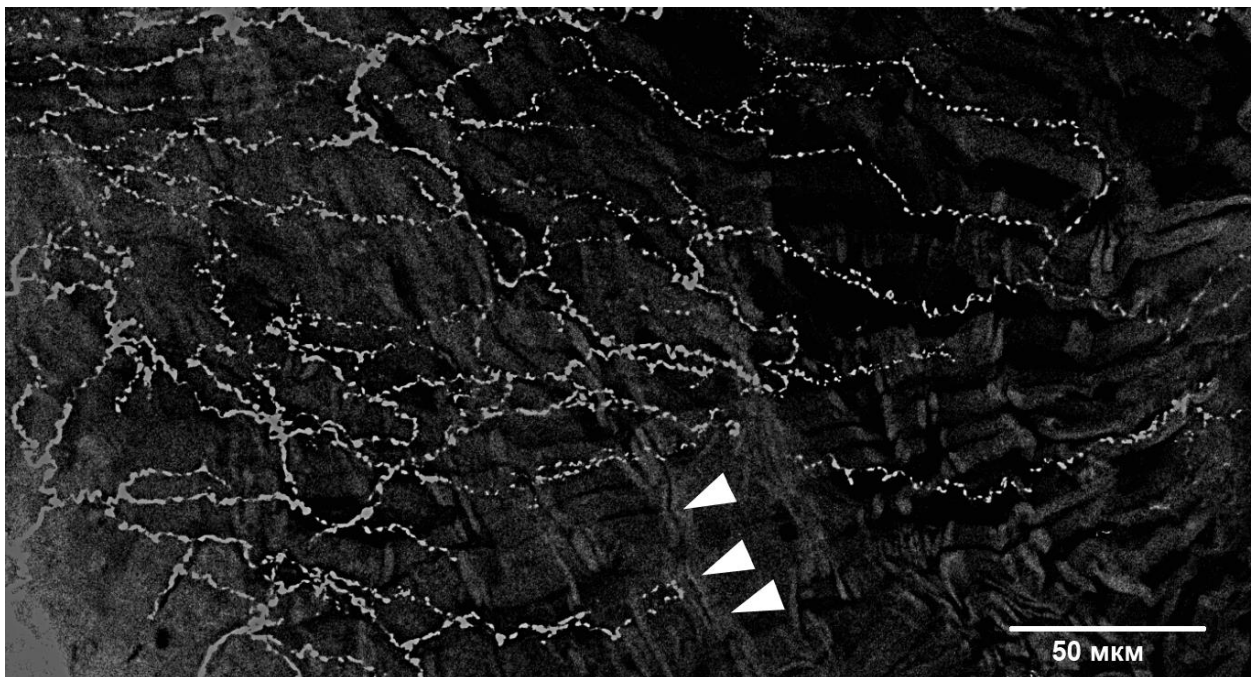


Рис. 4.5.7. Катехоламин-содержащие (симпатические) волокна и цепочки катехоламин-содержащих «варикоз» в стенке легочной вены мыши линии BALB/C. Стековая z-проекция (16 стеков, толщина стека - 1,2 мкм, 405/480- нм), полученная с помощью алгоритма деконволюции и совмещения пикселей максимальной яркости. Фоновая автофлюоресценция не подавлена для визуализации структуры ткани. Стрелками показаны структуры, соответствующие локализации интеркалярных дисков между кардиомиоцитами.

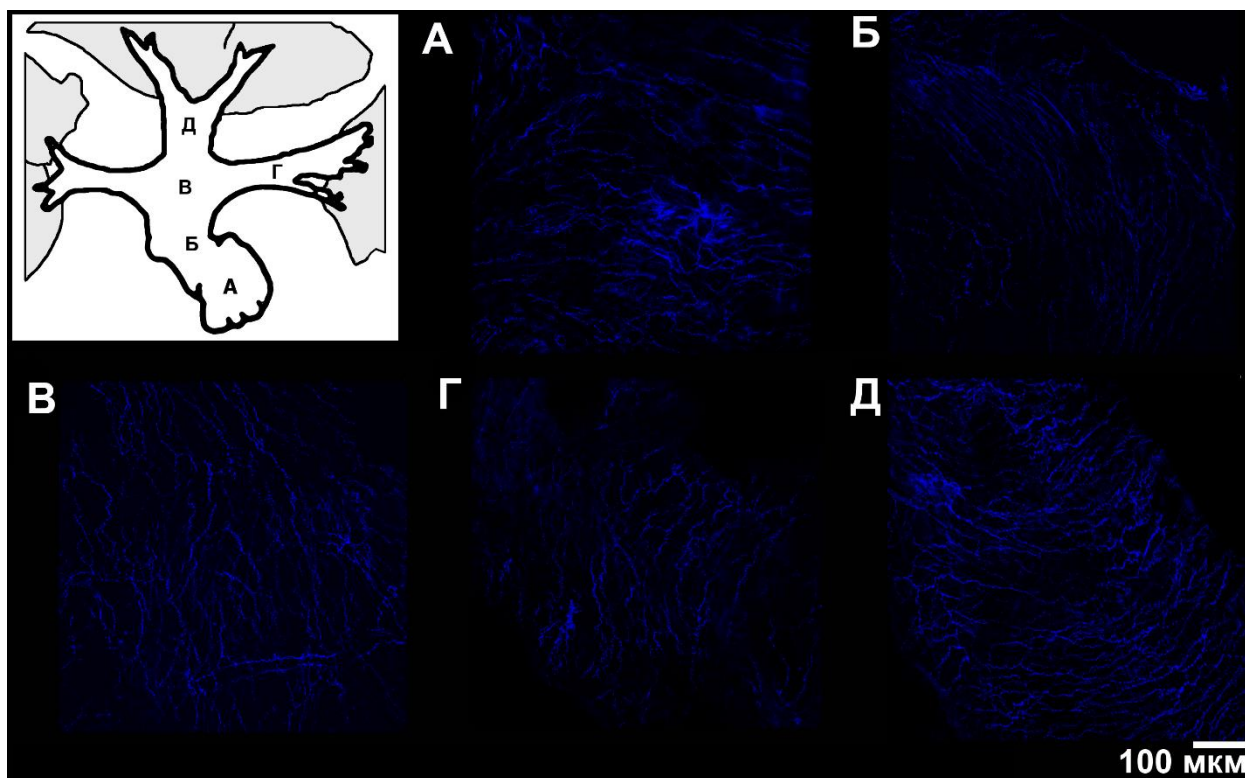


Рис. 4.5.8. Репрезентативные конфокальные изображения сети катехоламин-содержащих (симпатических) волокон (синий псевдоцвет) в стенке левого предсердия и легочных вен мыши линии BALB/C. На вставке слева сверху приведена схема, указывающая локализацию участков ткани, в которых выявляли катехоламин-содержащие волокна (А-Д). А – трабекуляризованное ушко левого предсердия, Б – гладкая стенка («крыша») левого предсердия, В – вестибуль левого предсердия и устья легочных вен, Г, Д – легочные вены левой и добавочной легочных долей. А - Д - стековые z-проекции, полученные с помощью алгоритма совмещения пикселей максимальной яркости.

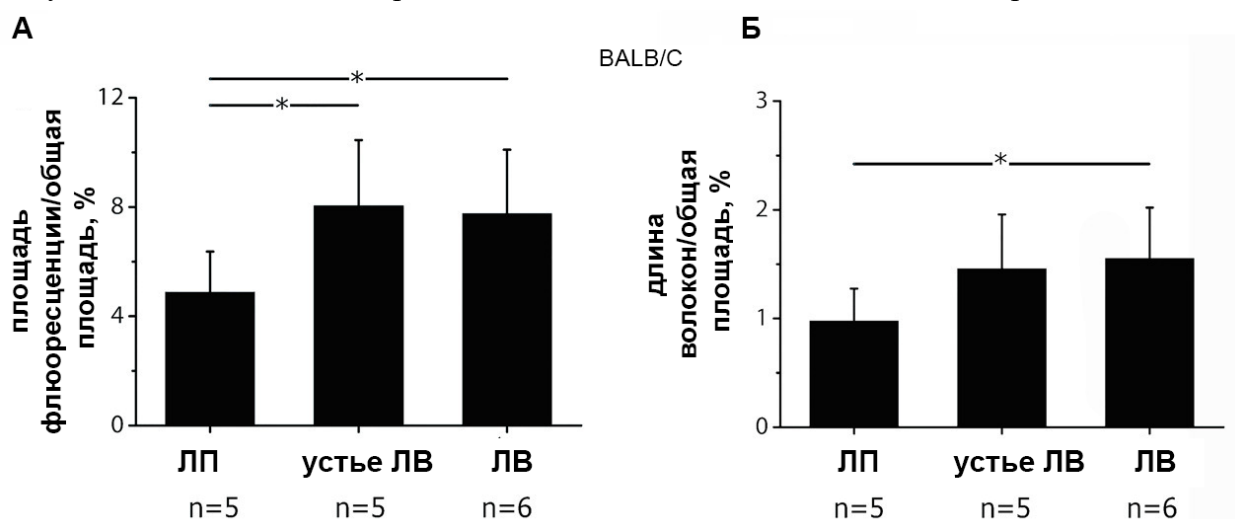


Рис. 4.5.9. А. Площадь флюоресценции аддуктов катехоламинов с глиоксильной кислотой в поперечных срезах стенки левого предсердия и легочных вен мышей линии BALB/C. Площадь флюоресценции нормализована на общую проанализированную площадь срезов. Б. Суммарная длина катехоламин-содержащих волокон в поперечных срезах стенки левого предсердия и легочных вен мышей. Длина нормализована на проанализированную площадь срезов. * - $p < 0,05$ (однофакторная ANOVA с множественными апостериорными сравнениями).

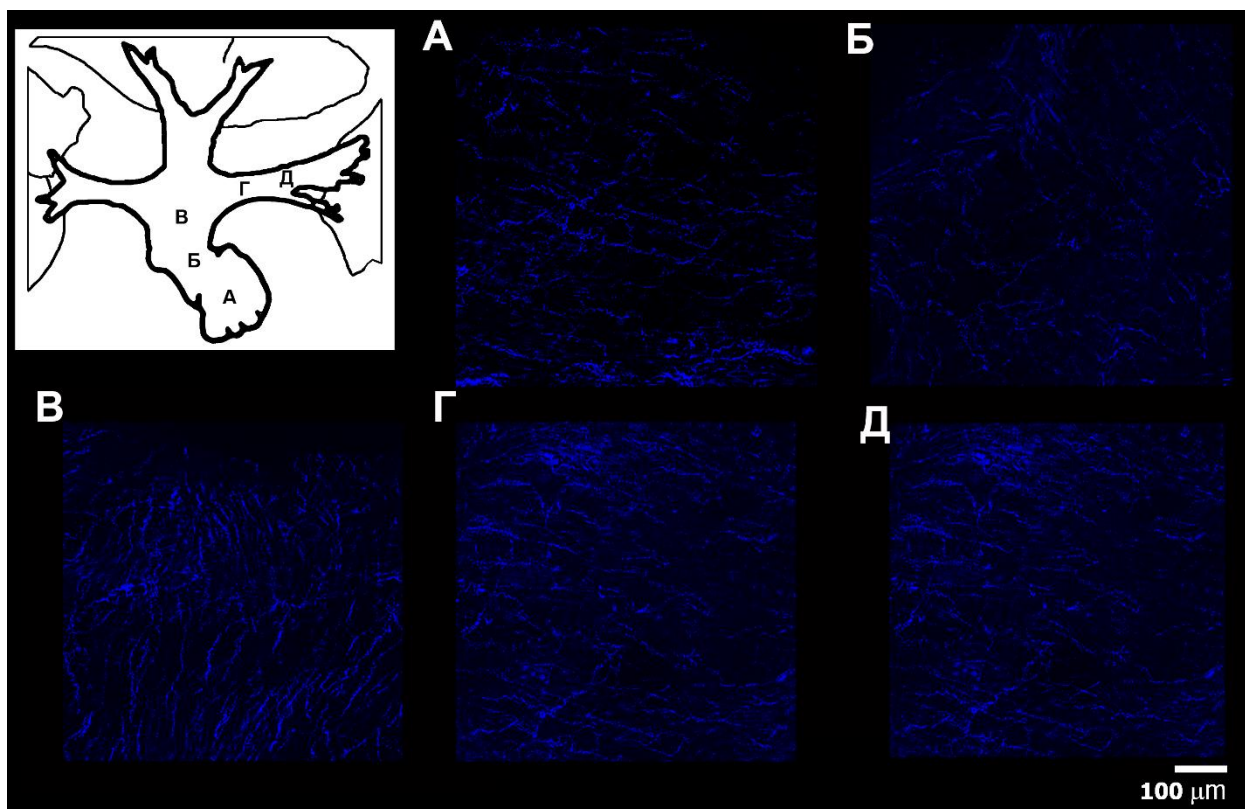


Рис. 4.5.10. Репрезентативные конфокальные изображения сети катехоламин-содержащих (симпатических) волокон (синий псевдоцвет) в стенке левого предсердия и легочных вен мыши линии C57Bl/6. На вставке слева сверху приведена схема, указывающая локализацию участков ткани, в которых выявляли катехоламин-содержащие волокна (А-Д). А – трабекуляризованное ушко левого предсердия, Б – гладкая стенка («крыша») левого предсердия, В – вестибуль левого предсердия и устья легочных вен, Г, Д – легочные вены левой и добавочной легочных долей. А - Д - стековые z-проекции, полученные с помощью алгоритма совмещения пикселей максимальной яркости.

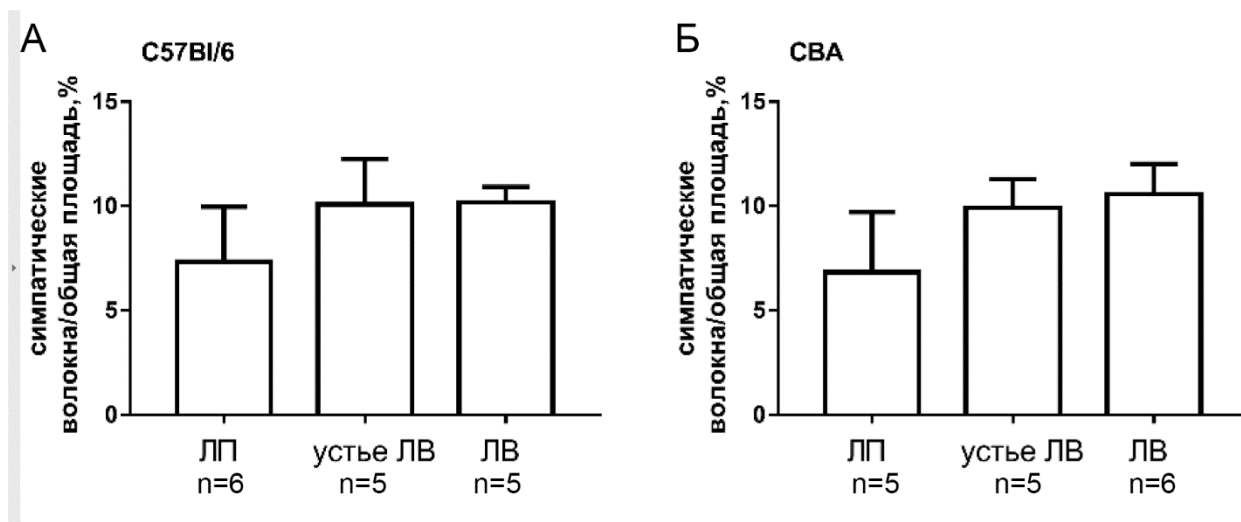


Рис. 4.5.11. Площадь флюоресценции аддуктов катехоламинов с глиоксиловой кислотой в поперечных срезах стенки левого предсердия и легочных вен мышей линий C57Bl/6 (А) и CBA (Б). Площадь флюоресценции нормализована на общую проанализированную площадь срезов.

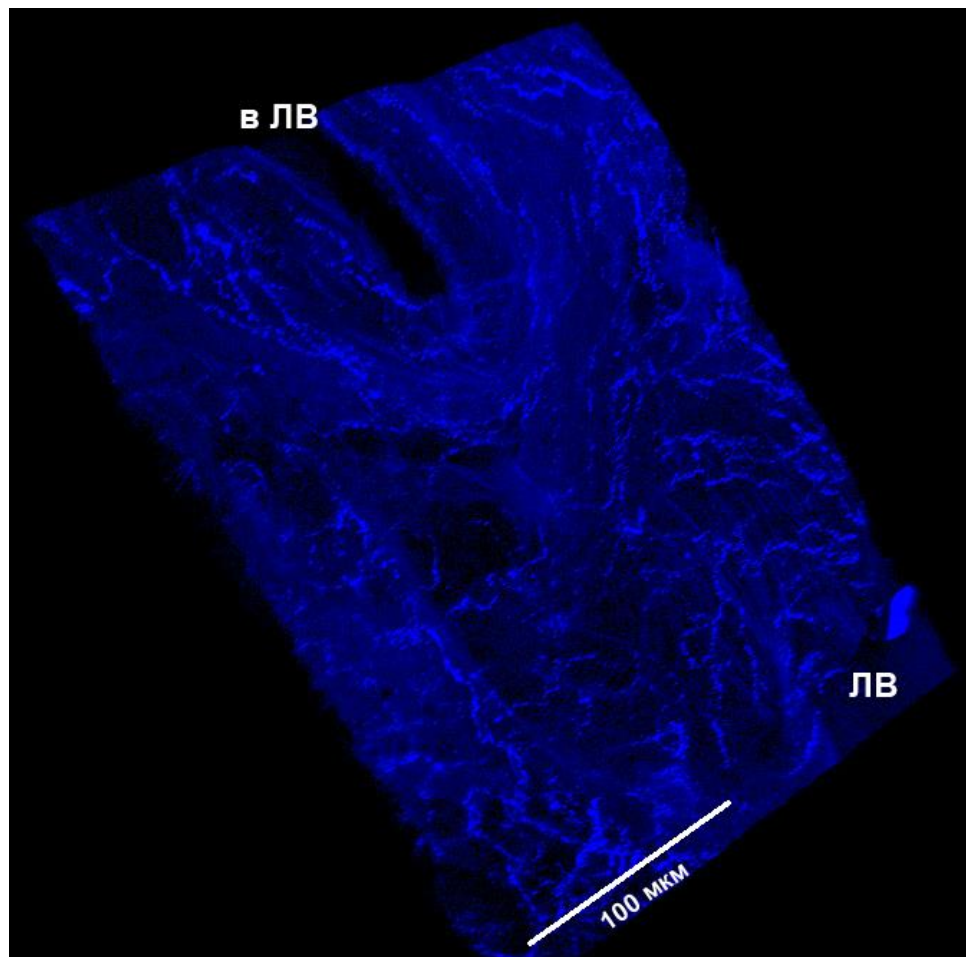


Рис. 4.5.12. Сеть катехоламин-содержащих волокон (показана синим псевдоцветом, 405/480- нм, совмещенное стековое псевдо-3D изображение) в стенке легочной вены мыши линии BALB/C. ЛВ – легочная вена, в ЛВ – ветвь легочной вены.

4.6. 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. 4.6.1) 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.

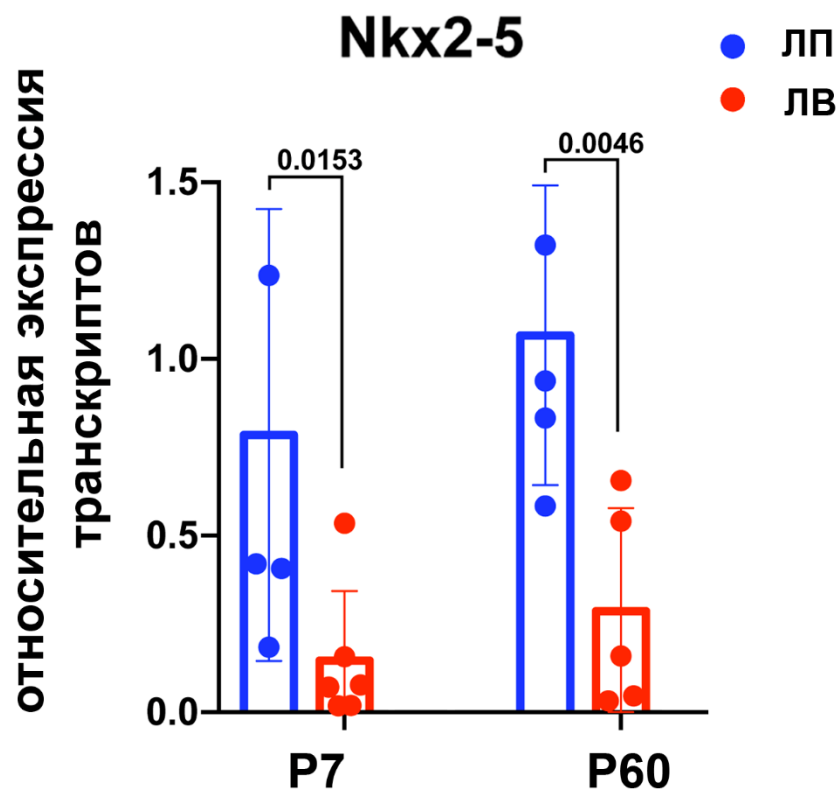


Рис. 4.6.1. Относительный уровень экспрессии транскрипционного фактора Nkx2-5 в предсердном миокарде и миокарде легочных вен крысы на 7 и 60 сут постнатальной жизни.

5. ОБСУЖДЕНИЕ

5.1. Возможность применения тканевых образцов легочных вен грызунов в качестве модельных объектов при исследовании механизмов предсердных аритмий

Выше указано, что среди млекопитающих макроскопическая или тканевая организация миокарда легочных вен в зрелом организме существенно варьирует. Так у грызунов миокард ЛВ в постнатальный период и в зрелом организме крайне развит, охватывает не только проксимальные участки вен, но и сегменты сосудов, залегающие внутри долей легких. Миокард легочных вен у грызунов равномерно и полностью охватывает все участки сосудов, кардиомиоциты в миокардиальном рукаве имеют хорошо развитые адгезивные и электрические контакты. У человека миокардиальная ткань охватывает сосуды только в проксимальных участках вен, но при этом имеет многослойную, крайне вариабельную, гетерогенную организацию. В легочных венах человека имеются множественные разрывы миокардиальных тяжей, вкрапления соединительной и адипозной ткани. Поэтому, миокардиальная обкладка легочных вен у человека имеет крайне неравномерное собственное кровоснабжение и вегетативную иннервацию. Миокардиальные волокна имеют разное направление в тканевых слоях, слои могут быть локально и слабо связаны, либо изолированы друг от друга. Дистальная граница миокардиального рукава у человека образована множеством мелких миокардиальных тяжей, постепенно «растворяющихся» в фиброзной ткани. В клинических работах предполагается, что именно «ячеистость» миокардиального рукава и «пилообразная» структура его границы служит подходящим субстратом для замедления, альтернации и блоков проведения распространяющейся волны возбуждения. Разрывы миокардиальной ткани в рукавах ЛВ могут служить местами возникновения блоков проведения. Предполагается, что именно особенности тканевой организации миокардиальных рукавов легочных вен человека способствуют образованию контуров циркулирующего возбуждения в пределах ЛВ или с захватом помимо легочных вен предсердной ткани.

До сих пор оставалось неизвестным, как тканевые особенности ЛВ у человека и лабораторных животных соотносятся в контексте их аритмогенности. В нашей работе установлено, что на уровне макроскопической морфологии миокардиальные рукава легочных вен у мышей, крыс и морских свинок сходны и демонстрируют типичное строение, характерное для грызунов: в области устьев легочных вен не наблюдается каких либо заметных разрывов, миокардиальная ткань из предсердий продолжается в стенку сосудов, миокардиальная ткань охватывает весь периметр сосудов и у всех трех видов животных залегает в среднем слое его стенки. У всех трех видов животных миокардиальные

рукава крайне протяженные, выходят за пределы перикардиальной полости, и достигают, по меньшей мере, ворот (хилума) долей легких. При этом ни в основном стволе легочных вен, ни в ветвях не обнаруживается разрывов или отдельных миокардиальных тяжей. Анатомическая картина у кролика значительно отличается от вышеописанной для мелких грызунов. Миокардиальная ткань у кроликов охватывает периметр устьев и небольшие по протяженности проксимальные участки легочных вен, но при этом не распространяется за пределы перикардиальной полости. Более подходящим термином для обозначения миокардиальной ткани ЛВ кроликов является «миокардиальные муфты». Следует отметить, что в проксимальных участках вен кроликов миокардиальная ткань, как и у мелких грызунов, не имеет разрывов или «вкраплений соединительной ткани. Тем не менее, дистальные участки муфт формируют в стенке вен отдельные миокардиальные тяжи: дистальная граница муфт изрезана и неоднородна. Таким образом, миокардиальные муфты у кролика имеют большее морфологическое сходство с миокардиальными рукавами вен человека.

Вышеуказанные наблюдения позволяют предположить, что кролик является более подходящим объектом для изучения аритмогенеза, связанного с активностью легочных вен. Тем не менее, наши функциональные эксперименты показали, что характер распространения возбуждения в коротких миокардиальных муфтах кролика не отличается от такового в прилегающих участках предсердий. После охвата возбуждением устьев и коротких миокардиальных муфт ЛВ возбуждение угасает. Ни в одном эксперименте у кроликов нам не удалось обнаружить циркуляции возбуждения, возвратного возбуждения предсердий в муфтах или нарушений проведения, которые могли бы способствовать возникновению re-entry. При анализе, хронотопографии возбуждения у кролика, по нашим представлениям, следует говорить о активации устьев легочных вен, а не миокардиальных рукавов. Таким образом, препараты стенки легочных вен кролика не пригодны для изучения тканевых механизмов аритмогенеза, либо в качестве модельного объекта для выявления эффектов антиаритмических соединений.

Следует отметить, что имеется достаточно большой массив публикаций и работ, описывающих электрофизиологические свойства кардиомиоцитов из легочных вен кролика, использующих кардиомиоциты ЛВ кролика в качестве объекта для выяснения механизмов аритмогенной эктопии. Как правило, в данных работах не приводится объяснения процедуры получения тканевых препаратов или изолированных кардиомиоцитов легочных вен. Возможно, что в большинстве таких работ, использованы препараты устьев вен либо даже антрума левого предсердия с тканевыми характеристиками, очень близкими к предсердному миокарду. С другой стороны, можно

предположить, что протяженность, развитость миокардиальных рукавов у кроликов является вариабельной и сильно различается от породы к породе. У всех животных разных линий (пород), поступавших в нашу лабораторию, миокардиальная ткань обнаруживалась только в устьях вен.

Несмотря на неразвитость миокардиальных рукавов у кроликов, с помощью микроэлектродной техники в этих участках миокарда были нами обнаружены особенности, типичные для легочных вен. Потенциал покоя в устьях и наиболее дистальных участках миокардиальных муфт у кролика деполяризован. Следует отметить, однако, что разница в ПП (в покоящихся тканевых препаратах) в ЛВ и предсердии невелика и составляет $6,5 \pm 2,4$ мВ. Важно также, что непосредственно после прекращения электрической стимуляции в муфтах ЛВ кролика наблюдается кратковременная гиперполяризация – феномен, типичный для предсердного миокарда, который обусловлен избыточной активностью Na/K-АТФазы.

Следует отметить, что ПД с наибольшей длительностью в суправентрикулярном миокарде кролика наблюдали именно в устьях ЛВ. Эти данные позволяют предложить гипотезу о функционировании миокарда устьев ЛВ как электрофизиологического «одностороннего» фильтра, предотвращающего возвратное возбуждение предсердий в результате эктопической активации или циркуляции возбуждения в дистальном миокарде муфт ЛВ. Кольцевая ткань в устьях обладающая большой длительностью ПД и, соответственно, большой длительностью рефрактерности, оказывается невозбудимой для возвратной волны активации, исходящей из кардиомиоцитов дистальной границы муфт. Функционирование в качестве одностороннего фильтра хорошо известно для волокон Пуркинье, демонстрирующих наибольшую длительность ПД в желудочковом миокарде.

Возможно, что изолированные кардиомиоциты ЛВ кролика, тем не менее, действительно способны генерировать спонтанные ПД, триггерную активность и аномальную автоматию, как это показано в ряде работ. Тем не менее, миокардиальная ткань муфт легочных вен кролика, вероятно, не может служить источником проаритмической активности *in vivo*, а также *ex vivo*. В итоге, муфты ЛВ кролика, согласно нашим наблюдениям, не могут являться приемлемым модельным экспериментальным объектом для изучения аритмогенеза.

Возможно, что наиболее приемлемым объектом для экспериментального исследования аритмогенеза легочных вен, особенно тканевых его аспектов, среди мелких лабораторных животных, являются крысы и мыши. Как показано далее, несмотря на морфологическую однородность, для легочных вен крыс и мышей характерны функциональные свойства, приводящие к проаритмическому типу проведения возбуждения.

5.2. Механизмы, обуславливающие спонтанную деполяризацию потенциала покоя в миокардиальной ткани легочных вен

Итак, нами показано, что в миокардиальной ткани покоящихся (то есть не подверженных ритмической электрической стимуляции) изолированных многоклеточных препаратов легочных вен мыши, крысы, морской свинки наблюдается спонтанная деполяризация - сдвиг мембранного потенциала (потенциала покоя) от уровня, характерного для рабочего миокарда (-80-82 мВ), до -68-65 мВ, то есть до уровня, свойственного пейсмекерному миокарду. В миокардиальной ткани легочных вен кролика данный эффект выражен в наименьшей степени по сравнению с другими видами млекопитающих животных. Спонтанная деполяризация отсутствует в ритмически возбуждаемых и генерирующих регулярные потенциалы действия препаратах ЛВ, а также в рабочем предсердном миокарде. Спонтанная деполяризация в легочных венах сопровождается единичными спонтанными потенциалами действия, возникающими автоматически, без дополнительной стимуляции. Важно отметить, что в предсердном миокарде прекращение стимуляции приводит к кратковременной гиперполяризации. Таким образом, изменения мембранного потенциала покоя в ЛВ и предсердиях при изменении режима возбуждения меняется разнонаправлено.

Известно, что кратковременная гиперполяризация ПП, возникающая при прекращении ритмической генерации ПД («начальная гиперполяризация покоя»), обусловлена избыточной активностью Na/K-АТФазы в условиях прекращения поступления ионов натрия в клетку. В том случае, когда ткань ритмически активна в фазу деполяризации ПД в клетку поступают ионы натрия. Повышение внутриклеточной концентрации ионов натрия стимулирует работу Na/K-АТФазы, генерирующей гиперполяризующий ионный ток. После прекращения генерации ПД некоторое время Na/K-АТФаза откачивает избыточное количество ионов натрия, что приводит к гиперполяризации мембранного потенциала. Гиперполяризующий ионный ток Na/K-АТФазы ($I_{Na/K}$) является важным элементом т.н. механизма «иерархии автоматии» (или «*overdrive suppression*»). Благодаря этому механизму активность латентных пейсмекеров на периферии САУ подавлена вследствие их гиперполяризации. Через некоторое время после прекращения генерации ПД гиперполяризация ПП сменяется его деполяризацией, так как $[Na^+]_i$ снижается ниже «установочного значения» и активация Na/K-АТФазы прекращается. Прекращение гиперполяризующего действия $I_{Na/K}$ позволяет возникнуть спонтанным ПД в латентных пейсмекерах через интервал времени, который в *in vivo* экспериментах принято называть «предавтоматической паузой».

Отсутствие начальной гиперполяризации покоя, таким образом, является общим свойством миокарда легочных вен млекопитающих животных. Эта особенность может быть связана с низкой экспрессией Na/K-АТФазы. Данное предположение подтверждают два наблюдения, первое из которых основано на результатах экспериментов с частичной заменой ионов натрия на ионы лития. Ионы лития ингибируют Na/K-АТФазу. Добавление ионов лития в перфузионный раствор вызывает гораздо большую деполяризацию в легочных венах, чем в предсердном миокарде. Далее, в нашей лаборатории была проведена оценка методом РВ-ПЦР экспрессии гена *Atp1a1*, кодирующего основную α -1 субъединицу Na/K-АТФазы в миокардиальной ткани легочных, полых вен и предсердном миокарде. Оказалось, что количество транскриптов гена *Atp1a1* в легочных венах действительно снижено (Рис. 5.1). Количество транскриптов *Atp1a1* также снижено и в полых венах, для которых также характерна спонтанная деполяризация ПП. Следует отметить, что уровень экспрессии транскриптов гена *Slc8a1*, кодирующего одну из изоформ натрий-кальциевого обменника, является одинаковым в легочных венах и предсердиях. Таким образом, спонтанную деполяризацию ПП в ЛВ нельзя объяснить усилением деполяризующей компоненты тока (I_{NCX}) натрий-кальциевого обменника, по крайней мере из-за усиления экспрессии этого белка.

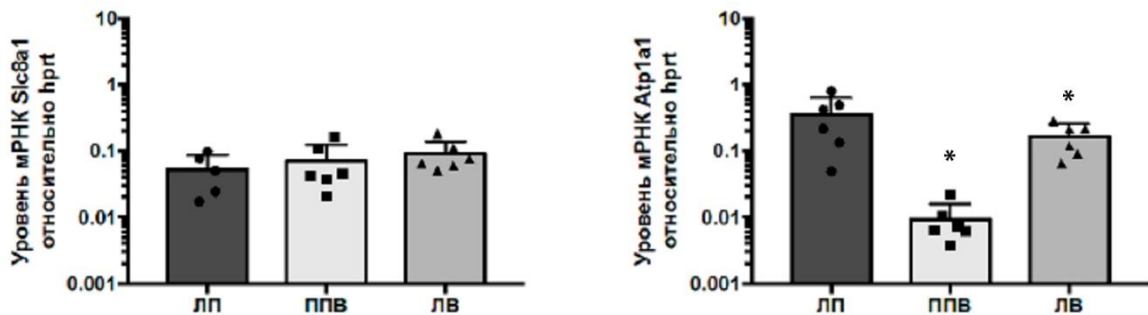


Рис.5.1. Уровень экспрессии гена *Slc8a1* (слева), кодирующего основную субъединицу Na/Ca-обменника и гена *Atp1a1*, кодирующего α -1 субъединицу Na/K-АТФазы относительно экспрессии мРНК гена «домашнего хозяйства» (*hprt*) в миокарде левого предсердия (ЛП), миокардиальной ткани полых вен (ПВ) и легочной вены (ЛВ). * $-p < 0,05$ (однофакторный анализ ANOVA с поправкой Даннета на множественные сравнения).

Сниженный уровень экспрессии Na/K-АТФазы может не только лежать в основе деполяризованного ПП в легочных венах, но являться одним из механизмов, который позволяет миокардиальной ткани ЛВ «избегать» подавления автоматии. При низком уровне

$I_{Na/K}$ ионный механизм «иерархии автоматии» не может работать полностью и любое прекращение ритмической активации будет приводить к немедленному запуску эктопической автоматии. Сбой ритмической активации в легочных венах может происходить в результате блокирования проведения волны возбуждения со стороны синоатриального узла. Поэтому, тканевые характеристики, в конечном итоге, будут определять возможность инициации ФП в миокарде легочных вен.

Очевидно, что сниженная экспрессия *Atplal1* и, соответственно, низкий уровень тока $I_{Na/K}$ не могут являться единственной причиной спонтанной деполяризации и нестабильного потенциала покоя в легочных венах. В нескольких наших работах показано, что в миокарде торакальных вен снижен уровень экспрессии каналов Kir2.x [Ivanova et al., 2021]. Эти каналы проводят калиевый ионный ток «аномального выпрямления» - IK1 (IKir). Ионный ток IK1 является реполяризирующим, протекает в последнюю фазу реполяризации ПД и в периоды между потенциалами действия (т.е. при значениях мембранного потенциала близких к потенциалу покоя). Ток IK1 у всех млекопитающих является основным ионным током определяющим стабильный и негативный (около -80 мВ) потенциал покоя. Ионный ток IK1 и каналы Kir2.x отсутствуют в центральной части САУ, что делает возможным медленную диастолическую деполяризацию и спонтанную генерацию ПД. Известно, что в периферической части САУ экспрессируется небольшое количество каналов Kir2.x. Сниженная экспрессия IK1/Kir2.x в кардиомиоцитах легочных вен облегчает сдвиг (деполяризацию) ПП, вызванный, например, изменением интенсивности работы Na/K-АТФазы. Низкий уровень ионного тока IK1, видимо является одной из причин эктопической автоматии в легочных венах. Известно, что экспрессия генов *Kcnj2*, *Kcnj4* и особенно *Kcnj12*, кодирующих каналы тока IK1 находится под контролем транскрипционных активирующих факторов Nkx2-5/TBX5/GATA4. В кардиомиоцитах САУ взрослых животных уровень Nkx2-5 крайне низок; трансактивирующее действие комплекса Nkx2-5/TBX5/GATA4 заблокировано заменой TBX5 на суппрессор транскрипции TBX3. В наших экспериментах показано, что как и в САУ, в миокарде легочных вен экспрессия Nkx2-5 снижена. В таких условиях, низкая плотность ионного тока IK1 представляется закономерной.

К настоящему времени предложены еще несколько ионных механизмов, которые могут лежать в основе спонтанной деполяризации ППП в легочных венах. В ряде работ показано, что натриевые потенциал-чувствительные каналы Nav1.5, формирующие основной деполярирующий ток I_{Na} в легочных венах, по крайней мере у крыс, обладают проводимостью покоя. Известно, что в сердце ток I_{Na} имеет небольшую неинактивируемую составляющую – это так называемый «хвостовой» или поздний натриевый ток ($I_{Na,late}$).

Считается, что при некоторых патологиях ССС (ишемической болезни сердца) в результате ремоделирования кардиомиоцитов этот хвостовой компонент ток может усиливаться и приводить к возникновению постдеполяризаций задержанного типа. Постдеполяризации, обусловленные $I_{Na,late}$ являются триггерными событиями и приводят к возникновению тахикардий. В настоящее время разработано несколько фармакологических препаратов, например ранолазин, действие которого связано с подавлением именно поздней компоненты I_{Na} . Предполагается, что $I_{Na,late}$ в миокарде легочных вен гораздо больше, чем в предсердном миокарде, и что именно благодаря этому ионному току ПП положительнее, чем в предсердиях [Malecot et al., 2015]. Причины увеличения $I_{Na,late}$ в легочных венах остаются неустановленными. В одной из наших работ показано, что соединения, влияющие на натриевые потенциал-чувствительные каналы могут модулировать автоматию легочных вен [Bogus et al., 2017].

Еще один механизм спонтанной деполяризации ПП легочных вен может быть связан в данной ткани с экспрессией специфических хлорных каналов, активируемых гиперполяризацией и/или внутриклеточным кальцием. Равновесный потенциал по хлору (E_{Cl}) варьирует в значительной степени в разных тканях. В рабочем миокарде взрослых животных E_{Cl} положительнее калиевого равновесного потенциала и потенциала покоя. Согласно общепринятым представлениям E_{Cl} в миокарде составляет порядка -70 мВ. Таким образом, хлорный ионный I_{Cl} ток в кардиомиоцитах является деполяризующим. Предполагается, что «срабатывание» или базальная активность хлорных каналов в легочных венах, возможно, приводит к деполяризации ПП, которая оказывается особенно заметной в условиях дефицита «стабилизирующего» калиевого тока IK_1 . Ранее показано, что хлорные деполяризующие токи отчасти обуславливают автоматию волокон Пуркинье. Активация хлорных каналов может являться причиной задержанных постдеполяризаций и механизмом тахикардий в желудочковом миокарде.

Внутриклеточная концентрация ионов хлора, и соответственно величина и тип I_{Cl} определяется целым рядом факторов, однако, основным является баланс экспрессии в клетках двух типов хлорных транспортеров – $KCC2$ (К, Cl-переносчик) и $NKCC1$ (Na, К, Cl- переносчик). Первая из этих двух молекул выводит Cl^- , а вторая – транспортирует ионы хлора в цитоплазму за счет градиента по ионам Na. В том случае, когда преобладает экспрессия $KCC2$, внутриклеточная концентрация Cl^- оказывается низкой, E_{Cl} в кардиомиоцитах приближается к величине ПП и, несмотря на наличие в мембране хлорных каналов, возникновение заметного хлорного деполяризующего тока невозможно. В противном случае, когда преобладает экспрессия $NKCC1$, внутриклеточная концентрация

Cl^- оказывается высокой, а E_{Cl} – значительно более положительным, чем потенциал покоя. В таких случаях, I_{Cl} может вызывать деполяризацию ПП и индуцировать спонтанные ПД.

Известно, что существенная экспрессия НКСС1 и высокая концентрация $[Cl^-]_i$, в первом приближении, характерна для эмбриональных тканей, недифференцированных клеток. В данной работе не проводили напрямую оценки экспрессии уровня переносчиков ионов хлора в миокардиальной ткани ЛВ. Однако, исходя из функциональных экспериментов с агонистами α -адренорецепторов и блокаторами хлорной проводимости, как будет показано далее, можно предположить, что НКСС1, $[Cl^-]_i$ и E_{Cl} действительно повышены в легочных венах по сравнению с рабочим миокардом предсердий.

Наконец, еще одной причиной нестабильного ПП и автоматии легочных вен может быть экспрессия ионных каналов, управляемых циклическими нуклеотидами и активируемых гиперполяризацией – HCN. Известно, что каналы HCN4 преимущественно формируют т.н. «пейсмекерный» ионный деполяризующий ток I_f в кардиомиоцитах САУ и, в значительной степени, определяют его способность к пейсмекерной активности. В данной работе показано, что миокардиальная ткань легочных вен не чувствительна к блокаторам тока I_f . Тем не менее, в экспериментальных исследованиях, проведенных в нашей лаборатории показано, что в миокардиальной ткани полых вен, как и в легочных венах потенциал покоя деполяризован и не является стабильным [Kuzmin et al., 2021; Ivanova et al., Ivanova et al., 2021; Иванова и др., 2017]. В кардиомиоцитах полых вен обнаружен высокий уровень экспрессии HCN4. Таким образом, имеющиеся данные все же указывают на возможное участие тока I_f в формировании автоматии легочных вен.

Исходя из результатов данной работы, а также литературных данных можно предположить, что целый ряд ионных механизмов лежит в основе таких электрофизиологических особенностей миокарда легочных вен как спонтанная деполяризация потенциала покоя, предрасположенность к автоматии. К указанным ионным механизмам следует отнести: (1) сниженный уровень экспрессии и/или сниженная активность Na/K-АТФазы; (2) сниженный уровень экспрессии ионных каналов Kir2.x. ионного тока I_{K14} ; (3) значительный неактивируемый, «хвостовой» компонент ($I_{Na,late}$) натриевого тока I_{Na} ; (4) экспрессия специфических, активируемых гиперполяризацией хлорных ионных каналов и повышенная экспрессия переносчика ионов хлора НКСС1 и (5) потенциально повышенная экспрессия ионных каналов HCN4 «пейсмекерного» ионного тока I_f . Наиболее вероятно, что все вышеперечисленные механизмы определяют особенности электрофизиологии легочных вен – спонтанную деполяризацию ПП, нестабильный ПП и склонность к генерации спонтанных ПД. Возможно, что в легочных

венах разных животных, а также человека, каждый из вышеперечисленных механизмов вносит различный вклад в формирование проаритмического фенотипа ткани.

Как показали наши исследования, миокард легочных вен является крайне гетерогенной структурой с электрофизиологической точки зрения. Возможно, что некоторый из вышеперечисленных механизмов преобладает только в определенном (устье, стволе, ветвях или внутрилегочных сегментах) участке миокардиальных рукавов легочных вен, усиливая гетерогенность ткани. В наших экспериментах с тканевыми препаратами легочных вен мышей четко показано, что очаги (фокусы) эктопической активности, индуцированные адренергической стимуляцией, локализуются в определенных участках миокарда. Более того, избирательная стимуляция β - и α_1 -адренорецепторов приводила к индукции спонтанных ПД в разных участках легочных вен. Хорошо известно, что β - и α_1 -адренорецепторы сопряжены с различными внутриклеточными сигнальными каскадами, которые имеют преимущественно различные конечные мишени в кардиомиоцитах [Каримова и др., 2017]. Результатом преобладания определенного «проаритмического» (из пяти вышеперечисленных) механизма может быть избирательная локализация очагов эктопической активности в легочных венах. В случае верности данной гипотезы, миокард легочных вен мышей и крыс представляют собой подходящий объект для моделирования и изучения эктопической активности разных типов, поскольку для каждого типа может быть использован «свой» сегмент миокардиального рукава.

5.3. Регуляция биоэлектрической активности миокардиальной ткани ЛВ нейромедиаторами вегетативной нервной системы

Аппликация ацетилхолина, либо стимуляция внутрисердечных нервов (холинергическая стимуляция), приводит к гиперполяризации ПП, увеличению скорости нарастания переднего фронта ПД, восстановлению возбудимости миокардиальной ткани легочных вен. Так как эти эффекты подавляются атропином, то, очевидно, реализуются посредством активации М-холинорецепторов, как и в предсердном миокарде. Аппликация АЦХ вызывает укорочение ПД в легочных венах, которое более выражено, чем в предсердном миокарде за счет исходно увеличенной длительности ПД. В целом, эффекты АЦ в легочных венах сходны с таковыми в предсердном миокарде, за исключением их величины. Поскольку ПП в покоящейся ткани ЛВ деполяризован, то гиперполяризующий эффект АЦХ здесь значительно больше такового, характерного для предсердий. В целом, холинергическая стимуляция вызывает как про-, так и антиаритмические эффекты. Снижая длительность ПД, ацетилхолин вызывает уменьшение периода рефрактерности и снижение длины волны возбуждения, что является проаритмическим фактором и облегчает

формирование контуров циркуляции волны возбуждения. С другой стороны, укорочение ПД сопровождается уменьшением тканевого разброса электрофизиологических параметров (длительности ПД), что может быть рассмотрено как антиаритмическое действие. Исходя из наших экспериментов можно заключить, что причины аритмогенеза, обусловленные повышением парасимпатического тонуса одинаковы для предсердной ткани и легочных вен. Вероятно, одного лишь повышения парасимпатического тонуса недостаточно для инициации ФП в легочных венах *in vivo*.

В отличие от холинергической стимуляции, при действии норадреналина наблюдаются сложные изменения биоэлектрической активности в легочных венах, которые к тому же являются видоспецифическими. Как нам удалось установить, миокардиальная ткань ЛВ кролика не чувствительна к фенилэфрину, видимо за счет крайне низкого количества α -адренорецепторов. У мышей в легочных венах как при активации как $\alpha 1$ -, так и при активации β -адренорецепторов наблюдаются сходные эффекты – гиперполяризация ПП и индукция автоматической активности. Согласно литературным данным, к таким же эффектам приводит активация $\alpha 1$ - и β -адренорецепторов в миокарде легочных вен морской свинки. У крыс в миокардиальной ткани норадреналин вызывает многофазные изменения ПП и индуцирует спонтанную активность различного типа. Такой эффект НА у крыс связан с тем, что активация $\alpha 1$ -адренорецепторов приводит к деполяризации ПП, снижению его стабильности, индукции диастолической деполяризации. Активация же β -адренорецепторов приводит к гиперполяризации ПП, но увеличивает частоту и продолжительность залпов спонтанных ПД, усиливает триггерную активность, видимо, за счет повышения уровня $[Ca^{2+}]_i$ и стимуляции спонтанных выбросов кальция из саркоплазматического ретикула [Каримова и др., 2016; 2017]. Комбинация $\alpha 1$ - и β -адренергической стимуляции приводит к наиболее выраженной манифестации проаритмической активности в легочных венах. Важно, что активация $\alpha 1$ -адренорецепторов вызывает увеличение длительности потенциалов действия. Как показано в наших экспериментах, длительность ПД в легочных венах различных долей легких, различных сегментах легочных вен, а также в устье вен значительно различается. То есть, для ЛВ характерна значительная «базальная» электрофизиологическая гетерогенность. Вышеуказанный эффект активации $\alpha 1$ -адренорецепторов приводит к росту электрофизиологической гетерогенности ткани и способствует возникновению блоков проведения возбуждения.

Оказывая гиперполяризующее действие, β -адренергическая стимуляция, как и холинергическая, может восстанавливать возбудимость ткани ЛВ и способствовать нормальному проведению возбуждения. В контексте возбудимости и проводимости, $\alpha 1$ - и

β -адренергическая компонента действуют антагонистически. Однако, повышение симпатического тонуса может восстанавливать нормальное проведение и возбудимость только в отдельных сегментах миокардиальных рукавов, что приводит к усилению электрической неоднородности ткани. Вышеописанные условия являются благоприятными для формирования контуров циркуляции возбуждения и, соответственно, способствуют возникновению фибрилляции предсердий. В данной работе, показано, что активация $\alpha 1$ -адренорецепторов, вероятно, является необходимым условием аритмогенеза в легочных венах: $\alpha 1$ -адренергическая компонента «подготавливает» субстрат, в котором эктопические, внеочередные ПД или триггерные события (постдеполяризации) индуцируют циркуляцию волны возбуждения.

5.4. Гипотеза о частичной «фетализации» миокарда легочных вен как причины их аритмогенности

В ходе исследований, проведенных в нашей лаборатории показано, что для легочных вен, по крайней мере у крыс, характерен крайне низкий уровень базальной автоматии, т.е. способности к генерации спонтанных ПД без адренергической или иной стимуляции на всех этапах онтогенеза [Потехина, 2020; Kuzmin et al., 2021], за исключением первых суток жизни. Автоматия «первых суток жизни», видимо, обусловлена краткосрочным резким перинатальным повышением уровня циркулирующих катехоламинов. Таким образом, за исключением первого дня жизни, базальная автоматия легочных вен является крайне низкой. В наших предыдущих работах также показано, что базальная автоматия снижается в миокардиальной ткани *полых* вен в ходе постнатального онтогенеза [Kuzmin et al., 2021]. Эти наблюдения позволяют предположить, что в ходе развития происходит изменение свойств миокарда *полых* вен таким образом, что ткань по электрофизиологическим характеристикам приближается к зрелому рабочему миокарду предсердий. Происходят ли такие же изменения в легочных венах? На основе результатов данной работы, а также результатов других наших работ можно предположить, что в легочных венах в ходе онтогенеза развивается обратный процесс: миокард легочных вен, имеющий исходно характеристики рабочего миокарда, приобретает некоторые свойства, характерные для незрелой ткани. Данную гипотезу подтверждают несколько аргументов: для легочных вен характерна (1) большая длительность ПД и рост этой длительности в ходе онтогенеза [Потехина, 2020]; (2) деполяризованный ПП и появление феномена «спонтанной деполяризации ПП» в ходе онтогенеза; (3) значительная деполяризация при действии агонистов $\alpha 1$ -адренорецепторов и появление этого деполяризующего эффекта в ходе онтогенеза [Потехина и др., 2019; Потехина, 2020; Kuzmin et al., 2021].

Известно, что для грызунов характерна относительно низкая длительность ПД, что является адаптацией к высокой ЧСС. Известно также, что в ходе постнатального развития ЧСС у грызунов увеличивается, а длительность ПД в предсердиях и желудочках снижается. Основной причиной онтогенетического «укорочения» ПД является почти полное прекращение экспрессии в миокарде предсердий и желудочков гена *Kcnh2*, кодирующего Kv11.1 каналы калиевого тока задержанного выпрямления IKr [Кузьмин и Розенштраух, 2010]. У взрослых грызунов, как, впрочем, и у всех позвоночных животных [Abramochkin et al., 2021], IKr сохраняется в пейсмекерных структурах (венозном синусе, САУ).

Ионный ток IKr являются мишенью целой группы антиаритмических соединений – антиаритмических препаратов (ААП) III класса. Различные соединения из этой группы в большей или меньшей степени селективно блокируют каналы Kv11.1 [Кузьмин и Розенштраух, 2010]. В наших работах показано, что ААП ниферидил («рефралон») с высокой избирательностью подавляет ионный ток IKr в предсердном миокарде морской свинки, что приводит к увеличению длительности ПД [Abramochkin et al., 2017]. Этот ААП в миокарде легочных вен взрослых крыс вызывал значительное удлинение ПД, что невозможно без экспрессии в данной ткани каналов Kv11.1 [Егоров и др., 2012].

Таким образом, на функциональном уровне показано, что в легочных венах взрослых животных имеется ионный ток, характерный для фетального и/или неонатального миокарда, и что данный ток, вероятно, является одной из причин увеличенной длительности ПД в данной ткани.

В экспериментах, проведенных в нашей лаборатории, показано, что неселективный блокатор хлорной проводимости (SITS) в покоящемся миокарде легочных вен вызывал сдвиг потенциала покоя в сторону отрицательных значений. При действии SITS происходила гиперполяризация мембранного потенциала (Рис.5.2). Однако, SITS не влиял на деполяризацию, вызванную фенилэфрином [Каримова и др., 2017]. Таким образом, в легочных венах, спонтанная деполяризация ПП, хотя бы отчасти, обусловлена выходящим хлорным деполяризующим током. Существование такого деполяризующего тока, независимо от типа ионных каналов его переносящих, возможно только при высокой $[Cl^-]_i$ и преимущественной экспрессии «фетальных» транспортеров (NKCC1) хлора в мембране кардиомиоцитов.

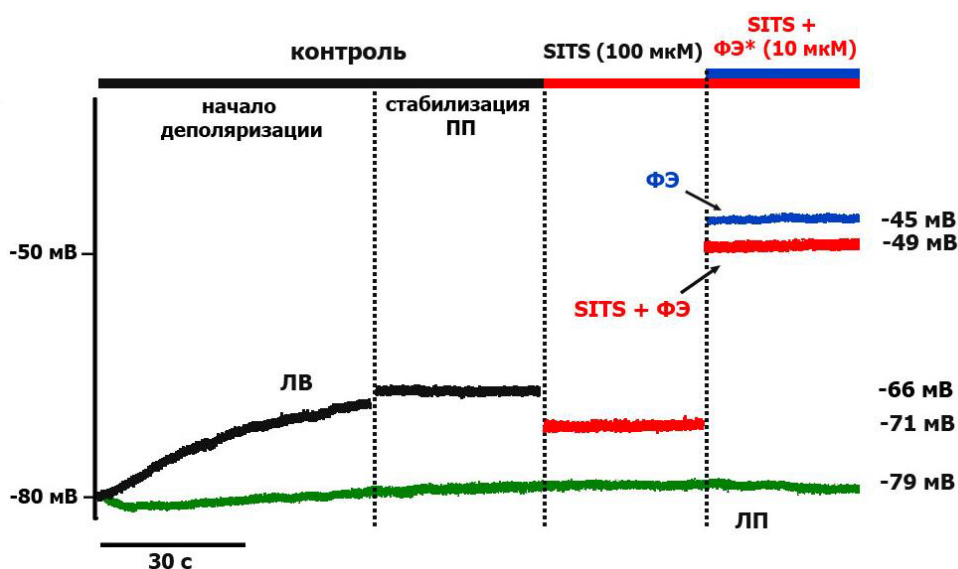


Рис.5.2. Пример записи ПП в миокарде легочных вен (черный) и левого предсердия (зеленый) в контроле, при действии неселективного блокатора хлорной проводимости SITS (красный цвет, 100 мкМ, n=4), а также при действии SITS на фоне фенилэфрина. *- уровни ПП на 10-й минуте действия фенилэфрина. ЛВ - легочные вены, ЛП - левое предсердие (приведено по: Потехина, 2020).

В данной работе показано, что активация $\alpha 1$ -адренорецепторов в покоящихся тканевых препаратах легочных вен взрослых животных (крыс) вызывает деполяризацию до -46 ± 8 мВ. Деполяризационный сдвиг при действии фенилэфрина в ЛВ крайне велик и достигает $17 \pm 3,5$ мВ. Помимо деполяризации ПП, фенилэфрин вызывал увеличение длительности электрически-вызванных ПД, подавлял проведение возбуждения в легочных венах. Деполяризация ПП, а также удлинение ПД, индуцируемое фенилэфрином, в рабочем миокарде правого или левого предсердия было незначительным [Ivanova et al., 2021]. Как указано выше, этот феномен развивается в постнатальном онтогенезе и характерен также и для миокардиальной ткани *полых* вен. Эффекты фенилэфрина обусловлены РКС-зависимым подавлением выходящей компоненты ионного тока I_{K1} , который имеет низкую плотность в миокарде полых вен. Известно, что ионный канал нативного тока I_{K1} может быть сформирован из субъединиц трех типов (Kir2.1, Kir2.2., Kir2.3), и может представлять собой гомо- либо гетеротетрамер. В ходе онтогенеза происходит изменение субъединичного состава каналов ионного тока I_{K1} , что приводит к изменению его вольт-амперных характеристик и кинетики. В зрелых кардиомиоцитах ионный ток I_{K1} сформирован субъединицами, обеспечивающими 3-фазу реполяризации ПД и быструю стабилизацию ПП. В кардиомиоцитах полых вен каналы тока I_{K1} сформированы Kir2.1 и Kir2.2 субъединицами, что характерно для фетального миокарда [Ivanova et al., 2021]. В предсердиях каналы тока I_{K1} сформированы преимущественно Kir2.2 субъединицами, что

характерно для зрелого миокарда. Возможно, что в легочных венах, как и в полых, имеет место фетальный/неонатальный паттерн экспрессии каналов Kir2.x., формирующих ток IK1.

Таким образом, результаты функциональных экспериментов подтверждают предположение о том, что на определенном этапе постнатального онтогенеза миокард легочных вен приобретает признаки фетальной/неонатальной ткани. Как показано в данной работе, легочные вены имеют богатую симпатическую иннервацию. Симпатическая иннервация ЛВ формируется к окончанию второй недели постнатальной жизни у крыс. Период созревания симпатической иннервации миокарда легочных вен совпадает с периодом появления электрофизиологических признаков фетальной/неонатальной ткани, а также с проявлением проаритмических свойств [Kuzmin et al, 2021]. В итоге, в данной и других наших работах установлено, что формирование симпатической иннервации является необходимым для преобразования электрофизиологического фенотипа легочных вен, появления признаков «незрелой» ткани и повышенной аритмогенности в ответ на адренергическую стимуляцию. Важно отметить, что по ряду функциональных признаков, миокард ЛВ сходен с «пейсмекерной» тканью САУ. Однако это сходство лишь частичное, оно не характерно для миокарда легочных вен изначально и, видимо, усиливается за счет изменения отдельных молекулярных мишеней при постнатальном формировании симпатической иннервации ЛВ. Важно отметить, что ключевые механизмы, которые лежат в основе проаритмического преобразования «электрофизиологического фенотипа» кардиомиоцитов легочных вен под влиянием симпатической иннервации, остаются неизвестными.

5.5. Нейромедиаторные факторы в индукции проаритмической активности в миокарде легочных вен

5.5.1. Влияние эндотелиальных факторов на биоэлектрические свойства миокардиальной ткани легочных вен

Как и любые другие сосуды млекопитающих, легочные вены выстланы эндотелием. С учетом того, что слой гладкомышечных клеток в легочных венах крайне незначителен, нами было сделано предположение, что регуляторные соединения эндотелия могут оказывать влияние на биоэлектрические свойства легочных вен. В частности, спонтанная деполяризация потенциала покоя в ЛВ частично или полностью может быть обусловлена действием таких эндотелиальных факторов как эндотелин, оксид азота, EDHF. Ранее нами было показано, что пуриновые комедиаторы (АТФ, НАД⁺, диаденозинполифосфаты) симпатической нейротрансмиссии частично подавляют адренергическую автоматию

легочных вен [Потехина и др., 2019; Pustovit et al., 2016, 2019; Kuzmin et al., 2016]. Поэтому, мы предположили, что факторы, которые действуют на миокард легочных вен «с другой стороны сосуда» - со стороны эндотелия, также могут модулировать адренергическую автоматию.

Эндотелин-1 секретируется эндотелиальными клетками сосудов и его основной мишенью являются гладкие мышцы, где он вызывает сокращение и изменение мембранного потенциала. В настоящее время показано, что кардиомиоциты обладают рецепторами эндотелина-1, активация которых приводит к изменению уровня цитоплазматического кальция. В наших работах показано, что спонтанные выбросы кальция из саркоплазматического ретикулума индуцируют внеочередные ПД, а увеличение базального уровня кальция вызывает гиперполяризацию ПП в кардиомиоцитах легочных вен [Каримова и др., 2016а]. В наших экспериментах удаление эндотелия не приводило к изменению ПП, а также не влияло на эффекты активации $\alpha 1$ -адренорецепторов в легочных венах. Эндотелин-1 также не влиял на потенциал покоя и спонтанную активность миокарда легочных вен крысы.

В настоящее время показано, что оксид азота, продуцируемый эндотелием, может оказывать существенное влияние на электрическую и сократительную активность кардиомиоцитов. Показано, что доноры NO вызывают изменение автоматической активности изолированных кардиомиоцитов легочных вен собаки [Lin et al., 2010]. Тем не менее, исследования влияния доноров оксида азота (нитропруссид натрия, SNAP) на биоэлектрическую активность миокардиальной ткани легочных вен грызунов ранее не проводилось. Нитропруссид натрия и SNAP вызывали одинаковые изменения ПП и ПД в предсердном миокарде и миокардиальной ткани легочных вен, однако, в незначительной степени уменьшали аритмогенную активность в ЛВ, вызванную норадреналином. Мы предположили, что в основе такого действия доноров оксида азота в ЛВ может быть снижение уровня цитоплазматического кальция, в результате чего снижается деполяризующая составляющая тока натрий-кальциевого обменника (I_{NCX}).

На основе выполненных экспериментов, было сделано предположение, что спонтанная деполяризация в миокарде легочных вен крысы не связана с действием эндотелиальных факторов. Механизмы действия NO в предсердных кардиомиоцитах и кардиомиоцитах легочных вен, видимо, одинаковы.

5.5.2. Потенциальная роль микроРНК в формировании эктопической автоматии миокарда легочных вен

МикроРНК являются малыми молекулами, которые специфически ингибируют экспрессию генов путем так называемой РНК-интерференции или «сайленсинга». Исследования генома человека показали, что существует порядка 2000 микроРНК, часть из которых является тканеспецифическими. Установлено, что микроРНК выполняют регуляторную роль в целом ряде биологических процессов, например они важны для эмбрионального развития. Показано также, что микроРНК играют важную роль в физиологии и патофизиологии сердечнососудистой системы. Выявлена их связь с формированием ряда патологий сердца и сосудов. МикроРНК рассматриваются также как маркеры заболеваний сердечнососудистой системы.

Благодаря нескольким пионерским работам, в том числе группы под руководством Г.Добржинской, показано, что существуют микроРНК, специфически экспрессируемые в различных отделах сердца, в том числе в пейсмекерном миокарде САУ, а также то, что эти специфические микроРНК влияют на его автоматическую активность. Более того, на основе аналитических биоинформационных исследований сделано предположение о том, какие именно микроРНК могут обладать регуляторной активностью в пейсмекерном и рабочем миокарде. Нами проведена оценка способности микроРНК miR-486-3p, miR-1, miR-133a-3p при внутривенном введении в составе фосфат-кальциевых наночастиц изменять характер эктопической активности, индуцированной норадреналином в миокардиальной ткани легочных вен крыс.

Все три исследованных микроРНК (miR-486-3p, miR-1, miR-133a-3p) в той или иной степени оказывали влияние на параметры спонтанной активности, вызываемой норадреналином в миокарде легочных вен. Однако, следует отметить, что ни одна из микроРНК не приводила к полному подавлению способности норадреналина индуцировать СПД в миокарде легочных вен.

Исходя из результатов экспериментов, по совокупности электрофизиологических признаков, следует предположить, что miR-133a-3p и miR-486-3p усиливает проаритмическую эктопическую активность, вызванную норадреналином в миокарде легочных вен крыс, увеличивая частоту залповой активности и стимулируя триггерный характер активности. Эффекты МиР-1 неоднозначны: исходя из некоторых эффектов, можно предположить, что данная микроРНК может подавлять эктопическую автоматию легочных вен. Введение микроРНК miR-1 приводит к тому, что количество ПД с постдеполяризациями уменьшается, т.е. спонтанные ПД в легочных венах приобретают фенотип, характерный для рабочего миокарда предсердий.

Ранее в наших работах было установлено, что микроРНК miR-133a-3p индуцирует залпы спонтанных ПД и вызывает нарушения реполяризации потенциалов действия в предсердиях, увеличивает чувствительность САУ к адренергической стимуляции за счет подавления экспрессии нескольких молекулярных мишеней, включая белки (PDE, PPP2CA), регулирующие внеклеточную передачу адренергических сигналов [Kuzmin et al., 2021; Кузьмин и др., 2021a].

Разнонаправленный характер действия микроРНК, вероятно, обусловлен множественностью их мишеней – то есть мРНК, с которыми данные молекулы могут связываться, вызывая их деградацию и предотвращая синтез белка. В настоящее время имеется большой объем литературы касательно потенциальных внутриклеточных мишеней микроРНК. Тем не менее, данные, представленные в литературе, крайне ненадежны. Мы проверили возможность связывания микроРНК (экспрессируемых у крыс и мышей) miR-1, miR-133a-3p, miR-486-3p с 3'-UTR последовательностью мРНК основных ионных каналов кардиомиоцитов и белков, вовлеченных в формирование электрофизиологического фенотипа. Анализ взаимодействия исследуемых микроРНК выявил, что мишенями miR-1, miR-133a-3p, miR-486-3p в кардиомиоцитах могут быть мРНК одновременно нескольких кальциевых (Cav1.2, Cav3.1), калиевых ионных каналов, а также таких регуляторных белков как KChip2, KChip3 (регуляторы Kv4.3, 4.2, Cav1.2), PPP2C, NF- κ B, NkX2-5. Мишенями miR-486-3p являются, помимо прочих, мРНК адренорецепторов α 1-типа.

Нами впервые показано, что микроРНК, специфически экспрессируемые в сердце, могут модулировать эктопическую активность в миокарде легочных вен.

5.6. Тканевые механизмы аритмогенности и особенности электрического сопряжения в миокардиальной ткани легочных вен

Как удалось выявить в нашей работе, кардиомиоциты в легочных венах электрически сопряжены, и степень этого сопряжения сравнима с таковой в предсердном миокарде: кардиомиоциты экспрессируют значительное количество основных щелевых контактов рабочего миокарда – коннексинов Cx43, которые образуют хорошо выраженные бляшки в области интеркалярных дисков. В ходе функциональных экспериментов показано, что при действии разобщителя электрических контактов (октанола) скорость проведения возбуждения в легочных венах падает меньше, чем в предсердном миокарде. Сама скорость проведения возбуждения (при оценке среднего, нелокального значения) в ЛВ и предсердиях оказывается практически одинаковой. Возможно, что причиной уменьшенной скорости проведения является не недостаток щелевых контактов, а сниженное значение константы длины (λ) – параметра, который характеризует, на какое

расстояние в миокарде будет распространяться пассивный сдвиг потенциала, достаточный для активации ионного тока I_{Na} .

Известно, что величина λ пропорциональна отношению мембранного сопротивления к сопротивлению цитоплазмы – в случае миокарда – электрически сопряженных элементов (кардиомиоцитов). λ является величиной, определяемой двумя группами факторов. Первая группа – это свойства межклеточных взаимодействий (в частности, проводимость щелевых контактов) и особенности структурной организации миокарда. Как показали наши исследования, в ЛВ и предсердиях эти факторы сходны. Вторая группа – это биоэлектрические свойства самих кардиомиоцитов, их размер, пассивные свойства их мембраны. Константа длины у кроликов и морских свинок больше в области устьев и дистальных участках ЛВ, чем в предсердном миокарде. Увеличение λ способствует увеличению надежности проведения возбуждения. Повышение электрической сопряженности может являться приспособлением к сложной анатомической организации перехода в области устье вен.

У крыс λ меньше в ЛВ, чем предсердном миокарде. На экспериментальных записях фактически можно видеть, что в “допороговая” фаза ПД короче и нарастает круче в легочных венах, чем в предсердном миокарде. В таком случае скорость проведения возбуждения (при условиях равных значений емкости мембраны) должна быть меньше в ЛВ, чего не наблюдается. Объяснение данного феномена может заключаться в сниженном “критическом потенциале” в миокарде ЛВ по сравнению с предсердиями. Возможно, для активации натриевых каналов, формирования входящего тока и фронта ПД в ЛВ крыс необходим гораздо меньший положительный сдвиг мембранного потенциала от уровня потенциала покоя, чем в предсердном миокарде. Как указано выше, для легочных вен характерен значительный $I_{Na,late}$, так что различия в свойствах тока в предсердиях и ЛВ не удивительны. При сниженном «критическом потенциале» в ЛВ различного рода аномалии реполяризации (постдеполяризации) должны возникать в ответ на меньший деполяризующий ток, чем в предсердиях. Для миокарда ЛВ действительно характерна предрасположенность к задержанным постдеполяризациям.

Ряд механизмов может лежать в основе сниженного «критического потенциала»: повышенная потенциалчувствительность натриевых каналов, колокализация со щелевыми контактами, преимущественная локализация натриевых каналов в определенных участках (торцах) кардиомиоцита. Последнее предположение кажется наиболее вероятным, поскольку объясняет сохранение скорости продольного проведения возбуждения в миокарде легочных вен при действии октанолола.

Каковы же причины аритмогенности ЛВ, если электрическое сопряжение кардиомиоцитов является высоким? Плотность щелевых контактов равномерно по периметру вен и, соответственно, нарушения проведения возбуждения, не могут быть результатом макроскопической неоднородности их распределения. В наших экспериментах показано, что, возникающие в условиях нестационарной активации, абберации проведения возбуждения являются локальными, возникающими в небольших участках легочных вен, и сопровождаются усилением анизотропии активации. Неравномерное распределение натриевых каналов в мембране кардиомиоцитов и тканевая гетерогенность по длительности ПД, значению ПП может быть основой аритмогенного характера активации легочных вен. Возможно, что неоднородность электрофизиологических свойств на уровне групп клеток, является более важным фактором аритмогенеза, чем сложность макроскопической архитектуры миокардиальных тяжей легочных вен человека и экспериментальных животных.

6. 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 (ПП), нарушение реполяризации потенциалов действия (ПД), 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, 2012a]. 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, 2012б], 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., 2017а]. 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., 2017а; Кузьмин и 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., 2021b]. 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., 2021б]. Уровень экспрессии калиевых ионных каналов Kir2.x, необходимых для стабилизации ПП в миокарде ЛВ также низок, как в САУ [Ivanova and Kuzmin, 2018]. С другой стороны, кардиомиоциты легочных вен не экспрессируют коннексины «пейсмекерных» щелевых 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.

7. 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; эндотелиальные факторы практически не оказывают влияния на эктопическую автоматию легочных вен.
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 важным 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.

8. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ANF - натрийуретический фактор
- ANP - натрийуретический пептид
- ASG- специфические секреторные гранулы
- EDGF - эндотелиальный гиперполяризующий фактор
- HCN – ионные каналы, управляемые циклическими нуклеотидами, активируемые гиперполяризацией
- INCX - деполяризующая составляющая тока натрий-кальциевого обменника
- NCX - натрий-кальциевый обменник
- SNAP – донор оксида азота
- TBX - транскрипционные факторы семейства T-box () –
- VEGF - эндотелиальный фактор роста сосудов
- α -MHC – тяжелые цепи миозина II
- АЦ - аденилатциклаза
- АЦХ - ацетилхолин
- ВКП - второе кардиогенное поле
- ВЛВ – ветвь легочной вены
- вЛВ - восходящая легочная вена
- ВС - венозный синус
- ГМК - гладкомышечная клетка
- ДЛ – доля легкого
- ДПД – длительность потенциала действия
- ЕРП – эффективный рефрактерный период
- ИЗО - изопротеренол
- ЛВ – легочная вена
- ЛЛВ – левая легочная вена
- ЛП – левое предсердие
- МДД - медленная диастолическая деполяризация
- НА – норадреналин
- НПС - нитропруссид
- НПВСП - нестероидные противовоспалительные препараты
- ПД - потенциал действия
- ПЛВ – правая легочная вена
- ПНС - постганглионарные интрамуральные нервные окончания
- ПП - потенциал покоя

ППО – пропранолол
РП - рефрактерный период
САУ - синоатриального узел
СВА – линия мышей
СП – спонтанный потенциал
СПН - стимуляция постганглионарных нервных волокон
СПД – спонтанные потенциалы действия
ССС - сердечно-сосудистая система
ТФ - транскрипционный фактор
цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
УЛП – ушко левого предсердия
ФДЭ - фосфодиэстераза
ФП - фибрилляция предсердий
ФРП - функциональный рефрактерный период
ФЭ - фенилэфрин
ЧСС – частота сердечных сокращений
ЭМП - эпителиально-мезенхимальный переход
ЭРП - эффективный рефрактерный период

9. СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Камкин А.Г., Ярыгин В. Н., Киселева И.С. Механоэлектрическая обратная связь в сердце // Москва: Натюрморт. -2003. - С.1-181.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.

11. Кузьмин В. С., Кобылина А. А., Пустовит К. Б. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Кузьмин В. С., Розенштраух Л. В. Ионные механизмы действия антиаритмических препаратов III класса // Кардиология. - 2010. - Т. 50 - № 7. - С. 49-61.
16. 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.
17. Потехина В. М., Аверина О. А., Кузьмин В. С. Суправентрикулярный миокард сердца мышей *b6cbaf1* проявляет генетически-обусловленную аритмогенность благодаря эктопической автоматии и триггерной активности. Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. – 2019. - № 2. – С.115-122.
18. 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.
19. Потехина В.М. Адренергическая регуляция биоэлектрической активности миокарда легочных вен млекопитающих и её изменение в постнатальном онтогенезе. Дисс. Канд. Биол. Наук. 2020.
20. Соловьева О.Э. Исследование электромеханических явлений в миокарде при помощи математических моделей: дисс. доктора физ.-мат. наук: 03.00.02. / Соловьева Ольга Эдуардовна; ИИФ УРО РАН. – Пущино, 2006. – 333 с.

21. Сухова Г.С., Андреева Н.В., Чудаков Л.И., Сайед К. Исследование биоэлектрической активности и автоматических свойств различных отделов двухкамерного сердца // Физиол. журн. СССР им. И. М. Сеченова. – 1977. – № 1. – С. 86-91.
22. Сухова Г.С., Удельнов М.Г., Иштване Х. Две формы взаимодействия тканевых образований, генерирующих спонтанные ритмы // Вестник московского университета. – 1973. – № 4. – С. 39-43.
23. Чуканова Г.С. Автоматические свойства передних полых вен лягушки // Механизмы нейро-гуморальной регуляции вегетативных функций. Издательство «Наука» 1970. – 1970. – С. 144-148.
24. 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. - V.31. - № 5. - P. 525-533.
25. 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.
26. Aharinejad S., Böck P., Lametschwandtner A., Franz P., Firbas W. Sphincters in the rat pulmonary veins. Comparison of scanning electron and transmission electron microscopic studies // Scanning Microsc. – 1991. – V. 5. – № 4. – P. 1091–1096.
27. Akaza S. Über das Vorkommen von quergestreiften Muskelfasern in der Wandung der Lungenvenen // Mitt. Med. Ges. Tokio. – 1899. – Bd. 13. – H. 19.
28. Allesie M.A. Pathophysiology of atrial fibrillation / D.P. Zipes, J. Jalife // Cardiac electrophysiology: from cell to bedside. – Philadelphia: WB Saunders. – 1990. – P. 548–559.
29. Allesie M.A., Boyden P.A., Camm A.J., Kléber A.G., Lab M.J., Legato M.J., Rosen M.R., Schwartz P.J., Spooner P.M., van Wagoner D.R., Waldo A.L. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation // Circulation. – 2001. – V. 103. – № 5. – P. 769–777.
30. Amano S. Beitrag zur funktionellen Struktur der Lungenvenen // Trans. Soc. Path. Jap. – 1933. – V. 23. – P. 842.
31. 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 -V.166 - P.86-104

32. Anderson R.H., Ho S.Y., Chen S.A., Yeh H.Y., Perez-Lugones A., McMahon J.T., Natale A. "Specialized" conducting cells in the pulmonary veins // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* – 2004. – V. 15. – № 1. – P. 121-123.
33. Antzelevitch C. Drug-induced spatial dispersion of repolarization // *Cardiol. J.* – 2008. – V. 15. – № 2. – P. 100-121.
34. Anyukhovskiy E.P., Rosenshtraukh L.V. Electrophysiological responses of canine atrial endocardium and epicardium to acetylcholine and 4-aminopyridine // *Cardiovasc Res.* – 1999. – V. 43. – № 2. – P. 364-370.
35. Arentz T., Haegeli L., Sanders P., Weber R., Neumann F.J., Kalusche D., Haïssaguerre M. High-density mapping of spontaneous pulmonary vein activity initiating atrial fibrillation in humans // *J. Cardiovasc Electrophysiol.* – 2007. – V. 18. – № 1. – P. 31–38.
36. Arentz T., von Rosenthal J., Blum T., Stockinger J., Bürkle G., Weber R., Jander N., Neumann F.J., Kalusche D. Feasibility and safety of pulmonary vein isolation using a new mapping and navigation system in patients with refractory atrial fibrillation // *Circulation.* – 2003. – V. 108. – № 20. – P. 2484–2490.
37. Arita M. Studies on the excitability and contractility of the proximal vena cava // *Jpn. Circ. J.* – 1966a. – V. 30. – № 12. – P. 1605-1621.
38. Arita M., Saeki K., Tanoue M., Fukushima I., Ito M., Yanaga T., Mashiba H. Effects of catecholamines, propranolol, acetylcholine and ouabain on the transmembrane action potentials and contractility of the isolated venae cavae proximal to the heart of the rabbit // *Jpn. J. Physiol.* – 1967. – V. 17. – № 2. – P. 158–173.
39. Arita M., Saeki K., Tanoue M., Ito M., Yanaga T., Mashiba H. Studies on transmembrane action potentials and mechanical responses of the venae cavae and atria of the rabbit // *Jpn. J. Physiol.* – 1966b. – V. 16. – № 4. – P. 462-480.
40. Arnstein C. Zur Kenntnis der quergestreiften muskulatur in den lungenvenen // *Zentbl. Med. Wiss.* – 1877. – V 15. – P. 692-694.
41. Arora R., Verheule S., Scott L., Navarrete A., Katari V., Wilson E., Vaz D., Olgin J.E. Arrhythmogenic substrate of the pulmonary veins assessed by high-resolution optical mapping // *Circulation.* – 2003. – V. 107. – № 13. – P. 1816–1821.
42. Asai J., Nakazato M., Toshimori H., Matsukura S., Kangawa K., Matsuo H. Presence of atrial natriuretic polypeptide in the pulmonary vein and vena cava // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1987. – V. 146. – № 3. – P. 1465–1470.
43. Auer J. The development of the human pulmonary vein and its major variations // *Anat. Rec.* – 1948. – V. 101. – № 4. – P. 581–594.

44. Auer J. The early development of the sinu-atrial region in the heart // *Acta Neerl. Morphol.* – 1941. – V. 4. – P. 214–232.
45. Barbaro V., Bartolini P., Calcagnini G., Censi F., Michelucci A. Measure of synchronisation of right atrial depolarisation wavefronts during atrial fibrillation // *Med. Biol. Eng. Comput.* – 2002. – V. 40. – № 1. – P. 56–62.
46. Benninghoff A. Blutgefasse und Herz // *Handbuch Mikr. Anat. Menschen.* – 1930. – V. 6, Part 1. – P. 1–232.
47. Benninghoff A. *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen* / A. Benninghoff, M. Bielschowsky, S.T. Bok, W. von Möllendorff. – Berlin: Springer, 1930. – Vol. 6, Part L. – P. 142-160.
48. Best P.V., Heath D. Interpretation of the appearances of the small pulmonary blood vessels in animals // *Circ. Res.* – 1961. – V. 9. – P. 288-294.
49. Bidloo G. *Anatomia humani corporis, centum and quinque tabulis, per artificiosiss. G. de Lairese ad vivum delineates* / Amsterdam: for the widow of Joannes van Someren, the heirs of Joannes van Dyk, Henry Boom and widow of Theodore Boom, 1685. – P. 241.
50. 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. – V.133. - № 3. – P.122-129.
51. Bondue A., Blanpain C. Mesp1: a key regulator of cardiovascular lineage commitment // *Circ. Res.* – 2010. – V. 107. – № 12. – P. 1414–1427.
52. Bredeloux P., Pasqualin C., Bordy R., Maupoil V., Findlay I. Automatic activity arising in cardiac muscle sleeves of the pulmonary vein // *Biomolecules.* – 2021. – V. 12. – № 1. – P. 23.
53. Brenner O. Pathology of the vessels of the pulmonary circulation // *Arch. Internal. Med.* – 1935. – V. 56. – P. 227-232.
54. Bronquard C., Maupoil V., Arbeille B. Contractile properties of large pulmonary veins of rat // *Fundam. Clin. Pharmacol.* – 2005. – V. 19. – P. 210.
55. Bronquard C., Maupoil V., Arbeille B., Fetissof F., Findlay I., Cosnay P., Freslon J.L. Contractile and relaxant properties of rat-isolated pulmonary veins related to localization and histology // *Fundam. Clin. Pharmacol.* – 2007. – V. 21. – № 1. – P. 55–65.
56. Brown A.J. The development of the pulmonary vein in the domestic cat // *Anat. Rec.* – 1913. – V. 7. – № 9. – P. 299–330.
57. Brunton T.L., Fayrer J. XXII. Note on independent pulsation of the pulmonary veins and vena cava // *Proc. R. Soc. Lond.* – 1877. – V. 25. – P. 174–176.

58. Bucciante L. Architettura e struttura della guaina miocardica delle vene cave, pulmonari e del seno coronario dell'uomo // Arch. Ital. Med. Sper. Torino. – 1940. – V. 5. – P. 273-294.
59. Buckingham M., Meilhac S., Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells // Nat. Rev. Genet. – 2005. – V. 6. – № 11. – P. 826–835.
60. Burch G.E., Romney R.B. Functional anatomy and throttle valve action on the pulmonary veins // Am. Heart J. – 1954. – V. 47. – № 1. – P. 58–66.
61. Burdsal C.A., Damsky C.H., Pedersen R.A. The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak // Dev. – 1993. – V. 118. – № 3. – P. 829–844.
62. Burke W. Spontaneous potentials in slow muscle fibres of the frog // J. Physiol. – 1957. – V. 135. – № 3. – P. 512-521.
63. Cai C.-L., Liang X., Shi Y., Chu P.H., Pfaff S.L., Chen J., Evans S. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart // Dev. Cell. – 2003. – V. 5. – № 6. – P. 877–889.
64. Cai W., Guzzo R.M., Wei K., Willems E., Davidovics H., Mercola M. A Nodal-to-TGF β cascade exerts biphasic control over cardiopoiesis // Circ. Res. – 2012. – V. 111. – № 7. – P. 876–881.
65. Cantin M., Gutkowska J., Thibault G., Milne R.W., Ledoux S., MinLi S., Chapeau C., Garcia R., Hamet P., Genest J. Immunocytochemical localization of atrial natriuretic factor in the heart and salivary glands // Histochemistry. – 1984. – V. 80. – № 2. – P. 113–127.
66. Cantin M., Timm-Kennedy M., El-Khatib E., Huet M., Yunge L. Ultrastructural cytochemistry of atrial muscle cells. VI. Comparative study of specific granules in right and left atrium of various animal species // Anat. Rec. – 1979. – V. 193. – № 1. – P. 55–69.
67. Carrow R., Calhoun M.L. The extent of cardiac muscle in the great veins of the dog // Anat. Rec. – 1964. – V. 150. – № 3. – P. 249–256.
68. Chan C.S., Lin Y.K., Kao Y.H., Chen Y.C., Chen S.A., Chen Y.J. Hydrogen sulphide increases pulmonary veins and atrial arrhythmogenesis with activation of protein kinase C // J. Cell. Mol. Med. – 2018. – V. 22. – № 7. – P. 3503-3513.
69. Chang C.J., Cheng C.C., Chen Y.C., Higa S., Huang J.H., Chen S.A., Chen Y.J. Factor Xa inhibitors differently modulate electrical activities in pulmonary veins and the sinoatrial node // Eur. J. Pharmacol. – 2018. – V. 833. – P. 462-471.
70. Chang C.J., Cheng C.C., Chen Y.C., Kao Y.H., Chen S.A., Chen Y.J. Gap junction modifiers regulate electrical activities of the sinoatrial node and pulmonary vein:

- Therapeutic implications in atrial arrhythmogenesis // *Int. J. Cardiol.* – 2016. – V. 221. – P. 529-536.
71. Chang C.J., Cheng C.C., Yang T.F., Chen Y.C., Lin Y.K., Chen S.A., Chen Y.J. Selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs differentially regulate pulmonary vein and atrial arrhythmogenesis // *Int. J. Cardiol.* – 2015. – V. 184. – P. 559-567.
72. Chang J.H., Cheng C.C., Lu Y.Y., Chung C.C., Yeh Y.H., Chen Y.C., Higa S., Chen S.A., Chen Y.J. Vascular endothelial growth factor modulates pulmonary vein arrhythmogenesis via vascular endothelial growth factor receptor 1/NOS pathway // *Eur. J. Pharmacol.* – 2021. – V. 911. – № 7. – P. 174547.
73. Chard M., Tabrizchi R. The role of pulmonary veins in atrial fibrillation: A complex yet simple story // *Pharmacology and Therapeutics.* - 2009. – V.124 – P.2264-2274.
74. Chen S.A., Hsieh M.H., Tai C.T., Tsai C.F., Prakash V.S., Yu W.C., Hsu T.L., Ding Y.A., Chang M.S. Initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating from the pulmonary veins: electrophysiological characteristics, pharmacological responses, and effects of radiofrequency ablation // *Circulation.* – 1999. – V. 100. – № 18. – P. 1879–1886.
75. Chen S.A., Yeh H.I. Specialized conduction cells in human pulmonary veins: fact and controversy // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* – 2003. – V. 14. – № 8. – P. 810–811.
76. Chen W.T., Chen Y.C., Hsieh M.H., Huang S.Y., Kao Y.H., Chen Y.A., Lin Y.K., Chen S.A., Chen Y.J. The uremic toxin indoxyl sulfate increases pulmonary vein and atrial arrhythmogenesis // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* – 2015. – V. 26. – № 2. – P. 203-210.
77. Chen Y.C., Chen S.A., Chen Y.J., Tai C.T., Chan P., Lin C.I. T-type calcium current in electrical activity of cardiomyocytes isolated from rabbit pulmonary vein // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* – 2004. – V. 15. – № 5. – P. 567-571.
78. Chen Y.J., Chen S., Chang M., Lin C. Arrhythmogenic activity of cardiac muscle in pulmonary veins of the dog: implication for the genesis of atrial fibrillation // *Cardiovasc. Res.* – 2000. – V. 48. – № 2. – P. 265–273.
79. Chen Y.J., Chen S.A., Chen Y.C., Yeh H.I., Chan P., Chang M.S., Lin C.I. Effects of rapid atrial pacing on the arrhythmogenic activity of single cardiomyocytes from pulmonary veins: implication in initiation of atrial fibrillation // *Circulation.* – 2001. – V. 104. – № 23. – P. 2849-2854.
80. Chen Y.J., Chen S.A., Chen Y.C., Yeh H.I., Chang M.S., Lin C. Electrophysiology of single cardiomyocytes isolated from rabbit pulmonary veins: implication in initiation of focal atrial fibrillation // *Basic Res. Cardiol.* – 2002. – V. 97. – № 1. – P. 26–34.
81. Cheung D.W. Electrical activity of the pulmonary vein and its interaction with the right atrium in the guinea-pig // *J. Physiol.* – 1981a. – V. 314. – № 1. – P. 445–456.

82. Cheung D.W. Pulmonary vein as an ectopic focus in digitalis-induced arrhythmia // *Nature*. – 1981b. – V. 294. – № 5841. – P. 582–584.
83. Chou C.C., Nihei M., Zhou S., Tan A., Kawase A., Macias E.S., Fishbein M.C., Lin S.F., Chen P.S. Intracellular calcium dynamics and anisotropic reentry in isolated canine pulmonary veins and left atrium // *Circulation*. – 2005. – V. 111. – № 22. – P. 2889–2897.
84. Christoffels V.M., Mommersteeg M.T.M., Trowe M.-O., Prall O.W.J., de Gier-de Vries C., Soufan A.T., Bussen M., Schuster-Gossler K., Harvey R.P., Moorman A.F.M., Kispert A. Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18 // *Circ. Res.* – 2006. – V. 98. – № 12. – P. 1555–1563.
85. Cioni C. Il sistema della vene polmonari nella regolazione del circolo. L'importanza di alcune strutture muscolari e degli angoli di confluenza dei rami collettori // *Arch. Ital. di Anat. e istol. pat.*— 1939. – V. 10. – P. 533.
86. Ciruna B., Rossant J. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak // *Dev. Cell*. – 2001. – V. 1. – № 1. – P. 37–49.
87. Cox J.L., Schuessler R.B., Boineau J.P. The surgical treatment of atrial fibrillation. I. Summary of the current concepts of the mechanisms of atrial flutter and atrial fibrillation // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 1991. – V. 101. – № 3. – P. 402–405.
88. Davies F., MacConaill M.A. Cor biloculare with a note on the development of the pulmonary veins // *J. Anat.* – 1937. – V. 71. – P. 437–446.
89. Del Castillo J., Katz B. Production of membrane potential changes in the frog's heart by inhibitory nerve impulses // *Nature*. – 1955. – V. 175. – № 4467. – P. 1035.
90. DeRuiter M.C., Gittenberger-de Groot A.C., Wenink A.C.G., Poelmann R.E., Mentink M.M.T. In normal development pulmonary veins are connected to the sinus venosus segment in the left atrium // *Anat. Rec.* – 1995. – V. 243. – № 1. – P. 84–92.
91. DeRuiter M.C., Poelmann R.E., Mentink M.M., Vaniperen L., Gittenberger-de Groot A.C. Early formation of the vascular system in quail embryos // *Anat Rec.* – 1993. – V. 235. – P. 261–274.
92. DeRuiter M.C., Poelmann R.E., Vanmunsteren J.C., Mironov V., Markwald R.R., Gittenberger-de Groot A.C. Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins in vivo and in vitro // *Circ. Res.* – 1997. – V. 80. – № 4. – P. 444–451.
93. Dobrzynski H., Anderson R.H., Atkinson A., Borbas Z., D'Souza A., Fraser J.F., Inada S., Logantha S.J., Monfredi O., Morris G.M., Moorman A.F., Nikolaidou T., Schneider H., Szuts V., Temple I.P., Yanni J., Boyett M.R. Structure, function and clinical relevance of

- the cardiac conduction system, including the atrioventricular ring and outflow tract tissues // *Pharmacol. Ther.* – 2013 – V. 139. – №2. – P. 260-288.
94. Doisne N., Maupoil V., Cosnay P., Findlay I. Catecholaminergic automatic activity in the rat pulmonary vein: electrophysiological differences between cardiac muscle in the left atrium and pulmonary vein // *Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol.* – 2009. – V. 297. – № 1. – P. H102-108.
95. Domínguez J.N., Meilhac S.M., Bland Y.S., Buckingham M.E., Brown N.A. Asymmetric fate of the posterior part of the second heart field results in unexpected left/right contributions to both poles of the heart // *Circ. Res.* – 2012. – V. 111. – № 10. – P. 1323–1335.
96. Douglas Y.L., Jongbloed M. R., Gittenberger-de Groot A.C., Evers D., Dion R.A.E., Voigt P., Bartelings M.M., Schalijs M.J., Ebels T., DeRuiter M.C. Histology of vascular myocardial wall of left atrial body after pulmonary venous incorporation // *Am. J. Cardiol.* – 2006. – V. 97. – № 5. – P. 662–670.
97. Douglas Y.L., Jongbloed M.R.M., DeRuiter M.C., Gittenberger-De Groot A.C. Normal and abnormal development of pulmonary veins: state of the art and correlation with clinical entities // *Int. J. Cardiol.* – 2011. – V. 147. – № 1. – P. 13–24.
98. Douglas Y.L., Mahtab E. A., Jongbloed M. R. Uhrin P., Zaujec J., Binder B.R., Schalijs M.J., Poelmann R.E., Deruiter M.C., Gittenberger-de Groot A.C. Pulmonary vein, dorsal atrial wall and atrial septum abnormalities in podoplanin knockout mice with disturbed posterior heart field contribution // *Pediatr. Res.* – 2009. – V. 65. – № 1. – P. 27–32.
99. 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. – T.26. - № 10. – P.1130-1139.
100. Egorov Y.V., Kuz'min V.S., Glukhov A.V., Rosenshtraukh L.V. Electrophysiological characteristics, rhythm, disturbances and conduction discontinuities under autonomic stimulation in the rat pulmonary vein myocardium // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* – 2015. – V. 26. – № 10. – P. 1130–1139.
101. Eliakim M., Aviado D.M. Effects of nerve stimulation and drugs on the extrapulmonary portion of the pulmonary vein // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1961. – V. 133. – P. 304–312.
102. Elischer J. Über quergestreifte muskeln der ins herz einmündenden venen des Menschen //

103. Endo H., Kurohmaru M., Hayashi Y., Nishida T., Hattori S. Cardiac musculature of the intrapulmonary vein in the musk shrew // *J. Vet. Med. Sci.* – 1992a. – V. 54. – № 1. – P. 119–123.
104. Endo H., Kurohmaru M., Nishida T., Hayashi Y. Cardiac musculature of the cranial and caudal venae cavae and the pulmonary vein in the fowl // *J. Vet. Med. Sci.* – 1992b. – V. 54. – № 3. – P. 479–484.
105. Endo H., Kurohmaru M., Tanigawa M., Hayashi Y. Morphological differences in the musculature of the pulmonary venous wall between three species of caviomorph, the nutria, guinea pig and chinchilla // *J. Mamm. Soc. Jpn.* – 1992c. – V. 17. – P. 111–118.
106. Endo H., Maeda S., Kimura J., Yamada J., Rerkamnuaychoke W., Chungsamarnyart N., Tanigawa M., Kurohmaru M., Hayashi Y., Nishida T. Cardiac musculature of the cranial vena cava in the common tree shrew (*Tupaia glis*) // *J. Anat.* – 1995. – V. 187. Pt 2. – P. 347–352.
107. Endo H., Mifune H., Maeda S., Kimura J., Yamada J., Rerkamnuaychoke W., Chungsamarnyart N., Ogawa K., Kurohmaru M., Hayashi Y., Nishida T. Cardiac-like musculature of the intrapulmonary venous wall of the long-clawed shrew (*Sorex unguiculatus*), common tree shrew (*Tupaia glis*) and common marmoset (*Callithrix jacchus*) // *Anat. Rec.* – 1997. – V. 247. – № 1. – P. 46–52.
108. Espinoza-Lewis R.A., Yu L., He F., Liu H., Tang R., Shi J., Sun X., Martin J.F., Wang D., Yang J., Chen Y.P. *Shox2* is essential for the differentiation of cardiac pacemaker cells by repressing *Nkx2-5* // *Dev. Biol.* – 2009. – V. 327. – № 2. – P. 376–385.
109. Everett T.H., Olgin J.E. Basic mechanisms of fibrillation // *Cardiol. Clin.* – 2004. – V. 22. – P. 9–20.
110. Favaro G.F. Il Miocardio Polmonare. Contributi All'istologia umana e comparata dei vasi polmonari // *Internat. Monatsch. Anat. Physiol.* – 1910. – V. 27. – P. 376–401.
111. Fedorow V. Ueber die Entwicklung der Lungenvenen // *Anat. Anz.* – 1908. – V. 32. – P. 544.
112. Fekete E. *Biology of the Laboratory Mouse* / E. Fekete, G.D. Snell. – New York: Dover Publications Inc., 1941. – P. 90.
113. Ferrier G.R. Digitalis arrhythmias: role of oscillatory afterpotentials // *Prog. Cardiovasc. Dis.* – 1977. – V. 19. – № 6. – P. 459–474.
114. Ferrier G.R., Saunders J.H., Mendez C. A cellular mechanism for the generation of ventricular arrhythmias by acetylcholinesterase // *Circ. Res.* – 1973. – V. 32. – № 5. – P. 600–609.
115. Flint J.M. The development of the lungs // *Am. J. Anat.* – 1906. – P. 61–137.

116. Franco D., Campione M. The role of Pitx2 during cardiac development. Linking left-right signaling and congenital heart diseases // *Trends Cardiovasc.* – 2003. – V. 13. – № 4. – P. 157–163.
117. Franklin K.J. A monograph on veins / K.J. Franklin. – Springfield: Charles C Thomas, 1937. – P. 410.
118. Galli D., Domínguez J.N., Zaffran S., Munk A., Brown N.A., Buckingham M.E. Atrial myocardium derives from the posterior region of the second heart field, which acquires left-right identity as Pitx2c is expressed // *Dev.* – 2008. – V. 135. – № 6. – P. 1157–1167.
119. Garrey W.E. The nature of fibrillary contraction of the heart: its relation to tissue mass and form // *Am. J. Physiol.* – 1914. – V. 33. – P. 397-414.
- Gittenberger-de Groot A.C., Bartelings M.M., Poelmann R.E., Haak M.C., Jongbloed M.R.M. Embryology of the heart and its impact on understanding fetal and neonatal heart disease // *Semin. Fetal Neonatal Med.* – 2013. – V. 18. – № 5. – P. 237–244.
120. Gittenberger-de Groot A.C., Mahtab E.A.F., Hahurij N.D., Wisse L.J., Deruiter M.C., Wijffels M.C.E.F., Poelmann R.E. Nkx2.5-negative myocardium of the posterior heart field and its correlation with podoplanin expression in cells from the developing cardiac pacemaking and conduction system // *Anat. Rec.* – 2007. – V. 290. – № 1. – P. 115–122.
121. Goette A., Lendeckel U., Klein H.U. Signal transduction systems and atrial fibrillation // *Cardiovasc. Res.* – 2002. – V. 54. – № 2. – P. 247–58.
122. Granel F. Sur la musculature striée des veines pulmonaires du rat // *Compt. Rend. Soc. Biol.* – 1921. – V. 84. – P. 291-294.
123. Guieysse-Pellissier A. Les Appareils Respiratoires dans la Serie Animale / A. Guieysse-Pellissier. – Paris: Payot, 1945. – P. 233-235.
124. Habets P.E.M.H., Moorman A.F.M., Clout D.E.W., van Roon M.A., Lingbeek M., van Lohuizen M., Campione M., Christoffels V.M. Cooperative action of Tbx2 and Nkx2.5 inhibits ANF expression in the atrioventricular canal: implications for cardiac chamber formation // *Genes. Dev.* – 2002. – V. 16. – № 10. – P. 1234–1246.
125. Haïssaguerre M., Gencel L., Fischer B., Le Métayer P., Poquet F., Marcus F.I., Clémenty J. Successful catheter ablation of atrial fibrillation // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* – 1994a. – V. 5. – № 12. – P. 1045–1052.
126. Haïssaguerre M., Jaïs P., Shah D. C., Takahashi A., Hocini M., Quiniou G., Garrigue S., Mouroux A. Le, Métayer P. Le, Clémenty J. Spontaneous initiation of atrial

- fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins // *N. Engl. J. Med.* – 1998. – V. 339. – № 10. – P. 659–666.
127. Haïssaguerre M., Marcus F.I., Fischer B., Clémenty J. Radiofrequency catheter ablation in unusual mechanisms of atrial fibrillation: report of three cases // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* – 1994b. – V. 5. – № 9. – P. 743-751.
128. Haïssaguerre M., Shah D.C., Jaïs P., Hocini M., Yamane T., Deisenhofer I., Chauvin M., Garrigue S., Clémenty J. Electrophysiological breakthroughs from the left atrium to the pulmonary veins // *Circulation.* – 2000. – V. 102. – № 20. – P. 2463–2465.
129. Haller A. *Dispes selectie* / A. Haller. – Goett, 1747.
130. Haller A. *Elementa Physiologica Corporis Humanis. Fibra, vasa, circuitus, sanguine* / A. Haller. – Lausannae, 1757. – P. 399-410.
131. Hamaguchi S., Hikita K., Tanaka Y., Tsuneoka Y., Namekata I., Tanaka H. Enhancement of automaticity by mechanical stretch of the isolated guinea pig pulmonary vein myocardium // *Biol. Pharm. Bull.* – 2016. – V. 39. – № 7. – P. 1216-1219.
132. Hamaguchi S., Tsuneoka Y., Tanaka A., Irie M., Tsuruta M., Nakayama T., Namekata I., Nada M., Aimoto M., Takahara A., Tanaka H. Manifestation of automaticity in the pulmonary-vein myocardium of rats with abdominal aorto-venocaval shunt // *J. Pharmacol. Sci.* – 2015. – V. 128. – № 4. – P. 212-215.
133. Hashizume H., Tango M., Ushiki T. Three-dimensional cytoarchitecture of rat pulmonary venous walls: a light and scanning electron microscopic study // *Anat. Embryol.* – 1998. – V. 198. – № 6. – P. 473–480.
134. Hashizume H., Ushiki T., Abe K. A histological study of the cardiac muscle of the human superior and inferior venae cavae // *Arch. Histol. Cytol.* – 1995. – V. 58. – № 4. – P. 457–464.
135. Hayek H.V. *Die menschliche Lunge* / H.V. Hayek. – Berlin: J. Springer, 1953. – P. 289.
136. Heijman J., Voigt N., Nattel S., Dobrev D. Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression // *Circ. Res.* – 2014. – V. 114. – P. 1483–1499.
137. Henle J. *Handbuch der Gefäßlehre des Menschen* / J. Henle. – Braunschweig: Friedrich Vieweg und Sohn, 1868. – P. 440.
138. Hessling T. *rundzüge der allgemeinen und speciellen Gewebelehre des Menschen* / Leipzig: W. Engelmann, 1866. – P. 249.

139. Ho S.Y., Cabrera J.A., Tran V.H., Farré J., Anderson R.H., Sánchez-Quintana D. Architecture of the pulmonary veins: relevance to radiofrequency ablation // *Heart*. – 2001. – V. 86. – № 3. – P. 265–270.
140. Hocini M., Ho S.Y., Kawara T., Linnenbank A.C., Potse M., Shah D., Jaïs P., Janse M.J., Haïssaguerre M., Bakker J.M.T. Electrical conduction in canine pulmonary veins: electrophysiological and anatomic correlation // *Circulation*. – 2002. – V. 105. – № 20. – P. 2442–2448.
141. Hooker C.W., McAllister H.A., Ellis F.W. Active contractions of the large thoracic veins in certain mammals // *Anat. Rec.* – 1964. – V. 148. – P. 292.
142. Hosoyamada Y., Ichimura K., Koizumi K., Sakai T. Structural Organization of pulmonary veins in the rat lung, with special emphasis on the musculature consisting of cardiac and smooth muscles // *Anat. Sci. Int. Japanese Assoc. Anat.* - 2010. - V. 85. - № 3. - P. 152–59.
143. Hsieh M-H., Tai C-T., Tsai C-F., Yu W-Ch., Lin W-Sh., Huang J.L., Ding Y.U., Chang M.S., Chen S.A. Mechanism of spontaneous transition from typical atrial flutter to atrial fibrillation: role of ectopic atrial fibrillation foci // *Pacing Clin. Electrophysiol.* – 2001. – V. 24. – № 1. – P. 46–52.
144. Huang J.H., Chen Y.C., Lu Y.Y., Lin Y.K., Chen S.A., Chen Y.J. Arginine vasopressin modulates electrical activity and calcium homeostasis in pulmonary vein cardiomyocytes // *J. Biomed. Sci.* – 2019. – V. 26. – № 1. – P. 71.
145. Hutter O.F., Trautwein W. Effect of vagal stimulation on the sinus venosus of the frog's heart // *Nature*. – 1955. – V. 176. – № 4480. – P. 512–513.
146. Hutter O.F., Trautwein W. Vagal and sympathetic effects on the pacemaker fibers in the sinus venosus of the heart // *J. Gen. Physiol.* – 1956. – V. 39. – № 5. – P. 715-733.
147. Innes J.R., McAdams A.J., Yevich P. Pulmonary disease in rats; a survey with comments on chronic murine pneumonia // *Am. J. Pathol.* – 1956. – V. 32. – № 1. – P. 141–159.
148. Irie M., Hiroy H., Hamaguchi S., Namekata I., Tanaka H. Involvement of the persistent Na⁺ current in the diastolic depolarization and automaticity of the guinea pig pulmonary vein myocardium // *J. Pharmacol. Sci.* – 2019. – V. 141. – № 1. – P. 9-16.
149. Irie M., Hiroy H., Kato S., Kuramochi M., Hamaguchi S., Namekata I., Tanaka H. Differential effects of class I antiarrhythmic drugs on the guinea pig pulmonary vein myocardium: Inhibition of automatic activity correlates with blockade of a diastolic sodium current component // *J. Pharmacol. Sci.* – 2020. – V. 143. – № 4. – P. 325-329.

150. Irie M., Tsuneoka Y., Shimobayashi M., Hasegawa N., Tanaka Y., Mochizuki S., Ichige S., Hamaguchi S., Namekata I., Tanaka H. Involvement of Alpha- and Beta-adrenoceptors in the automaticity of the isolated guinea pig pulmonary vein myocardium // *J. Pharmacol. Sci.* – 2017. – V. 133. – № 4. – P. 247–253.
151. Ito M., Arita M., Saeki K., Tanoue M., Fukushima I. Functional properties of sinocaval conduction // *Jpn. J. Physiol.* – 1967. – V. 17. – № 2. – P. 174–189.
152. Ito M., Yanaga T., Saeki K., Arita M., Ishihara M., Mashiba H. Studies on sinocaval conduction of the rabbit with microelectrodes // *Jpn. J. Physiol.* – 1964. – V. 14. – P. 439-449.
153. Ivanova A. D., Filatova T. S., Abramochkin D.V., Atkinson A., Dobrzynski H., Kokaeva Z. G., Merzlyak E. M., Pustovit K. B., Kuzmin V. S. Attenuation of inward rectifier potassium current contributes to the α 1-adrenergic receptor induced proarrhythmicity in the caval vein myocardium // *Acta Physiologica.* - 2021. - Vol. 231 - № 4. - P.13597.
154. Ivanova A. D., Kuzmin V. S. Inhibition of inward rectifier potassium currents by chloroquine causes significant electrophysiological changes in the rat thoracic veins myocardium // *Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки.* - 2018. - V.160. - № 4. - P. 645–653
155. Ivanova A. D., Samoilova 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 - № 11. - P. 1493–1503.
156. 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.
157. Iwasaki Y.K., Nishida K., Kato T., Nattel S. Atrial fibrillation pathophysiology: implications for management // *Circulation.* – 2011. – V. 124. – P. 2264–74.
158. Iwasaki Y.-K., Nishida K., Kato T., Nattel S. Atrial fibrillation pathophysiology: implications for management // *Circulation.* – 2011. – V.124 - № 20. – P.2264-2274.
159. Jaïs P., Haïssaguerre M., Shah D. C., Chouairi S., Gencel L., Hocini M., Clémenty J. A focal source of atrial fibrillation treated by discrete radiofrequency ablation // *Circulation.* – 1997. – V. 95. – № 3. – P. 572–576.
160. Jalife J., Berenfeld O., Mansour M. Mother rotors and fibrillatory conduction: a mechanism of atrial fibrillation // *Cardiovasc. Res.* – 2002. – V. 54. – № 2. – P. 204–216.

161. James W.R.L., Thomas A.J. The effect of hypoxia on the heart and pulmonary arterioles of mice // *Cardiovasc. Res.* – 1968. – V. 2. – № 3. – P. 278–283.
162. Jarkovska D. Histology of the intrapulmonary veins in the albino Wistar rat, with special references to the pulmonary myocardium // *Folia Morphol. (Praha)*. – 1985. – V. 33. – № 2. – P. 175–180.
163. Jarkovska D., Ostadal B. Intermittent high altitude hypoxia-induced structural changes in the pulmonary myocardium in young mice // *Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* – 1983. – V. 43. – № 3. – P. 327–336.
164. Jarkovska D., Ostadal B. The effect of intermittent high altitude hypoxia on the pulmonary myocardium in the mouse // *Folia Morphol. (Praha)*. – 1980. – V. 28. – № 1. – P. 116–119.
165. Jensen B., Boukens B. J.D., Wang T., Moorman A.F.M. Evolution of the sinus venosus from fish to human // *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* – 2014. – V. 1. – № 1. – P. 14–28.
166. Jones S.A., Yamamoto M., Tellez J.O., Billeter R., Boyett M.R., Honjo H., Lancaster M.K. Distinguishing properties of cells from the myocardial sleeves of the pulmonary veins: a comparison of normal and abnormal pacemakers // *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* – 2008. – V. 1. – № 1. – P. 39–48.
167. Jones W.K., Sánchez A., Robbins J. Murine pulmonary myocardium: developmental analysis of cardiac gene expression // *Dev. Dyn.* – 1994. – V. 200. – № 2. – P. 117–128.
168. Ju Y.K., Allen D.G. How does beta-adrenergic stimulation increase the heart rate? The role of intracellular Ca²⁺ release in amphibian pacemaker cells // *J. Physiol.* – 1999. – V. 516. – P. 793–804.
169. Karrer H.E. The striated musculature of blood vessels. I. General cell morphology // *J. Biophys. Biochem. Cytol.* – 1959. – V. 6. – № 3. – P. 383–392.
170. Karrer H.E. The striated musculature of blood vessels. II. Cell interconnections and cell surface // *J. Biophys. Biochem. Cytol.* – 1960. – V. 8. – № 1. – P. 135–150.
171. Kamkin AG, Kamkina OV, Shim AL, Bilichenko A, Mitrokhin VM, Kazansky VE, Filatova TS, Abramochkin DV, Mladenov MI. The role of activation of two different sGC binding sites by NO-dependent and NO-independent mechanisms in the regulation of SACs in rat ventricular cardiomyocytes // *Physiol Rep.* – 2022. – V.10. – №.7. P.e15246.
172. Keith A., Flack M. The form and the nature of muscular connections between the primary divisions of the vertebrate heart // *J. Anat. Physiol.* – 1907. – V. 41. – P. 172–189.

173. Kelly R.G., Brown N.A., Buckingham M.E. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm // *Dev. Cell.* – 2001. – V. 1. – № 3. – P. 435–440.
174. Kholová I., Kautzner J. Anatomic characteristics of extensions of atrial myocardium into the pulmonary veins in subjects with and without atrial fibrillation // *Pacing Clin. Electrophysiol.* – 2003. – V. 26. – № 6. – P. 1348–1355.
175. Klavins J. Demonstration of striated muscle in the pulmonary veins of the rat // *J. Anat.* – 1963. – V. 97. – P. 239–241.
176. Klika E., Jarkovska D. The myocardium of the intrapulmonary veins in mammals / E. Klika, D. Jarkovska. – Praha: Academia. – 1976. – P. 45.
177. Kölliker A. *Mikroskopische Anatomie* / A. Kölliker. – Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann, 1854. – P. 569.
178. Kramer A.W., Marks L.S. The occurrence of cardiac muscle in the pulmonary veins of Rodentia // *J. Morphol.* – 1965. – V. 117. – № 2. – P. 135–149.
179. Kumagai K., Ogawa M., Noguchi H., Yasuda T., Nakashima H., Saku K. Electrophysiologic properties of pulmonary veins assessed using a multielectrode basket catheter // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2004. – V. 43. – P. 2281–2289.
180. Kuzmin V. S., Ivanova A. D., Potekhina V. M., Samoilova D. V., Ushenin K. S., Shvetsova A. A., Petrov A. M. The susceptibility of the rat pulmonary and caval vein myocardium to the catecholamine-induced ectopy changes oppositely in postnatal development // *Journal of Physiology.* - 2021. - V.599. - № 11. - P.2803 - 2821.
181. 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. - V. 23. - № 1. - P.1-11.
182. Kuzmin V.S., Alexandra D. I., 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. - V.908. - P. 174369.
183. 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. - V.266. - P.118887.
184. Lacomis J.M., Goitein O., Deible C., Schwartzman D. CT of the Pulmonary Veins // *J. Thorac. Imaging.* – 2007. – V. 22. – P. 63–76.

185. Larsen T.H., Arjamaa O., Järvinen M., Sietersdal T. Immunohistochemical localization of ANP in the pulmonary veins of the rat // *Acta Histochem. Cytochem.* – 1987a. – V. 20. – № 5. – P. 471–476.
186. Larsen T.H., Sætersdal T., Romyantsev P.P. Striated myocytes and atrial specific granules in the pulmonary veins of chronically infarcted rat hearts // *Res. Exp. Med. (Berl).* – 1987b. – V. 187. – № 3. – P. 225–236.
187. Larsson H.P. How is the heart rate regulated in the sinoatrial node? Another piece to the puzzle // *J. Gen. Physiol.* – 2010. – V. 136. – № 3. – P. 237–241.
188. Lauche A. Anatomie und pathologie der spontanerkrankungen der kleinen laboratoriumstiere. trachea, bronchien, lungen und pleura. / A. Lauche. – Berlin: J. Springer, 1931. – P. 32.
189. Leonidova S. V., Pustovit K. B., Kuzmin V. S. Pacemaker properties and adrenergic regulation of the rat coronary sinus myocardium // *Europace* - 2017. - V.19 - P.iii240.
190. Lewis T., Drury A.N., Iliescu C.C. A demonstration of circus movement in clinical flutter of the auricles // *Heart.* – 1921a. – V. 8. – P. 341-355.
191. Lewis T., Drury A.N., Bulger H.A. Observations upon flutter and fibrillation VII. The effects of vagal stimulation // *Heart.* – 1921b. – V. 8. – P. 141-170.
192. Lewis T., Schleiter H.G. The relation of regular tachycardias of auricular origin to auricular fibrillation // *Heart.* – 1912. – V. 3. – P. 173–193.
193. Leydig F. Lehrbuch der Histologie des Menschen und der Tiere / F. Leydig. – Frankfurt a. M: Meidinger, 1857. – P. 401.
194. Lin Y.K., Lu Y.Y., Chen Y.C., Chen Y.J., Chen S.A. Nitroprusside modulates pulmonary vein arrhythmogenic activity // *J. Biomed. Sci.* – 2010. – V. 17. – № 1. – P. 20.
195. Logantha S.J., Cruickshank S.F., Rowan E.G., Drummond R.M. Spontaneous and electrically evoked Ca²⁺ transients in cardiomyocytes of the rat pulmonary vein // *Cell Calcium.* – 2010. – V. 48. – P. 150–160.
196. Los J.A. Cardiac septation and development of the aorta, pulmonary trunk, and pulmonary veins: previous work in the light of recent observations // *Birth. Defects Orig. Artic. Ser.* – 1978. – V. 14. – № 7. – P. 109–138.
197. Lu Y.Y., Cheng C.C., Huang S.Y., Chen Y.C., Kao Y.H., Lin Y.K., Higa S., Chen S.A., Chen Y.J. Fibroblast Growth Factor 1 reduces pulmonary vein and atrium arrhythmogenesis via modification of oxidative stress and sodium // *Front. Cardiovasc. Med.* – 2022. – V. 8. – № 12. – P. 813589.
198. Lu Y.Y., Cheng C.C., Wu H.J., Lin Y.K., Chen Y.C., Chen S.A., Chen Y.J. Effects of ANP on pulmonary vein electrophysiology, Ca²⁺ homeostasis and adrenergic

- arrhythmogenesis via PKA // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2020. – V. 47. – № 2. – P. 247-254.
199. Lu Y.Y., Lin Y.K., Wen Z.H., Chen Y.C., Chen S.A., Chen Y.J. Latrunculin B modulates electrophysiological characteristics and arrhythmogenesis in pulmonary vein cardiomyocytes // *Clin. Sci. (Lond).* – 2016. – V. 130. – № 9. – P. 721-732.
200. Lu Y.Y., Wu W.S., Lin Y.K., Cheng C.C., Chen Y.C., Chen S.A., Chen Y.J. Angiotensin 1-7 modulates electrophysiological characteristics and calcium homeostasis in pulmonary veins cardiomyocytes via MAS/PI3K/eNOS signalling pathway // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2018. – V. 48. – № 1.
201. Ludatscher R.M. Fine structure of the muscular wall of rat pulmonary veins // *J. Anat.* – 1968. – V. 103, Pt 2. – P. 345-57.
202. Lyons G.E., Schiaffino S., Sassoon D., Barton P., Buckingham M. Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle // *J. Cell Biol.* – 1990. – V. 111. – № 6, Pt 1. – P. 2427–2436.
203. Ma Q., Zhou B., Pu W.T. Reassessment of *Isl1* and *Nkx2-5* cardiac fate maps using a *Gata4*-based reporter of *Cre* activity // *Dev. Biol.* – 2008. – V. 323. – № 1. – P. 98–104.
204. MacLeod D.P., Hunter E.G. The pharmacology of the cardiac muscle of the great veins of the rat // *Can. J. Physiol. Pharmac.* – 1967. – V. 45. – № 3. – P. 463–473.
205. Malécot C.O. Low voltage-activated channels in rat pulmonary vein cardiomyocytes: coexistence of a non-selective cationic channel and of T-type Ca channels // *Pflugers Arch.* – 2020. – V. 472. – № 8. – P. 1019-1029.
206. Malécot C.O., Bredeloux P., Findlay I., Maupoil V., A TTX-sensitive resting Na^+ permeability contributes to the catecholaminergic automatic activity in rat pulmonary vein // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* – 2015. – V. 26. – № 3. – P. 311–319.
207. Marshall J. VI. On the development of the great anterior veins in man and mammalia; including an account of certain remnants of fetal structure found in the adult, a comparative view of these great veins the different mammalia, and an analysis of their occasional peculiarities in the human subject // *Philos. Trans. R. Soc. London* - 1850. – V. 140. – P. 133–170.
208. Masani F. Node-like cells in the myocardial layer of the pulmonary vein of rats: an ultrastructural study // *J. Anat.* – 1986. – V. 145. – P. 133–142.
209. Mashiba H., Yanaga T., Ito M., Mori H. Studies on transmembrane action potential of mammalian vascular smooth muscle and myo-myocardial excitation transmission between cardiac and vascular muscle // *Kyushu J. Med. Sci.* – 1963. – V. 14. – P. 121-130.

210. Maupoil V., Bronquard C., Freslon J.L., Cosnay P., Findlay I. Ectopic activity in the rat pulmonary vein can arise from simultaneous activation of alpha1- and beta1-adrenoceptors // *Br. J. Pharmacol.* – 2007. – V. 150. – № 7. – P. 899–905.
211. Mazzotta S., Neves C., Bonner R.J., Bernardo A.S., Docherty K., Hoppler S. Distinctive roles of canonical and noncanonical Wnt signaling in human embryonic cardiomyocyte development // *Stem cell reports.* – 2016. – V. 7. – № 4. – P. 764–776.
212. Meibom H. Meibomi prsosite. Disputes de motu sangius / Rose Heimst, 1668.
213. Melnyk P., Ehrlich J. R., Pourrier M., Villeneuve L., Cha T.J., Nattel S. Comparison of ion channel distribution and expression in cardiomyocytes of canine pulmonary veins versus left atrium // *Cardiovasc. Res.* – 2005. – V. 65. – № 1. – P. 104–116.
214. Millino C., Sarinella F., Tiveron C., Villa A., Sartore S., Ausoni S. Cardiac and smooth muscle cell contribution to the formation of the murine pulmonary veins // *Dev. Dyn.* – 2000. – V. 218. – № 3. – P. 414–425.
215. Mines G.R. On dynamic equilibrium in the heart // *J. Physiol.* – 1913. – V. 46. – P. 349-383.
216. Miyauchi Y., Hayashi H., Miyauchi M., Okuyama Y., Mandel W.J., Chen P.S., Karagueuzian H.S. Heterogeneous pulmonary vein myocardial cell repolarization implications for reentry and triggered activity // *Hear. Rhythm.* – 2005. – V. 2. – № 12. – P. 1339–1345.
217. Moe G.K. Reentry phenomenon in cardiac rhythm disorders // *Coeur. Med. Interne.* – 1974. – V. 13. – № 4. – P. 581-590.
218. Moe G.K., Rheinboldt W.C., Abildskov J.A. A computer model of atrial fibrillation // *Am. Heart. J.* – 1964. – V. 67. – P. 200–220.
219. Mommersteeg M.T., Brown N.A., Prall O.W., Gier-De Vries C., Harvey R.P., Moorman A.F., Christoffels V.M. Pitx2c and Nkx2-5 are required for the formation and identity of the pulmonary myocardium // *Circ. Res.* – 2007a. – V. 101. – № 9. – P. 902–909.
220. Mommersteeg M.T., Christoffels V.M., Anderson R.H., Moorman A.F. Atrial fibrillation: a developmental point of view // *Heart Rhythm.* – 2009. – V. 6. – № 12. – P. 1818–1824.
221. Mommersteeg M.T.M., Domínguez J.N., Wiese C., Norden J., de Gier-de Vries C., Burch J.B.E., Kispert A., Brown N.A., Moorman A.F.M., Christoffels V.M. The sinus venosus progenitors separate and diversify from the first and second heart fields early in development // *Cardiovasc. Res.* – 2010. – V. 87. – № 1. – P. 92–101.

222. Mommersteeg M.T.M., Hoogaars W.M.H., Prall O.W.J., Gier-De Vries C. De, Wiese C., Clout D.E.W., Papaioannou V.E., Brown N.A., Harvey R.P., Moorman A.F.M., Christoffels V.M. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node // *Circ. Res.* – 2007b. – V. 100. – № 3. – P. 354–362.
223. Moorman A.F., Anderson R.H. Development of the pulmonary vein // *Int. J. Cardiol.* – 2011. – V. 147. – P. 182.
224. Moorman A.F.M., Christoffels V.M. Cardiac chamber formation: Development, genes, and evolution // *Physiol. Rev.* – 2003. – V. 83. – № 4. – P. 1223–1267.
225. Moorman A.F.M., Christoffels V.M., Anderson R.H., van den Hoff M.J.B. The heart-forming fields: One or multiple? // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* – 2007. – V. 362. – № 1484. – P. 1257–1265.
226. Mueller-Hoecker J., Beitinger F., Fernandez B., Bahlmann O., Assmann G., Troidl C., Dimomeletis I., Käab S., Deindl E. Of rodents and humans: a light microscopic and ultrastructural study on cardiomyocytes in pulmonary veins // *Int. J. Med. Sci.* – 2008. – V. 5. – № 3. – P. 152–158.
227. Muller. J. *Elements of Physiology* / J. Muller. – 2nd ed. – London, 1842. – P. 848.
228. Namekata I., Tsuneoka Y., Akiba A., Nakamura H., Shimada H., Takahara A., Tanaka H. Intracellular calcium and membrane potential oscillations in the guinea pig and rat pulmonary vein myocardium // *Bioimages.* – 2010. – V. 18. – P. 11-22.
229. Namekata I., Tsuneoka Y., Takahara A., Shimada H., Sugimoto T., Takeda K., Nagaharu M., Shigenobu K., Kawanishi T., Tanaka H. Involvement of the Na(+)/Ca(2+) exchanger in the automaticity of guinea-pig pulmonary vein myocardium as revealed by SEA0400 // *J. Pharmacol. Sci.* – 2009. – V. 110. – № 1. – P. 111–116.
230. Namekata I., Tsuneoka Y., Tanaka H. Electrophysiological and pharmacological properties of the pulmonary vein myocardium // *Biol. Pharm. Bull.* – 2013. – V. 36. – № 1. – P. 2-7.
231. Nathan H., Eliakim M. The junction between the left atrium and the pulmonary veins. An anatomic study of human hearts // *Circulation.* – 1966. – V. 34. – № 3. – P. 412–422.
232. Nathan H., Gloobe H. Myocardial atrio-venous junctions and extensions (sleeves) over the pulmonary and caval veins. Anatomical observations in various mammals // *Thorax.* – 1970. – V. 25. – № 3. – P. 317-324.
233. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation – 50 years on // *Nature.* – 2002. – V. 415. – P. 219-226.

234. Ohtani O. Microvasculature of the rat lung as revealed by scanning electron microscopy of corrosion casts // *Scan. Electron Microsc.* – 1980. – № 3. – P. 349–356.
235. Okamoto Y., Aung N.Y., Tanaka M., Takeda Y., Takagi D., Igarashi W., Ishii K., Yamakawa M., Ono K. Preferential expression of Ca²⁺-stimulable adenylyl cyclase III in the supraventricular area, including arrhythmogenic pulmonary vein of the rat heart // *Biomolecules.* – 2022. – V. 12. – № 5. – P. 724.
236. Okamoto Y., Kawamura K., Nakamura Y., Ono K. Pathological impact of hyperpolarization-activated chloride current peculiar to rat pulmonary vein cardiomyocytes // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2014. – V. 66. – P. 53–62.
237. Okamoto Y., Nagasawa Y., Obara Y., Ishii K., Takagi D., Ono K. Molecular identification of HSPA8 as an accessory protein of a hyperpolarization-activated chloride channel from rat pulmonary vein cardiomyocytes // *J. Biol. Chem.* – 2019. – V. 294. – № 44. – P. 16049-16061.
238. Okamoto Y., Takano M., Ohba T., Ono K. Arrhythmogenic coupling between the Na⁺-Ca²⁺ exchanger and inositol 1,4,5-triphosphate receptor in rat pulmonary vein cardiomyocytes // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2012. – V. 52. – № 5. – P. 988–997.
239. Otterbach K. Beitrage zur Kenntnis des Lungenkreislaufs. II. Die Genese des Myocardfibrizuges des Miindungsteiles der Vena pulmonalis, Gegenbaurs Morphol // *Jahrb.* – 1938. – V. 81. – P. 547.
240. Paes de Almeida O., Bohm C.M., de Paula Carvalho M., Paes de Carvalho A. The cardiac muscle in the pulmonary vein of the rat: a morphological and electrophysiological study // *J. Morphol.* – 1975. – V. 145. – № 4. – P. 409–433.
241. Pappone C., Rosiano S., Oreto G., Tocchi M., Gugliotta F., Vicedomini G., Salvati A., Dicandia C., Mazzone P., Santinelli V., Gulletta S., Chierchia S. Circumferential radiofrequency ablation of pulmonary vein ostia: a new anatomic approach for curing atrial fibrillation // *Circulation.* – 2000. – V. 102. – № 21. – P. 2619–2628.
242. Park D.S., Fishman G.I. Basic science for clinicians: the cardiac conduction system // *Circulation.* – 2011. – V. 123. – P. 904–915.
243. Pasqualin C., Yu A., Malécot C.O., Gannier F., Cognard C., Godin-Ribuot D., Morand J., Bredeloux P., Maupoil V. Structural heterogeneity of the rat pulmonary vein myocardium: consequences on intracellular calcium dynamics and arrhythmogenic potential // *Sci. Rep.* – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 3244.
244. Patterson E., Jackman W.M., Beckman K.J., Lazzara R., Lockwood D., Scherlag B.J., Wu R., Po S. Spontaneous pulmonary vein firing in man: relationship to tachycardia-

- pause early afterdepolarizations and triggered arrhythmia in canine pulmonary veins in vitro // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* – 2007. – V. 18. – № 10. – P. 1067-1075.
245. Patterson E., Lazzara R., Szabo B., Liu H., Tang D., Li Y.H., Scherlag B.J., Po S.S. Sodium–calcium exchange initiated by the Ca²⁺ transient: an arrhythmia trigger within pulmonary veins // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2006. – V. 47. – № 6. – P. 1196–1206.
246. Patterson E., Po S.S., Scherlag B.J., Lazzara R. Triggered firing in pulmonary veins initiated by in vitro autonomic nerve stimulation // *Heart Rhythm.* – 2005. – V. 2. – № 6. – P. 624-631.
247. Peaslee E.R. *Human Histology and Its Relations to Descriptive Anatomy, Physiology and Pathology* / E.R. Peaslee. – Philadelphia: Blanchard and Lea, 1857. – P. 508.
248. Pedrote A., Arana-Rueda E., Garcia-Riesco L., Jiménez-Velasco A., Sánchez-Brotons J., Arizón-Muñoz J.M., Fernández-Pérez J.M., Frutos-López M. Three-dimensional impedance mapping as an aid to circumferential pulmonary vein isolation in paroxysmal atrial fibrillation // *Rev. Esp. Cardiol.* – 2009. – V. 62. – № 3. – P. 315–319.
249. Perez-Lugones A., McMahon J.T., Ratliff N.B., Saliba W.I., Schweikert R.A., Marrouche N.F., Saad E.B., Navia J.L., McCarthy P.M., Tchou P., Gillinov A.M., Natale A. Evidence of specialized conduction cells in human pulmonary veins of patients with atrial fibrillation // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* – 2003. – V. 14. – № 8. – P. 803–809.
250. Piana G.P. Di una speciale disposizione della muscolatura nelle radici della vena porta del cavallo e nelle radici delle vene polmonari del bue // *Monit. Zool. Ital.* – 1983. – V. 4. – P. 60-62.
251. Po S.S., Li Y., Tang D., Liu H., Geng N., Jackman W.M., Scherlag B., Lazzara R., Patterson E. Rapid and stable re-entry within the pulmonary vein as a mechanism initiating paroxysmal atrial fibrillation // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2005. – V. 45. – № 11. – P. 1871–1877.
252. Po S.S., Scherlag B.J., Yamanashi W.S., Edwards J., Lazzara R. Experimental model for paroxysmal atrial fibrillation arising at the pulmonary vein-atrial junctions // *Heart Rhythm.* – 2006. – V. 3. – P. 201–208.
253. Policard A., Collet A., Pregermain S. La gaine myocardique des veines intrapulmonaires etudiee chez le rat au microscope electronique // *Bull. Microsc.* – 1959. – appl. 9. – P. 5-9.
254. Postma A.V., Dekker L.R.C., Soufan A.T., Moorman A.F.M. Developmental and genetic aspects of atrial fibrillation // *Trends Cardiovasc. Med.* – 2009. – V. 19. – № 4. – P. 123–130.

255. Potekhina V.M., Averina O. A., Razumov A. A., Kuzmin V. S., Rozenshtraukh 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. -V. 69. - № 6. - P.1041-1055.
256. 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. - V. 389. - № 3. - P. 303-313.
257. Pustovit K. B., V. M. Potekhina, A. D. Ivanova, A. M. Petrov, D. V. Abramochkin, and V. S. Kuzmin. Extracellular atp and β -nad alter electrical properties and cholinergic effects in the rat heart in age-specific manner // *Purinergic Signalling*. - 2019. - V.15. - № 1. - P. 107-117.
258. 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.- P.1-13
259. Rauschel F. De arteriarum et venarum structura: dissertatio inauguralis anatomico-physiologica quam gratiosi ordinis medicorum consensu et auctoritate / Rauschel Ferdinandus, Universitate Viadrina. – Vratislavia, 1836. – P. 38.
260. Rhodin J.A. Microscopic anatomy of the pulmonary vascular bed in the cat lung // *Microvasc. Res*. – 1978. – V. 15. – № 2. – P. 169–193.
261. Rietdorf K., Bootman M. D., Sanderson M. J. Spontaneous, pro-arrhythmic calcium signals disrupt electrical pacing in mouse pulmonary vein sleeve cells // *PLoS One*. – 2014. – V. 9. – № 2. – P. 88649.
262. Rosenblueth A., Ramos J.G. Estudios sobre el flutter y la fibrilación; la influencia de los obstáculos artificiales en el flutter auricular experimental [Studies on flutter and fibrillation; the influence of artificial obstacles on the experimental atrial flutter] // *Arch. Inst. Cardiol. Mex*. – 1947. – V. 17. – № 1. – P. 1–19.
263. Rosenshtraukh L.V., Fedorov V.V., Sharifov O.F. Cholinergic atrial fibrillation / Zipes D., Jalife J. (Ed's) // *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside*. – 4th ed. – Philadelphia: Saunders, 2004. – P. 306-316.
264. Roux N., Havet E., Mertl P. The myocardial sleeves of the pulmonary veins: potential implications for atrial fibrillation // *Surg. Radiol. Anat*. – 2004. – V. 26. – P. 285–289.

265. Saeki K. Study on the intracellular potential of the superior vena cava proximal to the heart of rabbits // *Jpn. Circ. J.* – 1967. – V. 31. – № 4. – P. 683–692.
266. Saito T., Waki K., Becker A.E. Left atrial myocardial extension onto pulmonary veins in humans: Anatomic observations relevant for atrial arrhythmias // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* – 2000. – V. 11. – P. 888–894.
267. Scherf D. Studies on auricular tachycardia caused by aconitine administration // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1947. – V. 64. – № 2. – P. 233–239.
268. Schmitt C., Zrenner B., Schneider M., Karch M., Ndrepepa G., Deisenhofer I., Weyerbrock S., Schreieck J., Schömig A. Clinical experience with a novel multielectrode basket catheter in right atrial tachycardias // *Circulation.* – 1999. – V. 99. – № 18. – P. 2414–2422.
269. Schneider M.A. Nature of rapid pulmonary vein tachycardias: reentry or not reentry? // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* – 2003. – V. 14. – № 9. – P. 933–934.
270. Schornstein T. Beiträge zur Kenntniß des Lungenkreislaufs. I. Frühstadien der Genese der Vena pulmonalis / *Gegenbaurs Morphol. Jahrb.* – 1931. – V. 67. – P. 566.
271. Schotten U., Verheule S., Kirchhof P., Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal // *Physiol. Rev.* - 2011. - V. 91. - № 1. - P. 265–325.
272. Senac M. J-B. *Traité de la structure du cœur, de son action et de ses maladies* / M. J-B. Senac. – Paris: J. Vincent, 1774. – P. 540.
273. Seol C.A., Kim J., Kim W.T., Ha J.M., Choe H., Jang Y.J., Shim E.B., Youm J.B., Earm Y.E., Leem C.H. Simulation of spontaneous action potentials of cardiomyocytes in pulmonary veins of rabbits // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 2008. – V. 96. – № 1-3. – P. 132–151.
274. Sharifov O.F., Zaitsev A.V., Rosenshtraukh L.V., Kaliadin A.Y., Beloshapko G.G., Yushmanova A.V., Schuessler R.B., Boineau J.P. Spatial distribution and frequency dependence of arrhythmogenic vagal effects in canine atria // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* – 2000. – V. 11. – № 9. – P. 1029–1042.
- Sitzungsb. Math.-Naturw. Kl. Acad. Wiss. Wien. – 1869. – Bd. 60. – A. 2. – P. 63–68.
275. Sizarov A., Anderson R.H., Christoffels V.M., Moorman A.F. Three-dimensional and molecular analysis of the venous pole of the developing human heart // *Circulation.* - 2010. - V. 122. - № 8. - P. 798–807.
276. Smith R.M., Parker B.M., Oliver G.C. Effects of pharmacologic agents on human and canine pulmonary veins // *Am. J. Cardiol.* . – 1970. – V. 26. – № 1. – P. 56–60.

277. Snarr B.S., O'Neal J.L., Chintalapudi M.R., Wirrig E.E., Phelps A.L., Kubalak S.W., Wessels A. *Isl1* expression at the venous pole identifies a novel role for the second heart field in cardiac development // *Circ. Res.* – 2007. – V. 101. – № 10. – P. 971–974.
278. Spach M.S., Barr R.C., Jewett P.H. Spread of excitation from the atrium into thoracic veins in human beings and dogs // *Am. J. Cardiol.* – 1972. – V. 30. – № 8. – P. 844–854.
279. Springall D.R., Bhatnagar M., Wharton J., Hamid Q., Gulbenkian S., Hedges M., Meleagros L., Bloom S.R., Polak J.M. Expression of the atrial natriuretic peptide gene in the cardiac muscle of rat extrapulmonary and intrapulmonary veins // *Thorax.* – 1988. – V. 43. – № 1. – P. 44–52.
280. Squier T.L. On the development of the pulmonary circulation in the chick // *Anat. Rec.* – 1916. – V. 10. – P. 425–438.
281. Stalsberg H., DeHaan R.L. The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo // *Dev. Biol.* – 1969. – V. 19. – № 2. – P. 128–159.
282. Stefanovic S., Christoffels V.M. GATA-dependent transcriptional and epigenetic control of cardiac lineage specification and differentiation // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2015. – V. 72. – № 20. – P. 3871–3881.
283. Steinhart Z., Angers S. Wnt signaling in development and tissue homeostasis // *Dev.* – 2018. – V. 145. – № 11. – dev146589.
284. Stieda L. Ueber quergestreifte Muskelfasern in der Wand der Lungenvenen // *Archiv f. Mikrosk. Anat.* – 1877. – V. 14. – № 1. – P. 243–248.
285. Subramaniam A., Jones W.K., Gulick J., Wert S., Neuman J., Robbins J. Tissue-specific regulation of the α -myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 266. – P. 24613–24620.
286. Sun Q., Tang M., Pu J., Zhang S. Pulmonary venous structural remodeling in a canine model of chronic atrial dilation due to mitral regurgitation // *Can. J. Cardiol.* – 2008. – V. 24. – № 4. – P. 305–308.
287. Swartz J., Pellersels G., Silvers J., Patten L., Cervantez D. A catheter-based curative approach to atrial fibrillation in humans // *Circulation.* – 1994. – V. 90. – № 4. – I. 335.
288. Takagi D., Okamoto Y., Ohba T., Yamamoto H., Ono K. Comparative study of hyperpolarization-activated currents in pulmonary vein cardiomyocytes isolated from rat, guinea pig, and rabbit // *J. Physiol. Sci.* – 2020. – V. 70. – № 1. – P. 6.
289. Takahara A., Hagiwara M., Namekata I., Tanaka H. Pulmonary vein myocardium as a possible pharmacological target for the treatment of atrial fibrillation // *J. Pharmacol. Sci.* – 2014. – V. 126. – № 1. – P. 1–7.

290. Takahara A., Sugimoto T., Kitamura T., Takeda K., Tsuneoka Y., Namekata I., Tanaka H. Electrophysiological and pharmacological characteristics of triggered activity elicited in guinea-pig pulmonary vein myocardium // *J. Pharmacol. Sci.* – 2011. – V. 115. – № 2. – P. 176-181.
291. Takahara A., Takeda K., Tsuneoka Y., Hagiwara M., Namekata I., Tanaka H. Electrophysiological effects of the class Ic antiarrhythmic drug pilsicainide on the guinea-pig pulmonary vein myocardium // *J. Pharmacol. Sci.* – 2012. – V. 118. – № 4. – P. 506-511.
292. Takino M. Vergleichende Studien über die histologische Struktur der Arteriae und Venae pulmonales, die Blutgefäßnerven der Lunge und die Nerven der Bronchien bei verschiedenen Tierarten, besonders über die Beziehung der Blutgefäßnerven zu den glatten Muskeln der Blutgefäße // *Acta Sch. med. Univ. Kioto.* – 1933. – V. 15. – P. 321–354.
293. Takino M., Ezaki Y. Über die Besonderheiten der Arteriae and Venae pulmonales bei verschiedenen Tieren, besonders beim Menschen // *Acta Schol. Med. Univ. Imper. Kioto.* – 1934. – V. 17. – P. 1-21.
294. Tanaka H., Shimada H., Namekata I., Kawanishi T., Iida-Tanaka N., Shigenobu K. Involvement of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in ouabain-induced inotropy and arrhythmogenesis in guinea-pig myocardium as revealed by SEA0400 // *J. Pharmacol. Sci.* – 2007. – V. 109. – № 2. – P. 241–246.
295. Toshimori H., Nakazato M., Toshimori K., Asai J., Matsukura S., Oura C., Matsuo H. Distribution of atrial natriuretic polypeptide (ANP)-containing cells in the rat heart and pulmonary vein // *Cell. Tissue Res.* – 1988. – V. 251. – P. 541-546.
296. Triedman J.K., Jenkins K.J., Colan S.D., van Praagh R., Lock J.E., Walsh E.P. Multipolar endocardial mapping of the right heart using a basket catheter: acute and chronic animal studies // *Pacing Clin. Electrophysiol.* – 1997. – V. 20. – № 1 Pt 1. – P. 51–59.
297. Tsai W.C., Lee T.I., Chen Y.C., Kao Y.H., Lu Y.Y., Lin Y.K., Chen S.A., Chen Y.J. Testosterone replacement increases aged pulmonary vein and left atrium arrhythmogenesis with enhanced adrenergic activity // *Int. J. Cardiol.* – 2014. – V. 176. – № 1. – P. 110-118.
298. Tsuneoka Y., Irie M., Tanaka Y., Sugimoto T., Kobayashi Y., Kusakabe T., Kato K., Hamaguchi S., Namekata I., Tanaka H. Permissive role of reduced inwardly-rectifying potassium current density in the automaticity of the guinea pig pulmonary vein myocardium // *J. Pharmacol. Sci.* – 2017. – V. 133. – № 4. – P. 195–202.

299. Tsuneoka Y., Kobayashi Y., Honda Y., Namekata I., Tanaka H. Electrical activity of the mouse pulmonary vein myocardium // *J. Pharmacol. Sci.* - 2012. - V. 119. - № 3. - P. 287–292.
300. Umehara S., Tan X., Okamoto Y., Ono K., Noma A., Amano A., Himeno Y. Mechanisms underlying spontaneous action potential generation induced by catecholamine in pulmonary vein cardiomyocytes: a simulation study // *Int. J. Mol. Sci.* - 2019. - V. 20. - № 12. - P. 2913.
301. Van den Berg G., Abu-Issa R., De Boer B.A., Hutson M.R., de Boer P.A.J., Soufan A.T., Ruijter J.M., Kirby M.L., van den Hoff M.J.B., Moorman A.F.M. A caudal proliferating growth center contributes to both poles of the forming heart tube // *Circ. Res.* - 2009. - V. 104. - № 2. - P. 179–188.
302. Van den Berg G., Moorman A.F. Development of the pulmonary vein and the systemic venous sinus: an interactive 3D overview // *PLoS One.* - 2011. - V. 6. - № 7. P. e22055.
303. Verheule S., Wilson E.E., Arora R., Engle S.K., Scott L.R., Olgin J.E. Tissue structure and connexin expression of canine pulmonary veins // *Cardiovasc. Research.* - 2002. - V. 55. - № 4. - P. 727–738.
304. Von Soemmerring S. Vom bau des menschlichen körpers. Bd. IV. Gefäßlehre / Frankfurt am Main: Varrentrapp und Wenner, 1792. - P. 560.
305. Wale J. DE. Epistola ad Casp: Bartholin de motu chyli et sanguinis / 1641.
306. Walsh E.P., Saul J.P., Hulse J.E., Rhodes L.A., Hordof A.J., Mayer J.E., Lock J.E. Transcatheter ablation of ectopic atrial tachycardia in young patients using radiofrequency current // *Circulation.* - 1992. - V. 86. - № 4. - P. 1138–1146.
307. Wang J., Klysik E., Sood S., Johnson R.L., Wehrens X.H. T., Martin J.F. Pitx2 prevents susceptibility to atrial arrhythmias by inhibiting left-sided pacemaker specification // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 2010. - V. 107. - № 21. - P. 9753–9758.
308. Wiener N., Rosenblueth A. The mathematical formulation of the problem of conduction of impulses in a network of connected excitable elements, specifically in cardiac muscle // *Arch. Inst. Cardiol. Mex.* - 1946. - V. 16. - № 3. - P. 205–265.
309. Wiese C., Grieskamp T., Airik R., Mommersteeg M.T.M., Gardiwal A., de Gier-de Vries C., Schuster-Gossler K., Moorman A.F.M., Kispert A., Christoffels V.M. Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3 // *Circ. Res.* - 2009. - V. 104. - № 3. - P. 388–397.
310. Winterberg H. Ueber Herzflimmern und seine Beeinflussung durch Kampher // *Zeitschrift für Experimentelle Pathologie und Therapie.* - 1906. - V. 3. - P. 182–208.

311. Woodcock-Mitchell J., Mitchell J.J., Low R.B., Kienny M., Sengel P., Rubbia L., Skalli O., Jackson B., Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed in embryonic rat cardiac and skeletal muscles // *Differentiation*. – 1988. – V. 39. – № 3. – P. 161–166.
312. Xiao Y., Cai X., Atkinson A., Logantha S.J., Boyett M., Dobrzynski H. Expression of connexin 43, ion channels and Ca²⁺-handling proteins in rat pulmonary vein cardiomyocytes // *Exp. Ther. Med.* – 2016. – V. 12. – № 5. – P. 3233–3241.
313. Yanaga T., Ito M., Saeki K., Arita M., Tanoue M., Mashiba H. Studies on aconitine-induced arrhythmias. I. The ectopic pacemaker formation in the left superior vena cava proximal to the heart and the genesis of cardiac arrhythmias // *Jpn. Heart. J.* – 1966. – V. 7. – № 5. – P. 505-511.
314. Ye W., Wang J., Song Y., Yu D., Sun C., Liu C., Chen F., Zhang Y., Wang F., Harvey R.P., Schrader L., Martin J.F., Ping Chen Y. A Common Shox2–Nkx2-5 antagonistic mechanism primes the pacemaker cell fate in the pulmonary vein myocardium and sinoatrial node // *Dev.* - 2015. - V. 142. - № 14. - P. 2521–32.
315. Yeh H.-I., Lai Y.-J., Lee Y.-N., Chen Y.J., Chen Y.C., Chen C.C., Chen S.A., Lin C.I., Tsai C.H. Differential expression of connexin 43 gap junctions in cardiomyocytes isolated from canine thoracic veins // *J. Histochem. Cytochem.* – 2003. – V. 51. – № 2. – P. 259–266.
316. Younes A., Lyashkov A. E., Graham D., Sheydina A., Volkova M.V., Mitsak M., Vinogradova T.M., Lukyanenko Y.O., Li Y., Ruknudin A.M., Boheler K.R., van Eyk J., Lakatta E.G. Ca²⁺-stimulated basal adenylyl cyclase activity localization in membrane lipid microdomains of cardiac sinoatrial nodal pacemaker cells // *J. Biol. Chem.* – 2008. – V. 283. – № 21. – P. 14461–14468.
317. Yugo D., Chen Y.C., Lin Y.K., Liu C.M., Huang J.H., Chen S.A., Chen Y.J. Effects of phosphodiesterase-1 inhibitor on pulmonary vein electrophysiology and arrhythmogenesis // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2021. – V. 51. – № 9. – P. e13585.
318. Zaffran S., Frasch M. Early signals in cardiac development // *Circ. Res.* – 2002. – V. 91. – № 6. – P. 457–469.
319. Zhou B., Ma Q., Rajagopal S., Wu S.M., Domian I., Rivera-Feliciano J., Jiang D., von Gise A., Ikeda S., Chien K.R., Pu W.T. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart // *Nature*. – 2008. – V. 454. – № 7200. – P. 109–113.
320. Zipes D., Jalife J. *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside* // 4th ed. Philadelphia: Saunders.- 2004.

321. Zrenner B., Ndrepepa G., Schneider M., Karch M., Deisenhofer I., Schreieck J., Schömig A., Schmitt C. Basket catheter-guided three-dimensional activation patterns construction and ablation of common type atrial flutter // *Pacing Clin. Electrophysiol.* – 2000. – V. 23. – № 9. – P. 1350–1358.