

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

**Воронина Яна Алексеевна**

**МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ПРОВЕДЕНИЯ ВОЗБУЖДЕНИЯ И РИТМА  
СЕРДЦА, ОПОСРЕДОВАННЫЕ ПУРИНОВЫМИ P2-РЕЦЕПТОРАМИ И  
АДРЕНOREЦЕПТОРАМИ АЛЬФА -ТИПА**

Специальность – 1.5.5. – Физиология человека и животных

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

**Научный руководитель:** *Кузьмин Владислав Стефанович*  
доктор биологических наук

**Официальные оппоненты:** *Авдонин Павел Владимирович* - доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития РАН, лаборатория физиологии рецепторов и сигнальных систем, заведующий лабораторией  
*Лопатина Екатерина Валентиновна* - доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра физиологии нормальной, заведующий кафедрой  
*Серебряная Дарья Владимировна* - кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедра биохимии, доцент

Защита диссертации состоится 23 декабря 2024 г. в 15:30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.7 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет МГУ, аудитория М-1.

E-mail: [belka.umarova.msu@gmail.com](mailto:belka.umarova.msu@gmail.com)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте Диссовет 2.0: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3203>

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета МГУ.015.7,  
доктор биологических наук

Умарова Б.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

*Актуальность проблемы и степень ее разработанности.* Среди заболеваний сердечно-сосудистой системы одно из первых мест по распространенности занимают нарушения ритма сердца (аритмии), которые часто обусловлены дисфункцией либо доминантного ритмоводителя сердца – синоатриального узла (САУ), либо ключевой структуры проводящей системы сердца – атриовентрикулярного узла (АВУ).

Как САУ, так и АВУ имеют богатую иннервацию, включающую парасимпатический и симпатический компоненты вегетативной нервной системы. Считается, что симпатические эффекты в ритмоводителе сердца и его проводящей системе опосредуются адренорецепторами  $\beta$ -типа ( $\beta$ -АР) и внутриклеточными сигнальными каскадами, сопряженными с этими рецепторами. В то же время известно, что постсинаптические адренорецепторы  $\alpha_1$ -типа ( $\alpha_1$ -АР) также играют важную роль в адренергической регуляции активности различных тканей [O'Connell et al., 2014], не уступая по значимости  $\beta$ -АР. Известно, что  $\alpha_1$ -АР имеют ключевое значение в реализации физиологической гипертрофии кардиомиоцитов рабочего миокарда в ходе постнатального развития и роста сердца, а также в проведении сигналов «выживания», активации системы репарации, ремоделирования метаболизма кардиомиоцитов в условиях гипоксии [Ebert, Taylor, 2006; O'Connell et al., 2014].

Элементы проводящей системы сердца – АВУ и волокна Пуркинье обладают автоматией, которая может проявляться в виде проаритмической «внеузловой» активности при определенных условиях, в том числе при адренергической стимуляции. Поиск способов предотвращения, а также выяснение механизмов такой патологической активности являются важной задачей. Выявление электрофизиологических эффектов активации  $\alpha_1$ -АР в САУ и АВУ, а также внутриклеточных мишеней  $\alpha$ -адренергической сигнализации в пейсмекерных кардиомиоцитах сердца может помочь в решении этой проблемы.

Активация симпатических постганглионарных окончаний помимо выделения основного нейромедиатора, норадреналина, сопровождается высвобождением целого ряда комедиаторов. Пуриновые комедиаторы симпатической нейротрансмиссии, АТФ и НАД<sup>+</sup>, в наибольшей степени дополняют и модифицируют адренергические эффекты при симпатической нейротрансмиссии, тем самым изменяя характер клеточного ответа на симпатическую стимуляцию [Pustovit et al., 2019; Пустовит К.Б., Иванова А.Д., Кузьмин В.С., 2018].

Показано, что АТФ высвобождается как нервными окончаниями в сердце, так и миокардиальными клетками сердца; во всех отделах сердца экспрессируются различные типы пуриновых рецепторов, и пуринергическая система вносит значительный вклад в опосредованную вегетативной иннервацией регуляцию работы сердца. Нуклеотидные комедиаторы принимают участие в контроле электрической и сократительной активности рабочего миокарда предсердий и желудочков, могут модулировать эктопическую аритмогенную активность в миокардиальной ткани легочных вен, а также оказывать значительное влияние на автоматию САУ и проведение возбуждения в АВУ [Kuzmin, Pustovit, Abramochkin, 2016; Pakhomov et al., 2017; Pustovit et al., 2019; Pustovit, Abramochkin, 2016]. Известно, что эффекты пуриновых комедиаторов в сердце и сосудах преимущественно реализуются посредством активации пуриновых рецепторов P2-типа [Burnstock, Pelleg, 2015]. Однако остается неизученным, какие типы P2-рецепторов обуславливают эффекты пуриновых комедиаторов в кардиомиоцитах САУ и АВУ. Кроме

того, крайне мало сведений имеется об основных молекулярных мишенях сигнальных каскадов P2-рецепторов в кардиомиоцитах САУ и АВУ. Остается также неизвестным, являются ли эти мишени, ионные каналы и трансмембранные переносчики, общими для сигнализации, реализуемой P2-рецепторами и рецепторами других типов, например,  $\alpha_1$ -АР.

К настоящему времени накапливаются сведения, согласно которым механизм реализации  $\alpha_1$ -адренергических эффектов в гладкомышечных клетках и в ряде тканей другого типа обусловлен усилением хлорной трансмембранной проводимости, активацией хлорных ионных каналов и трансмембранных переносчиков хлора [Gould, Hill, 1996]. Однако роль хлорной проводимости в контроле электрофизиологических свойств кардиомиоцитов ритмоводителя и проводящей системы сердца практически не известна. Также не исследован вклад хлорной трансмембранной проводимости в реализацию  $\alpha_1$ -адренергических эффектов в САУ и АВУ.

Сведения об уровне цитоплазматического хлора ( $[Cl^-]_i$ ), одного из основных потенциалобразующих ионов в клетках пейсмекера и проводящей системы сердца, крайне противоречивы.  $[Cl^-]_i$  имеет важное значение, поскольку определяет величину и направление хлорных трансмембранных токов. Известно несколько молекулярных механизмов, определяющих  $[Cl^-]_i$ . Считается, что в наибольшей степени в возбудимых тканях  $[Cl^-]_i$  задается соотношением экспрессии и активности трансмембранных катион-хлорных котранспортеров КСС и НКСС. Показано, что эти два переносчика подвержены реципрокной регуляции со стороны  $\alpha_1$ -адренорецепторов [Modi et al., 2023]. Экспрессия вышеуказанных транспортеров, их роль в регуляции электрической активности пейсмекерной ткани сердца, а также вовлеченность в реализацию  $\alpha_1$ -адренергических эффектов в САУ практически не изучена.

К настоящему времени показано, что трансмембранные хлорные каналы и токи ( $I_{Cl}$ ) являются факторами, которые оказывают значительное влияние на электрофизиологические свойства миокарда. В последние годы идентифицирован целый ряд трансмембранных белков, демонстрирующих хлорную проводимость (CFTR, ClC, TMEM16, LRRC8), а также подтверждена экспрессия этих макромолекул в ткани сердца [Duan, 2009]. Накопленные данные позволяют установить молекулярный субстрат для некоторых хлорных анионных токов ( $I_{Cl, PKA}$ ,  $I_{Cl, ir}$ ,  $I_{Cl, vol}$ ,  $I_{Cl, swell}$ ,  $I_{Cl, Ca}$ ,  $I_{Cl2}$ ), обнаруживаемых в сердце [Duan, 2013]. Кроме того, установлены молекулярные механизмы регуляции  $[Cl^-]_i$  и равновесного хлорного потенциала ( $E_{Cl}$ ) посредством хлорных котранспортеров (КСС, НКСС1) и хлор-бикарбонатных обменников [Modi et al., 2023]. Известно, что профиль экспрессии хлорных трансмембранных переносчиков определяется балансом продукции таких транскрипционных факторов кардиомиоцитов как Nkx2.5/GATA4, Shox, TBX3, 5, 18, 20, GATA [Duran et al., 2009]. Тем не менее, особенности хлорного трансмембранного переноса, различия и вклад хлорной проводимости в биоэлектрическую активность САУ и АВУ практически не выяснены.

Цель терапии нарушений сердечного ритма заключается не только в подавлении эктопической автоматии или в восстановлении проведения возбуждения в отдельных структурах, но и в восстановлении скоординированной работы сердца для удовлетворения гемодинамических потребностей организма. В связи с этим актуальной проблемой является изучение особенностей, отличий и молекулярных механизмов, обуславливающих симпатический контроль электрофизиологических свойств САУ и АВУ сердца. Также крайне актуальным с фундаментальной и прикладной точки зрения является выяснение

конечных мишеней сигнальных каскадов адренорецепторов миоцитов проводящей системы сердца, поскольку это позволит разработать новые или сделать более безопасными и эффективными имеющиеся подходы к фармакологической терапии дисфункции САУ и АВУ.

Таким образом, накопленные к настоящему моменту знания позволяют обосновать фундаментальную значимость и актуальность исследования роли  $\alpha_1$ -адренергической и сопряженной с ней P2-пуринергической сигнализации в реализации физиологической функции ключевыми элементами проводящей системы сердца – САУ и АВУ.

*Целью данной работы* является изучение механизмов модуляции биоэлектрической активности синоатриального и атриовентрикулярного узла сердца, обусловленных активацией  $\alpha_1$ -адренорецепторов или P2-пуриновых рецепторов и выяснение роли трансмембранного транспорта хлорид-анионов в реализации эффектов активации  $\alpha_1$ - и P2-рецепторов.

*В соответствии с целью поставлены следующие задачи:*

1. Установить уровень экспрессии  $\alpha_1$ -адренорецепторов и P2-пуринорецепторов в САУ и АВУ на уровне мРНК или белка.
2. Оценить в САУ и АВУ уровень мРНК хлорных ионных каналов и трансмембранных переносчиков хлора как потенциальных мишеней сигнальных каскадов  $\alpha_1$ -адренорецепторов и P2-пуринорецепторов.
3. Выявить и сопоставить эффекты, наблюдаемые при активации  $\alpha_1$ -адренорецепторов в САУ и АВУ.
4. Выявить и сопоставить эффекты, наблюдаемые при активации P2-рецепторов пуриновыми комедиаторами симпатической нейротрансмиссии в САУ и АВУ.
5. Исследовать роль мембранных хлорных ионных каналов в реализации биоэлектрической активности САУ и АВУ, а также эффектов, наблюдаемых при стимуляции  $\alpha_1$ -адренорецепторов в САУ и АВУ.
6. Изучить вовлеченность катион-хлорных трансмембранных симпортеров в реализацию эффектов, наблюдаемых при стимуляции  $\alpha_1$ -адренорецепторов в САУ.

*Научная новизна исследования.* (1) Впервые проведена оценка уровня мРНК  $\alpha_{1A}$ -АР, а также выявлена локализация  $\alpha_{1A}$ -АР в кардиомиоцитах в ткани САУ и АВУ. (2) Впервые проведено комплексное исследование эффектов активации  $\alpha_1$ -АР, а также молекулярных механизмов, лежащих в основе эффектов активации  $\alpha_1$ -АР в САУ и АВУ. (3) Впервые проведена оценка количества зрелой мРНК хлорных ионных каналов и переносчиков в предсердном миокарде, а также миокардиальной ткани САУ и АВУ. Полученные сведения впервые позволили подтвердить наличие молекулярного субстрата, обуславливающего эффекты  $\alpha$ -адренергической стимуляции в ритмоводителе и проводящей системе сердца. (4) Впервые установлено значение внутриклеточной концентрации ионов хлора в миокарде предсердия и САУ. (5) Впервые проведена оценка уровня мРНК пуриновых P2-рецепторов, а также сопоставлены эффекты активации агонистов пуриновых P2-рецепторов в САУ и АВУ. (6) Впервые продемонстрировано сходство эффектов активации P2-рецепторов в АВУ сердца, на основе чего предложена гипотеза о сходстве конечных молекулярных мишеней сигнальных каскадов этих рецепторов. (7) Установлено, что катион-хлорные котранспортеры вовлечены в контроль автоматической активности САУ и их активность может модулироваться при стимуляции  $\alpha_1$ -АР.

**Теоретическая и практическая значимость исследования.** Описанные в работе феномены позволили выдвинуть гипотезу о фундаментальной роли  $\alpha_1$ -АР в проводящей системе сердца, согласно которой  $\alpha_1$ -АР способствуют координации электрофизиологических свойств пейсмекеров за счет разнонаправленного характера  $\alpha$ -адренергических эффектов в САУ и АВУ («облегчение» и подавление проведения возбуждения, соответственно) при высокой частоте сердечных сокращений. Выявлены новые закономерности формирования биоэлектрической активности доминантного ритмоводителя сердца, установлено значение хлорной анионной проводимости для реализации естественной пейсмекерной функции САУ, а также установлены кандидаты на роль каналоподобных трансмембранных молекул, обуславливающих хлорную проводимость в пейсмекерных структурах сердца. В работе установлена вовлеченность хлорного трансмембранного переноса в опосредовании  $\alpha$ -адренергических эффектов.

Практическая значимость настоящей работы связана с неуклонным ростом встречаемости в популяции нарушений ритма сердца, таких как синдром слабости синусного узла, атриовентрикулярные брадиаритмии и блокады. С прикладной точки зрения результаты работы открывают возможность поиска способов терапии вышеуказанных патологий с помощью воздействия на отдельные популяции  $\alpha_1$ -адренорецепторов сердца. Результаты данной работы также способствуют поиску фармакологических средств, мишенями которых могут быть хлорные ионные каналы и транспортеры сердца.

**Методология и методы исследования.** Для решения поставленных в работе задач использовано несколько методических подходов. Электрофизиологические методы включают (1) регистрацию внутриклеточной биоэлектрической активности перфузируемых многоклеточных тканевых препаратов АВУ с использованием стандартной микроэлектродной техники; (2) метод оптического картирования хронотопографии возбуждения в САУ, основанный на применении потенциал-чувствительного флуоресцентного красителя di-4-ANNEPS, (3) метод регистрации электрограмм (ЭГ) с поверхности изолированного перфузируемого по Лангендорфу сердца (ИС), а также (4) *in vivo* метод регистрации ЭКГ у наркотизированных животных. В сочетании с электрофизиологическими методами применен подход с перфузией тканевых препаратов гипо- и гиперосмотическим растворами, а также фармакологический анализ для выяснения роли и типов (анионной) хлорной проводимости, участвующих в формировании электрической активности и автоматии САУ и АВУ. В работе использована (5) иммунофлуоресцентная конфокальная микроскопия. Методы (6) полимеразной цепной реакции в реальном времени (РВ-ПЦР) и (7) РНК-секвенирования использовали для оценки уровня транскриптов ключевых белков, определяющих анионный трансмембранный транспорт,  $\alpha_1$ -адренергический и пуриновый сигналинг в кардиомиоцитах. Иммунофлуоресцентную микроскопию использовали для идентификации в криосрезах САУ и элементов проводящей системы сердца  $\alpha_{1A}$ -АР с помощью специфических антител. Кроме того, в работе использован подход, основанный на (8) флуоресцентной визуализации колебания  $[Cl^-]_i$  в многоклеточных тканевых препаратах САУ с помощью зонда MQAE. Для оценки  $[Cl^-]_i$  в многоклеточных препаратах использовали (9) меркуриметрический метод.

Эксперименты выполнены на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова, в лаборатории электрофизиологии сердца института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ Кардиологии имени ак. Е. И.

Чазова»; часть иммунофлуоресцентных исследований проведена на кафедре нормальной физиологии МБФ РНИМУ имени Н. И. Пирогова.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. В синоатриальном, а также в атриовентрикулярном узлах сердца экспрессируются  $\alpha_1$ -адренорецепторы и P2-рецепторы.
2. В ткани синоатриального и атриовентрикулярного узлов на уровне мРНК показана экспрессия генов, кодирующих хлорные ионные каналы и катион-хлорные симпортеры.
3. Активация  $\alpha_1$ -адренорецепторов способствует поддержанию пейсмекерной функции САУ. Активация  $\alpha_1$ -адренорецепторов АВУ приводит к подавлению проведения возбуждения, что способствует возникновению АВ-узловых аритмий. Таким образом, эффекты активации  $\alpha_1$ -адренорецепторов в САУ и АВУ разнонаправлены.
4. Активация пуриновых рецепторов P2-типа сопровождается совокупностью эффектов, приводящих к подавлению пейсмекерной активности САУ и проведения возбуждения в АВУ. Активация P2-рецепторов в САУ и АВУ приводит к сходным изменениям биоэлектрических свойств.
5. Хлорная трансмембранная проводимость вовлечена в реализацию функций САУ и АВУ. Подавление хлорной проводимости способствует уменьшению выраженности эффектов, сопровождающих активацию  $\alpha_1$ -адренорецепторов в САУ, но не в АВУ.
6. Катион-хлорные симпортеры вовлечены в контроль автоматии САУ. Активация  $\alpha_1$ -адренорецепторов приводит к изменению функционирования катион-хлорных трансмембранных симпортеров САУ.

**Степень достоверности данных.** Представленные в работе данные получены с использованием современных общепринятых экспериментальных методик, результаты, представленные в работе, статистически достоверны и воспроизводимы. Обзор литературы и обсуждение подготовлены с использованием актуальной тематической литературы.

**Публикации.** По результатам работы опубликовано 15 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, индексируемых RSCI, Web of Science, Scopus.

**Апробация результатов.** Результаты данной диссертационной работы были представлены на следующих всероссийских и международных конференциях и съездах: 12-я международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, Россия, 22-26 мая 2023), Ежегодная Всероссийская научно-практическая конференция «Кардиология на марше» (Москва, Россия, 7 июня 2023), XXIV Съезд Физиологического общества им. И.П.Павлова (Санкт-Петербург, Россия, 11-15 сентября 2023), IV Всероссийская молодежная школа-конференция «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций» (ЗБС МГУ, Россия, 15-17 сентября 2023), VII Международный конгресс, посвященный А.Ф. Самойлову «Фундаментальная и клиническая электрофизиология. актуальные вопросы современной медицины» (Казань, Россия, 4-7 апреля 2024), Всероссийская конференция «Математика. Компьютер. Образование» (Дубна, Россия, 22-27 января 2024), Всероссийский научный мини-симпозиум «Ионные каналы сердечно-сосудистой системы в норме и патологии» (Москва, Россия, 18-21 сентября 2024), 4-я Международная конференция «Врач-Пациент-Общество» (Екатеринбург, Россия, 24-25 октября 2024). Диссертационная работа апробирована на заседании кафедры человека и животных Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова 8 октября 2024 года.

**Личный вклад автора.** Соискатель лично принимал участие 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, электрофизиологических *in vivo* и *ex vivo* экспериментов, анализ данных, статистическую обработку и обобщение результатов, написание статей и тезисов, представление результатов работы на российских и международных конференциях.

**Структура работы.** Материалы диссертационной работы изложены на 175 странице. Работа состоит из обзора литературы по выбранной теме, описания материалов и методов, использованных при выполнении данной работы, описания результатов и их обсуждения, заключения, а также выводов. Диссертационная работа проиллюстрирована 53 рисунками и 9 таблицами. Список использованной литературы включает 265 источников.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Животные.** В работе было использовано 295 самцов крыс стока Wistar (2-4 мес,  $250 \pm 30$  г) (иммунофлуоресцентная микроскопия –  $n = 10$ , количественная оценка мРНК методом РВ-ПЦР –  $n = 18$ , РНК-секвенирование –  $n = 6$ , функциональные эксперименты с ИС –  $n = 124$ , оптическое картирование –  $n = 51$ , ЭКГ –  $n = 34$ , регистрация биоэлектрической активности с помощью микроэлектродной техники –  $n = 34$ , метод визуализации колебаний концентрации внутриклеточных ионов хлора –  $n = 18$ ). Количество образцов соответствует количеству животных.

**Получение препаратов рабочего миокарда и различных отделов проводящей системы сердца крысы.** После эвтаназии предварительно гепаринизированным (1000 ед./кг, внутрибрюшинно в 0,2-0,4 мл физ. раствора) животным вскрывали грудную клетку, извлекали сердце, которое помещали в емкость с перфузионным раствором. Для вытеснения крови из коронарных сосудов предсердий и желудочков в аорту вводили канюлю, соединенную со шприцем с перфузионным раствором, которым промывали сердце. Для выделения препаратов САУ вырезали стенку правого предсердия с ушком, вскрывали верхнюю и нижнюю полые вены, раскрывая препарат таким образом, чтобы эндокардиальная поверхность была доступна. Для получения препаратов АВУ с помощью апикобазальных разрезов вскрывали правые предсердие и желудочек, отсекали все участки предсердного и желудочкового миокарда за исключением полосок ткани шириной 2-3 мм, прилегающих к анетриолатеральному и септоллатеральному лепесткам трикуспидального клапана. Полученные препараты помещали в перфузионную камеру с насыщенным карбогеном раствором Тироде при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ .

**Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии белков в рабочем миокарде и в проводящей системе сердца крысы.** Тканевые образцы замораживали в жидком азоте в криосреде Tissue-Tek O.C.T. Compound. Срезы толщиной 10 мкм изготавливали на криотоме Leica CM1850UV. После отмывки в PBS срезы инкубировали с 10% козьей сывороткой (ПраймБиоМед, Россия) на PBS. Затем срезы промывали раствором PBS и дистиллированной водой. Для окрашивания срезы инкубировали 60 мин при комнатной температуре с кроличьими поликлональными антителами к  $\alpha_{1A}$ -АР (Thermo Fisher Scientific, PA1-047, США разведенными 1:100 на PBS с 1% БСА). После отмывки в PBS срезы в

течение 40 минут инкубировали в темноте со вторичными козьими антителами (Thermo Fisher Scientific, A-11036, США, 1:500), конъюгированными с Alexa Fluor 568 и растворенными в PBS с 1% БСА. Препараты заключали в среду Aqua-Poly и анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия). Для возбуждения флуоресценции антител использовали диодный лазер с длиной волны 555 нм. При визуализации получали стековые изображения в конфокальном режиме, которые затем с помощью программного обеспечения Carl Zeiss ZEN 7.0 преобразовывали в «однослойные» проекции, построенные по максимальным интенсивностям флуоресценции. Анализ изображений, включающий идентификацию областей специфической флуоресценции, осуществляли в программе ImageJ (ImageJ 1.50i).

**Оценка уровня целевых мРНК в рабочем миокарде и в проводящей системе сердца крысы методом РВ-ПЦР.** Тотальную РНК выделяли из препаратов левого предсердия (ЛП), САУ и АВУ с использованием ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя. Образцы гомогенизировали с использованием стерильных пестиков (Ахуген, США). Тотальную РНК очищали при помощи хлороформа (15 мин. -4°C, 12000 g), отбирали супернатант. Тотальную РНК осаждали 96% этанолом (20 минут инкубации, -20°C). Затем раствор центрифугировали (10 мин. при 4°C, 12000 g). Осажденную РНК растворяли в деионизированной воде, свободной от нуклеаз (Евроген, Россия). Далее раствор тотальной РНК обрабатывали ДНКазой RNase-free DNase I kit (2000 е.а./мл, NEB, США) в соответствии с инструкцией производителя. Количество и качество осажденной РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). Библиотеку кДНК синтезировали с помощью ревертазы MMLV (Евроген, Россия). Уровень экспрессии целевых генов оценивали с помощью РВ-ПЦР с использованием амплификатора BioRad CFX96 real-time PCR detection system (США). Использовали готовую смесь для ПЦР 5X qPCRmix-HS SYBR с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green (Евроген, Россия).

В качестве гена «домашнего хозяйства» использовали *Rplp0* (ribosomal protein lateral stalk subunit P0). Экспрессия *Rplp0* не различалась ( $p > 0.05$ ) между образцами. Каждая реакция проводилась в трех повторностях. В качестве контроля на отсутствие геномной ДНК в образцах вместо комплементарной ДНК, как матрицу для ПЦР, использовали образец РНК. В работе определяли относительный уровень мРНК следующих генов: *Adra1a* (adrenocceptor alpha 1A), *Cftr* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), *Clcn2* (chloride channel 2), *Clcn3* (chloride channel 3), *Tmem16a* (transmembrane member 16A), *Lrrc8a* (leucine rich repeat containing 8 VRAC subunit A), *Slc12a4* (solute carrier family 12 member 4) и *Slc12a2* (solute carrier family 12 member 2). Относительный уровень экспрессии генов был определен с использованием метода « $\Delta\Delta Ct$ » с учётом эффективности праймеров.

**Оценка уровня экспрессии целевых генов методом РНК-секвенирования.** Тотальную РНК выделяли из ткани при помощи TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) и набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) согласно протоколу к этому набору. К выделенной РНК добавляли ингибитор активности РНКаз RiboLock (Thermo Fisher Scientific, USA). Количество выделенной РНК измеряли при помощи набора Qubit RNA Broad Range (Thermo Fisher Scientific, USA). Приготовление библиотек осуществляли набором RNA-seq Library Prep Kit for Illumina (Vazyme, China). Концентрацию библиотек измеряли при помощи набора SpectraQ HS (Raissol, Россия). Секвенирование проводили с использованием набора SURFSeq 5000 Sequencing Kit V1.0 FCH 300cycles (GeneMind,

China). Полученные библиотеки были объединены по принципу эквимоллярности. Оценка качества ридов проводили при помощи FastQC. Удаление адаптеров проводили с использованием Cutadapt v. 4.9 [Martin, 2011]. Чтения были картированы на геном *Rattus norvegicus* с использованием программы STAR [Dobin и др., 2013]. В качестве эталонного генома и аннотационной информации по генам использовались файлы fasta и gtf mRatBN7.2, полученные из базы данных Ensemble (<https://www.ensembl.org>). Количественные значения для каждого гена были определены по результатам выравнивания с помощью программы featureCounts [Liao, Smyth, Shi, 2014]. Нормализация, оценка дисперсии, тестирование на дифференциальную экспрессию и коррекция на множественные сравнения проводилась при помощи DESeq2 [Love, Huber, Anders, 2014]. Величину экспрессии выражали в виде логарифма по основанию 2 ( $\log_2FC$ ) возрастания или убывания экспрессии в САУ или АБУ по сравнению с левым предсердием.

**Регистрация частоты сердечных сокращений и ЭКГ у наркотизированных крыс.** Животных анестезировали смесью изофлурана и кислорода в концентрации 2,5% при помощи испарителя VIP 3000 (MidMark, США). Температуру тела животных поддерживали с использованием термоконтроллера Bio-TC1 (НПФ «Биотехнологии», Россия). Запись ЭКГ проводили с помощью усилителя PL3516 Power Lab 16/35 Animal Bio Amp (ADInstruments, США). Поверхностные записывающие электроды размещали на предварительно депилированных участках тела крыс таким образом, чтобы получаемый сигнал соответствовал II отведению по Эйнтховену у человека. Регистрируемый сигнал визуализировали и обрабатывали с использованием компьютерной программы Lab Chart Pro (ADInstruments, США). Оценивали частоту сердечных сокращений (ЧСС) и длительность PR-интервалов.

**Оценка функции проводящей системы в ИС крысы.** Для оценки функции проводящей системы сердца крысы использовали стандартный метод перфузии изолированного по Лангендорфу сердца (при постоянном перфузионном давлении - 80 мм рт. ст.). Осуществляли ретроградную перфузию изолированного сердца стандартным раствором Кребса-Хензелята при температуре 37°C. Для регистрации ЭГ САУ с помощью дифференциального усилителя (Нейробиолаб, NBL302, Россия) регистрирующие электроды помещали на поверхность ушка правого предсердия, а для ЭГ АБУ на поверхность левых предсердия и желудочка; усиленный и отфильтрованный сигнал записывали с помощью подключенного к компьютеру аналого-цифрового преобразователя (АЦП, 5 КГц, E-154, L-Card, Россия); для обработки ЭГ использовали программное обеспечение PowerGraph 3.3 (Ди-софт, Россия).

После периода адаптации (10 минут) в начале эксперимента определяли длительность интервалов между возбуждениями, спонтанно генерируемыми САУ, а также величину атриовентрикулярной задержки (АВЗ). С помощью стимулирующих электродов с частотой на 10% превышающей «синусный» ритм ( $180 \pm 20$  мс) в течение 5 мин наносили возбуждающие стимулы в САУ (длительность – 2 мс, амплитуда – 2-6 В) для подавления его автоматизма. Далее в течение 30 с периода производили стимуляцию САУ с межстимульными интервалами 280-90 мс (шаг 2-10 мс). По окончании каждого 30 с периода прекращали стимуляцию и в течение 1 мин регистрировали спонтанную активность САУ. Для каждого из межстимульных интервалов рассчитывали время восстановления функции синусного узла (ВВФСУ), которое определяли как длительность периода от последнего возбуждающего стимула до первого спонтанного возбуждения САУ,

нормированную на значение межстимульного интервала. Корригированное время восстановления функции синусного узла (кВВФСУ) рассчитывали, как разницу между ВВФСУ и исходным спонтанным ритмом САУ. В качестве функциональных характеристик АВУ оценивали длительность АВЗ, длительность эффективного рефрактерного периода (ЭРП) АВУ, а также встречаемость блоков проведения в АВУ. Величину АВЗ определяли как разницу между моментом возникновения предсердного и желудочкового кардиоцикла, а длительность ЭРП как наибольший межстимульный интервал, при котором возбуждение желудочков происходит в ответ на каждый второй очередной возбуждающий стимул.

**Оптическое картирование хронотопографии возбуждения в тканевых препаратах САУ.** Для насыщения тканевых препаратов правого предсердия крысы потенциал-зависимым мембранным зондом di-4-ANNEPS (Sigma-Aldrich, США) проводили их перфузию раствором Тироде, содержащим 5  $\mu\text{M}$  di-4-ANNEPS. Флуоресценцию зонда возбуждали светодиодами 470 нм и регистрировали с помощью высокочувствительной фотодиодной матрицы H469V-012 (WuTech H-469V, Gaithersburg, MD, USA). Для разделения возбуждающего света и эмиссии использовали красный фильтр (пропускание  $> 610$  нм), помещенный на входе фотодиодной матрицы. Флуоресценцию препаратов регистрировали с интервалами 0.61 мс в течение 1000 мс, получая записи, включающие не менее трех циклов возбуждения препарата. Сигналы от всех фотодиодов матрицы поступали на АЦП, регистрацию и обработку сигнала осуществляли при помощи программы Cadrioplex (RedShirtImaging, США). В результате прослеживания изменения уровня флуоресценции во времени по каждому фотодиоду матрицы получали оптические сигналы, соответствующие ПД. На основе оптических сигналов строили изохронные карты, отражающие моменты одновременной активации в картируемой области. Далее определяли площадь и положение точки первичной активации (ТПА) в САУ, а также преимущественное направление распространения волны возбуждения из ТПА. Площадь ТПА рассчитывали, как площадь миокарда, охваченного возбуждением в первые 2 мс после его инициации.

**Меркуриметрический для оценки цитоплазматической концентрации хлора в многоклеточных тканевых препаратах.** Для оценки внутриклеточной концентрации хлора в тканевых препаратах ЛПП и САУ выделяли многоклеточные препараты. После чего из образцов удаляли внеклеточный хлор путем их перфузии сульфатом магния. Затем препараты помещали в пробирку с серной кислотой (96%, ОСЧ) для последующего анализа с помощью меркуриметрического метода согласно руководству «Методика выполнения измерений массовой концентрации хлорид-ионов в пробах природных и очищенных сточных вод меркуриметрическим методом», утвержденным Государственным комитетом РФ по охране окружающей среды (ПНДФ 14.1:2.111-97, Москва, 2004 г.). Меркуриметрический метод определения массовой концентрации хлорид-ионов основан на взаимодействии хлорид-ионов с ионами ртути (раствор нитрата ртути) с образованием малодиссоциированного соединения хлорида ртути. Избыток ионов ртути (II) при  $\text{pH} = 2.5 \pm 0.2$  образует с индикатором дифенилкарбазоном окрашенное в фиолетовый цвет комплексное соединение, при появлении которого прекращают титрование.

**Визуализация и анализ колебаний внутриклеточной концентрации ионов хлора в многоклеточных тканевых препаратах, включающих САУ крысы.** Для анализа колебаний  $[\text{Cl}]_i$  в препарате САУ использовали метод, основанный на регистрации  $\text{Cl}^-$ -зависимой флуоресценции зонда MQAE, интенсивность которой обратно

пропорциональна  $[Ca^{2+}]_i$ . Для насыщения зондом тканевые препараты, включающие САУ, перфузировали в течение 30 мин раствором Тироде, содержащим 1 мМ MQAE. Для возбуждения флуоресценции MQAE использовали источник возбуждающего света с длиной волны 350 нм. Для регистрации флуоресценции использовали зеленый фильтр с длиной волны отсечения  $>480$  нм. Флуоресцентные сигналы регистрировали с помощью высокочувствительной CCD камеры (M-Shot, MS60-2, Китай). Анализ флуоресцентных сигналов осуществляли с использованием программы ImageJ (ImageJ 1.50i).

**Статистическая обработка.** Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Статистически значимые различия между группами выявляли с помощью t-теста (при нормальном распределении выборки), критерия Mann-Whitney (при распределении выборки не соответствующем нормальному), однофакторной и двухфакторной ANOVA (с последующим применением апостериорных тестов для множественных сравнений в группах с повторными или независимыми, а также внесением поправки Tukey и Sidak) после предварительной проверки нормальности распределения в группах с помощью теста Шапиро-Вилка. Различия считали значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

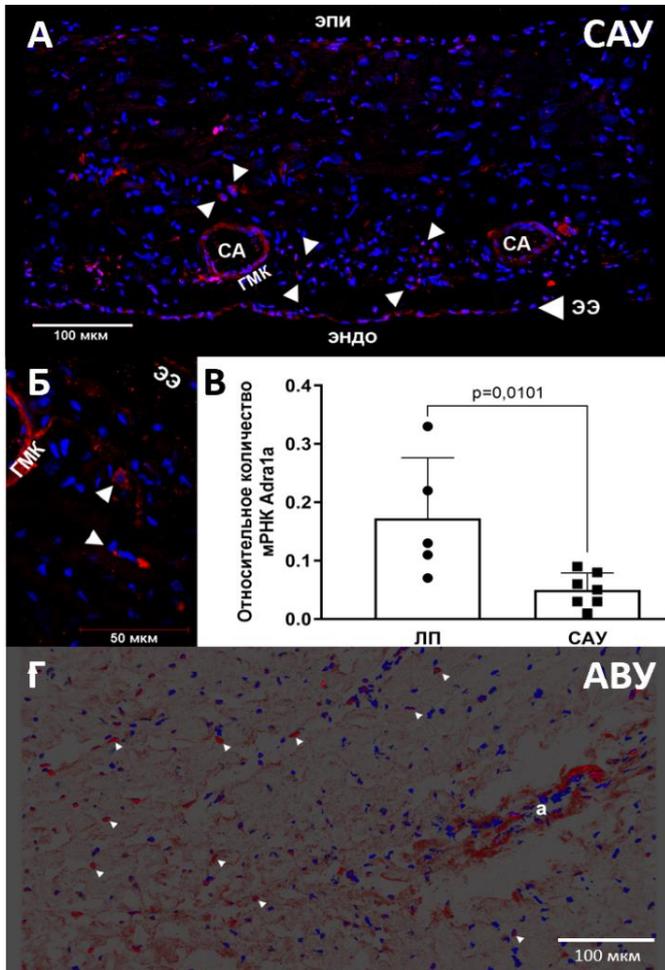
### Экспрессия и локализация $\alpha_1$ -АР проводящей системы сердца

В центральной части САУ в зоне бифуркации артерии синусного узла обнаруживаются флуоресцентные сигналы, указывающие на присутствие  $\alpha_{1A}$ -АР во всех образцах ( $n = 5$ ) (Рис. 1 А-Б). Иммунофлуоресцентное исследование экспрессии  $\alpha_{1A}$ -АР позволило установить, что сигналы, соответствующие этим рецепторам, обнаруживаются не только на периферии, но и в перинуклеарной области отдельных мелких клеток, расположенных в основании ветвей артерии САУ, то есть в том участке правого предсердия, где находится пейсмекерный миокард. Флуоресцентные сигналы  $\alpha_1$ -АР области ядра клеток САУ и АВУ соответствуют кластерам так называемых ядерных  $\alpha_1$ -АР. Характер флуоресцентных сигналов указывает на локализацию  $\alpha_{1A}$ -АР именно в пейсмекерных кардиомиоцитах. Кроме того, методами РВ-ПЦР ( $n=6$ ) (Рис. 1 В) и РНК-секвенирования ( $n=3$ ) в САУ обнаруживается мРНК  $\alpha_{1A}$ -АР (Рис. 2), хоть и в меньшем количестве по сравнению с предсердным миокардом ( $\log_2FC = -0.57$ ,  $p = 0.03$ ). Бóльший относительный уровень мРНК  $\alpha_{1A}$ -АР в ЛП по сравнению с САУ связан с его клеточной гетерогенностью и меньшим размером кардиомиоцитов. В тканевых препаратах АВУ  $\alpha_{1A}$ -АР также обнаруживаются как на уровне белка ( $n=5$ ) (Рис. 1 Г), так и на уровне мРНК ( $\log_2FC = 0.86$  по сравнению с ЛП).

### Эффекты активации $\alpha_{1A}$ -адренорецепторов в САУ и их физиологическая роль в функционировании сердечно-сосудистой системы

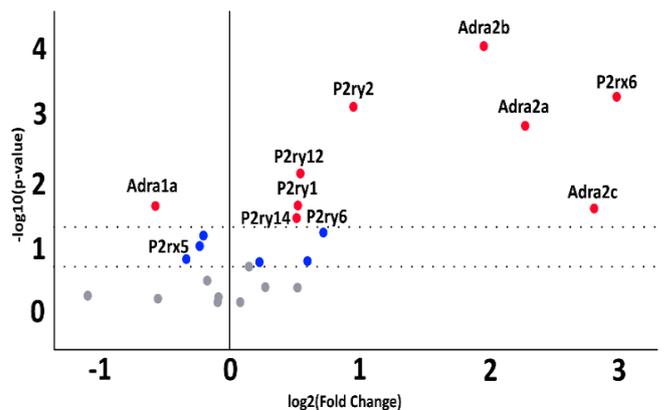
Активация  $\alpha_1$ -АР селективным агонистом фенилэфрином (ФЭ) приводит к увеличению ритма изолированного сердца крысы (до  $5.19 \pm 0.85$  Гц от  $4.25 \pm 0.52$  Гц) (Рис. 3 А) и частоты СПД в тканевых препаратах САУ (на  $26.0 \pm 7.1\%$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0.01$ ). Таким образом, по меньшей мере у крыс, активация  $\alpha_1$ -АР приводит к положительному хронотропному эффекту. Этот эффект сопровождается смещением точки первичной активации в САУ в направлении устья верхней полой вены (величина смещения —  $2.4 \pm 0.1$  мм,  $n = 6$ ) (Рис. 3 В-Д), что является одним из механизмов регуляции ритма сердца.

При действии ФЭ наблюдается значительное увеличение площади зоны первичной активации в САУ: от  $0.15 \pm 0.01 \text{ мм}^2$  в контроле до  $0.25 \pm 0.01 \text{ мм}^2$  при действии ФЭ ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ) (Рис. 3 Д-Е), что приводит к уменьшению времени, необходимого для поведения волны возбуждения из центральной части ритмоводителя сердца к рабочему миокарду предсердий. Такой эффект приводит к более ранней активации рабочего миокарда, небольшому уменьшению длительности кардиоцикла и, вероятно, к повышению ЧСС *in vivo*. Помимо влияния на ЧСС такое увеличение способствует повышению надежности генерации ритма и передачи возбуждения из центральной части САУ в рабочий миокард.



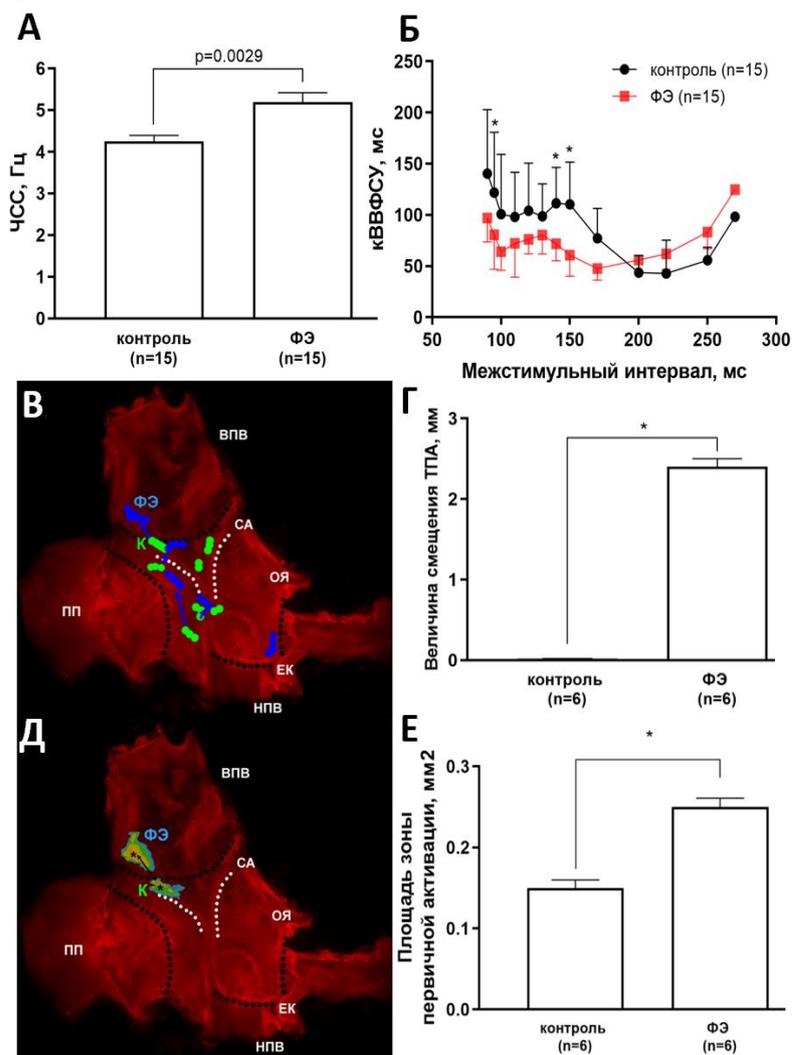
**Рис. 1.** Экспрессия  $\alpha_1$ -адренорецепторов в миокарде синоатриального (САУ) и атриовентрикулярного узла (АВУ) крысы. А, Б, В – Репрезентативные конфокальные изображения области САУ (А-Б) и АВУ (В), демонстрирующие флуоресцентные сигналы (красный псевдоцвет, Су3) антител, специфически связывающих  $\alpha_{1A}$ -АР (белые стрелки). Эндо, эпи – эндокардиальная и эпикардиальная поверхность стенки правого предсердия; ЭЭ – эндокардиальный эндотелий; СА – ветви артерии САУ; ГМК, а – гладкомышечная обкладка артериальной стенки. Синий псевдоцвет – клеточные ядра (DAPI). В – Относительный уровень мРНК  $\alpha_1$ -АР в миокарде левого предсердия (ЛП) и миокарде САУ.

**Рис. 2.** Диаграмма дифференциально экспрессированных генов  $\alpha$ -адренорецепторов и P2-пуриновых рецепторов (volcano plots) в препаратах САУ по отношению к препаратам левого предсердия. Красным цветом представлены гены, для которых различия достоверны ( $p < 0.05$ ). Синим цветом представлены гены, для которых  $0.05 < p < 0.2$ . Wald test.



Кроме того, ФЭ приводит к уменьшению кВВФСУ при электрической стимуляции с высокой частотой (интервалы между импульсами  $< 150 \text{ мс}$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 6$ ) (Рис. 3 Б), а также к снижению зависимости аккомодации САУ от величины межстимульных интервалов за

счёт увеличения аккомодации до  $90 \pm 10\%$  при межстимульном интервале 90 мс ( $n = 6$ ,  $p < 0.05$ ). Вероятно роль  $\alpha_1$ -АР в САУ может заключаться не столько в отставленном «дублировании» эффектов  $\beta$ -АР, сколько в «подстройке» электрофизиологических свойств САУ за счёт уменьшения гиперполяризующего влияния периферии на пейсмекерные кардиомиоциты центральной части САУ, а также в поддержании проведения возбуждения в переходной зоне между тканью, генерирующей ритм, и рабочим миокардом предсердий при высокой ЧСС.



**Рис. 3.** Влияние стимуляции  $\alpha_1$ -адренорецепторов на автоматию сердца. А — Увеличение ЧСС ИС крысы при действии фенилэфрина (ФЭ), парный  $t$ -критерий Стьюдента. Б — Влияние ФЭ на скорректированное время восстановления функции синусного узла (кВВФСУ), двухфакторная ANOVA, апостериорный тест Шидака. В — Репрезентативные примеры активации САУ в контроле (К) и при действии ФЭ. Г — Смещение ТПА в многоклеточном тканевом препарате, включающем область САУ при действии ФЭ, парный  $t$ -критерий Стьюдента. Д — Точки первичной активации САУ в контроле (зеленый цвет) и при действии ФЭ (синий цвет). Е — Увеличение площади зоны

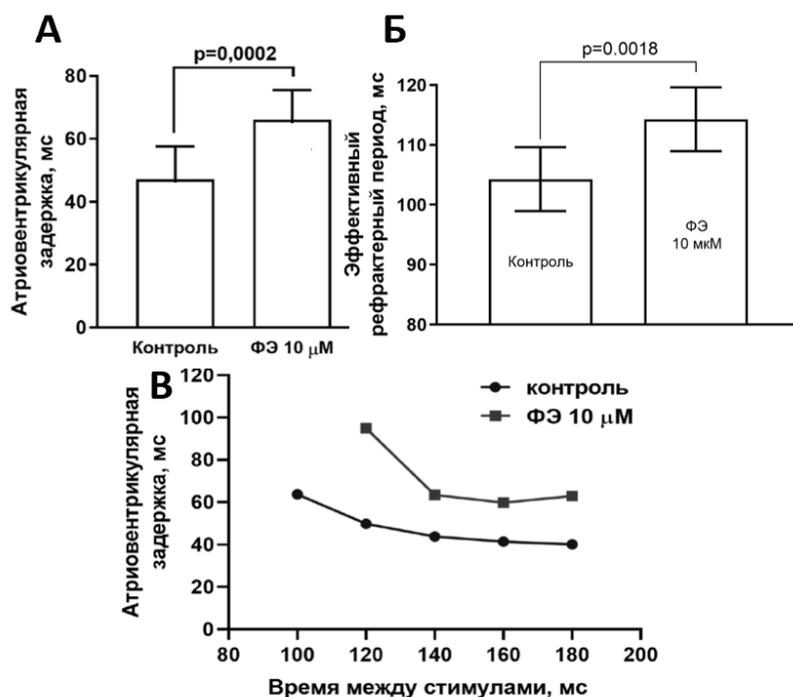
первичной активации в многоклеточном тканевом препарате, включающем область САУ, при действии ФЭ, парный  $t$ -критерий Стьюдента. ВПВ – верхняя полая вена, ПП – ушко правого предсердия и пограничный гребешок (отграничено черным пунктиром), НПВ – нижняя полая вена, ОЯ – овальная ямка, ЕК – Евстахиев клапан, СА – рудиментарный гребешок синоатриального клапана (показано белым пунктиром); устья полых вен обозначены черным пунктиром. \* –  $p < 0.05$ .

### Эффекты активации $\alpha_1$ -адренорецепторов в АВУ и их физиологическая роль в функционировании сердечно-сосудистой системы

Стимуляция  $\alpha_1$ -АР в АВУ вызывает негативный дромотропный эффект: наблюдается увеличение длительности атриовентрикулярной задержки (от 47,2 мс до 66,1 мс,  $p < 0.001$ ,  $n = 10$ ) (Рис. 4 А), увеличение эффективного рефрактерного периода на  $9,8\% \pm 1,2\%$

( $p < 0.001$ ,  $n = 10$ ) (Рис. 4 Б), возникновение нестационарных режимов проведения и блоков проведения возбуждения. При стимуляции  $\alpha_1$ -АР также уменьшается диапазон ЧСС, в котором АВУ способен передавать возбуждение к желудочковой проводящей системе (Рис. 4 В). То есть, при активации  $\alpha_1$ -АР максимальный воспроизводимый желудочками ритм, становится ниже, что может приводить к возникновению блоков АВ-проведения при меньшей ЧСС, чем в контрольных условиях.

Известно, что активация  $\beta$ -АР при увеличении симпатического тонуса способствует уменьшению длительности АВЗ, что адаптирует работу АВУ к высокой частоте. Следовательно, в АВУ  $\alpha_1$ -АР и  $\beta$ -АР функционируют антагонистично  $\beta$ -АР. Физиологическое значение такого антагонистического действия может быть связано с предотвращением чрезмерного уменьшения длительности АВЗ, поддержанием длительности диастолы и увеличением времени наполнения желудочков, которое оказывается сниженным при высокой ЧСС. Смещение баланса адренергического «сигналинга» от преимущественно  $\beta$ -адренергического к преимущественно  $\alpha_1$ -адренергическому, которое, например, может происходить при гипертрофических изменениях в сердце, способствует повышению аритмогенности АВУ.



**Рис. 4.** Влияние стимуляции  $\alpha_1$ -АР на длительность АВЗ. В – Увеличение длительности АВЗ при действии ФЭ, парный  $t$ -критерий Стьюдента. Б – Величина ЭРП АВУ в контроле и при действии ФЭ, парный  $t$ -критерий Стьюдента. Б – Репрезентативный пример увеличения длительности АВЗ при действии ФЭ при разном межстимульном интервале.

#### Влияние АТФ и других пуриновых нуклеотидов на биоэлектрическую активность САУ и АВУ

В работе было показано, что как в САУ, так и в АВУ обнаруживается мРНК пуриновых рецепторов P2-рецепторов (Рис. 2). Среди P2X-рецепторов в САУ по сравнению с рабочим предсердным миокардом (ЛП) больше транскриптов P2X1-, P2X2-, P2X6- и P2X7-рецепторов, а в АВУ больше транскриптов P2X5- и P2X7-рецепторов. Среди пуриновых рецепторов P2Y-типа на уровне мРНК наиболее представлены в САУ такие рецепторы как P2Y1, P2Y2, P2Y6, P2Y12 и P2Y14. В АВУ обнаруживается значительное количество мРНК P2Y1-, P2Y2-, P2Y4-, P2Y6-, P2Y12-, P2Y13- и P2Y14-рецепторов.

В данной работе были изучены мишени и возможные молекулярные механизмы, обуславливающие влияние пуриновых медиаторов, в частности АТФ, на проводящую систему сердца.

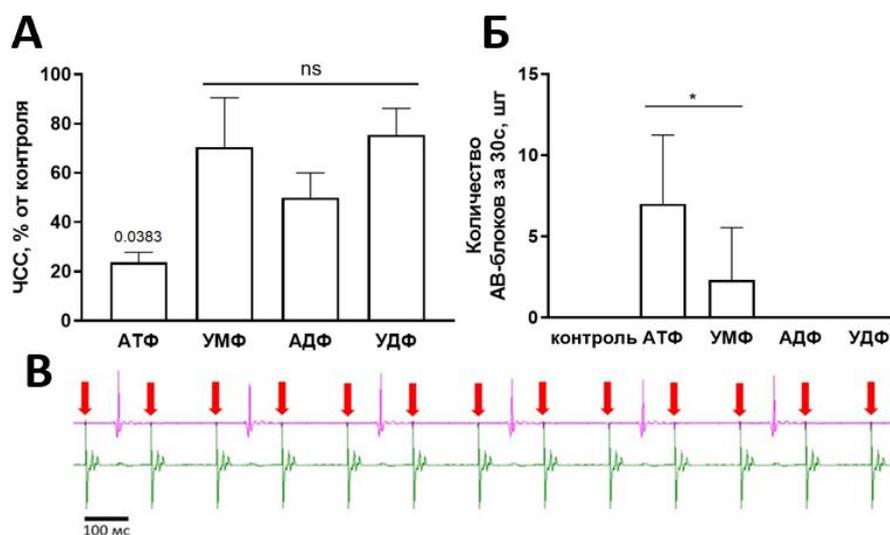
При действии эндогенного агониста P2-рецепторов АТФ у крыс *in vivo* происходит снижение ЧСС с  $391 \pm 29$  уд/мин до  $97 \pm 23$  уд/мин ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ) (Рис. 5 А), которое сохраняется и на фоне двойной автономной блокады. Наблюдаемый при действии АТФ негативный хронотропный эффект *in vivo* обусловлен прямым действием агонистов P2-рецепторов на пейсмекерные кардиомиоциты САУ. Это предположение подтверждается нашими экспериментами с изолированным сердцем, лишенным иннервации и контроля со стороны вегетативной нервной системы. В экспериментах с ИС крысы АТФ приводит к снижению ЧСС (с  $298 \pm 30$  уд/мин до  $134 \pm 13$  уд/мин,  $p < 0.05$ ,  $n = 15$ ).

Поскольку активация P2X-рецепторов приводит к формированию входящего деполяризующего катионного тока, а в наших экспериментах при действии АТФ наблюдается подавление пейсмекерной функции САУ, то вероятно преобладающий негативный хронотропный и дромотропный эффекты АТФ опосредуются рецепторами P2Y-типа. Все P2Y-рецепторы могут быть активированы АТФ, однако для некоторых из них АТФ имеет низкую аффинность, а преимущественными эндогенными агонистами, демонстрирующими высокое сродство, являются другие пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды.

Агонист P2Y12 и P2Y13 АДФ и агонист P2Y6-рецепторов УДФ не приводят к статистически значимому изменению ЧСС у крыс *in vivo* ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ) (Рис. 5 А). При действии агониста P2Y2 и P2Y4 рецепторов УМФ происходит небольшое снижение ЧСС: с  $391 \pm 29$  уд/мин до  $277 \pm 83$  уд/мин ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ) (Рис. 5 А). Кроме того эффект АТФ на ЧСС у крыс *in vivo* статистически значимо более выражен ( $23 \pm 4\%$  от контроля) по сравнению с эффектом УМФ ( $71 \pm 20\%$  от контроля,  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ) (Рис. 5 А).

При действии АТФ на АВ-соединение как у крыс *in vivo* (Рис. 5 Б), так и в изолированном сердце (Рис. 5 В) происходит подавление проведения возбуждения, что проявляется в возникновении блоков проведения в АВ-соединении ( $7.2 \pm 1.1$  блока за 30 с). Кроме того, АТФ приводит к увеличению длительности PR-интервала как на фоне двойной автономной блокады, так и при самостоятельном действии. Агонист P2Y1-, P2Y12- и P2Y13-рецепторов АДФ и агонист P2Y6-рецепторов УДФ не приводят к возникновению блоков АВ-проведения (Рис. 5 Б). УМФ индуцирует АВ-блоки у крыс *in vivo*, однако их количество статистически значимо меньше ( $2.2 \pm 0.3$  блока за 30 с) по сравнению с количеством блоков при действии АТФ ( $p < 0.05$ ) (Рис. 5 Б). При действии АТФ также наблюдается значительная гиперполяризация в АВ-соединении (с  $-50 \pm 3$  до  $-70 \pm 5$  мВ). Кроме того, сильно снижается длительность ПД как на уровне 90% реполяризации (с  $122 \pm 24$  до  $46 \pm 13$  мс), так и на уровне 50% реполяризации (с  $80 \pm 12$  до  $21 \pm 9$  мс).

По совокупности данных об экспрессии P2Y-рецепторов в САУ и АВУ крысы, а также на основе функциональных экспериментов с агонистами пуриновых рецепторов мы можем предположить, что, по крайней мере у крыс *in vivo*, посредником негативного хронотропного эффекта АТФ в САУ и АВУ являются P2Y2-рецепторы.



**Рис. 5.** Влияние активации пуриновых P2-рецепторов на функции САУ и АВУ. А – Влияние активации пуриновых рецепторов на ЧСС относительно контроля у крыс *in vivo*.

Однофакторная ANOVA, апостериорный тест Тьюки.

Б – Количество АВ-блоков за 30 секунд при

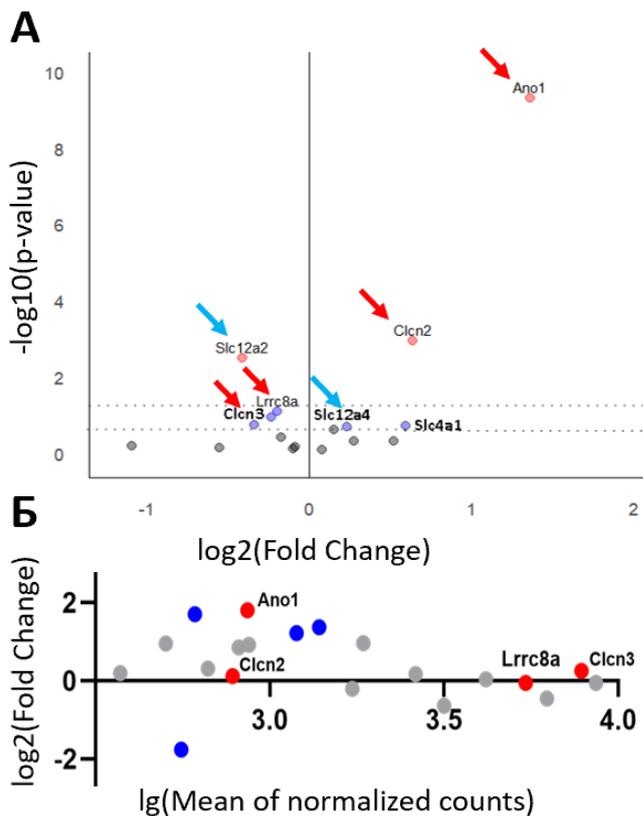
активации пуриновых рецепторов у крыс *in vivo*, критерий Краскела-Уоллиса, \* – отличие от контроля. В – Репрезентативная запись электрической активности предсердия (зеленый цвет) и желудочка (розовый цвет). На каждое возбуждение желудочков приходится два возбуждения предсердий (красная стрелка), что говорит о блоке АВ-проводения.

Поскольку  $\alpha_1$ -АР и P2Y2-рецепторы являются рецепторами, сопряженными с G<sub>q</sub>-белками, то, по меньшей мере в АВУ, «кардиоингибиторное» действие агонистов этих рецепторов может реализовываться за счет вовлечения сходных внутриклеточных сигнальных путей и мишеней. В тоже время, антагонистичность эффектов активации  $\alpha_1$ -АР в САУ и АВУ наталкивает на мысль, что может существовать мишень, воздействие на которую, в зависимости от конкретного электрофизиологического фенотипа и тканевого «контекста», может приводить к противоположным феноменам. Такой мишенью может являться трансмембранная хлорная проводимость и, соответственно, ионные трансмембранные каналы для анионов хлора.

### Роль трансмембранной хлорной ионной проводимости в проводящей системе сердца

В последние годы идентифицирован целый ряд трансмембранных белков, демонстрирующих хлорную проводимость (CFTR, ClC, TMEM16A, LRRC8A). Экспрессия этих макромолекул подтверждена для сердца в целом и для кардиомиоцитов в частности. Таким образом, предположение о сходстве механизмов  $\alpha_1$ -адренергических эффектов в гладкомышечных клетках и кардиомиоцитах имеет структурное обоснование [Duan, 2013]

оценки экспрессии генов хлорных каналов в ритмоводителе и проводящей системе сердца. Экспрессия генов всех типов исследуемых хлорных каналов в САУ подтверждается на уровне мРНК. По данным РНК-секвенирования среди хлорных каналов в САУ статистически значимо ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ) выше уровень транскриптов *Ano1* ( $\log_2FC = 1.36$ ) и *Cln2* ( $\log_2FC = 0.63$ ) по сравнению с ЛП (Рис. 6 А). Наоборот, количество транскриптов *Lrrc8a* ( $\log_2FC = -0.19$ ,  $p = 0.08$ ) и *Cln3* ( $\log_2FC = -0.23$ ,  $p = 0.11$ ) в САУ меньше чем в ЛП. В АВУ обнаруживается значительное количество транскриптов хлорных каналов *Ano1* (Tmem16A), *Cln2*, *Cln3* и *Lrrc8a* (Рис. 6 Б). Наибольший уровень экспрессии по сравнению с ЛП в АВУ выявляется для гена, кодирующего кальций-чувствительные хлорные каналы Tmem16A (*Ano1*).



**Рис. 6.** Диаграммы дифференциально экспрессированных генов хлорных каналов, котранспортеров и обменников (volcano plot) в препаратах САУ (А) и АВУ (Б) по отношению к препаратам левого предсердия. Красным цветом представлены гены, для которых различия достоверны ( $p < 0.05$ ). Синим цветом представлены гены, для которых  $0.05 < p < 0.2$ . Wald test.

Следует также отметить, что  $[Cl^-]_i$  в «рабочих» кардиомиоцитах и кардиомиоцитах САУ может существенно различаться (Рис. 7 А). В представленной работе впервые была проведена оценка значений внутриклеточной концентрации ионов хлора в препаратах рабочего предсердного миокарда и в препаратах, включающих область САУ. Показано, что

в препаратах САУ  $[Cl^-]_i$  существенно выше (12,4 мМ), чем в рабочем предсердном миокарде (4,7 мМ). Следовательно,  $E_{Cl}$  для САУ будет существенно менее электроотрицательным, чем для предсердного миокарда.

Исходя данных о содержании хлора в плазме крови крыс и данных нашей работы,  $E_{Cl}$  в САУ крысы может приближаться к -56 мВ (при 37°C). Следовательно, в САУ  $I_{Cl}$  будет выходящим и деполяризующим в том диапазоне значений мембранного потенциала (-65 - -55 мВ), который характерен для медленной диастолической деполяризации. На основе наших данных можно предположить, что усиление хлорной проводимости «облегчает» автоматическую активность САУ.

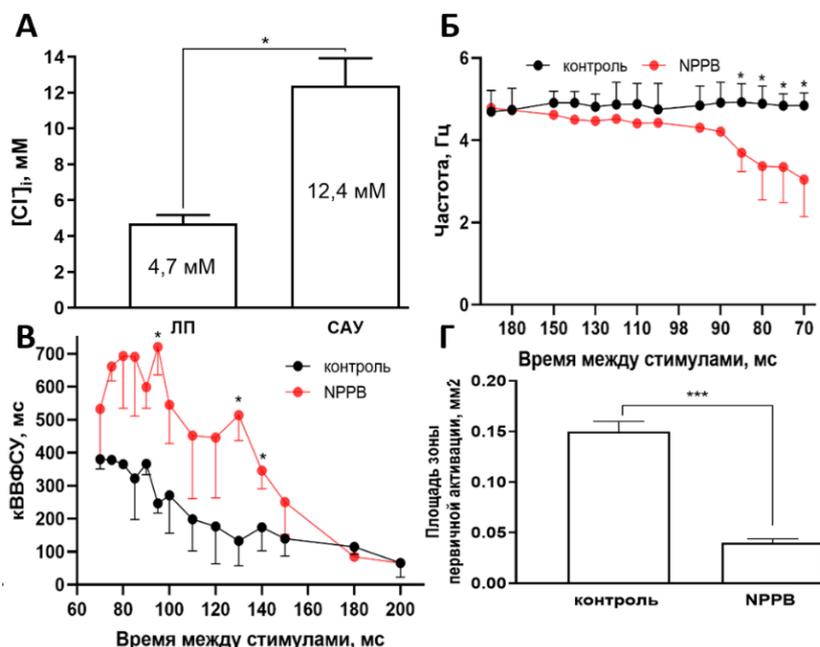
Для оценки роли хлорных каналов в реализации пейсмекерной функции САУ и АВУ мы использовали различные блокаторы хлорных каналов, экспрессируемых в кардиомиоцитах проводящей системы. Поскольку данные РВ-ПЦР и РНК-секвенирования показали, что в САУ высокий уровень кальций-зависимых хлорных каналов TMEM16A, а в АВУ объем-чувствительных хлорных каналов LRRC8A, то далее будут представлены результаты экспериментов на САУ с использованием преимущественного блокатора кальций-чувствительных хлорных каналов NPPB и на АВУ с использованием блокатора LRRC8A – DCPiB.

При действии NPPB в САУ наблюдается снижение частоты работы ИС (от  $5.9 \pm 0.3$  Гц до  $3.05 \pm 0.9$  Гц,  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ) (Рис. 7 Б). Кроме того, NPPB также вызывает увеличение кВВФСУ (при межстимульных интервалах 140, 130 и 95 мс,  $n = 6$ ,  $p < 0.05$ ) с  $174 \pm 70$  мс,  $176 \pm 65$  мс и  $246 \pm 30$  мс до  $346 \pm 50$  мс,  $514 \pm 77$  мс и  $721 \pm 80$  мс соответственно (Рис. 7 В). NPPB приводит к снижению частоты СПД в многоклеточных тканевых препаратах САУ (на  $11 \pm 1\%$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ). При действии NPPB наблюдается значительное снижение площади зоны первичной активации (Рис. 7 Г): от  $0.15 \pm 0.01$  мм<sup>2</sup> в контроле до  $0.04 \pm 0.001$

мм<sup>2</sup> при действии NPPB ( $p < 0.001$ ,  $n = 5$ ). Общей тенденцией при действии NPPB является смещение ТПА из центральной части препаратов САУ в направлении от устья верхней полой вены в сторону пограничного гребешка и формирование зоны невозбудимости в той области, где в контрольных условиях располагается точка первичной активации. Таким образом, блокада кальций-чувствительного канала TMEM16A приводит к выраженным нарушениям проведения возбуждения в сердце, что свидетельствует о его необходимости в функционировании проводящей системы сердца.

**Рис. 7.** Влияние блокады хлорной проводимости на автоматию сердца.

**А** – Цитоплазматическая концентрация ионов хлора ( $[Cl^-]_i$ ) в многоклеточных тканевых препаратах левого предсердия (ЛП) и препаратах, включающих область синоатриального узла (САУ). Непарный *t*-критерий Стьюдента, \* –  $p < 0.05$ . **Б** – Снижение частоты сокращений ИС крысы при действии NPPB. **В** – Влияние блокатора кальций-чувствительных хлорных каналов NPPB на скорректированное ВВФСУ ( $\kappa$ ВВФСУ) ИС крысы. **Г** – Уменьшение площади зоны первичной активации в многоклеточном тканевом препарате, включающем область САУ, при действии NPPB.



При действии DCPiB в ИС крысы наблюдается увеличение ЭРП в АВ-соединении. Статистически значимых отличий в длительности АВЗ при разных межстимульных интервалах выявлено не было ( $n = 6$ ,  $p > 0.05$ ). Однако при действии DCPiB и значениях межстимульного интервала 150 и 140 мс происходит уменьшение доли кардиоциклов с блоками проведения в АВ-соединении от общего количества кардиоциклов (с  $11.67 \pm 1.4\%$  до  $0\%$  и с  $19.6 \pm 2.1\%$  до  $8 \pm 1\%$  соответственно,  $p < 0.05$ ). Кроме того, DCPiB приводит к статистически значимому увеличению осцилляции АВЗ с  $17 \pm 6.13\%$  до  $36.7 \pm 14.7\%$ , ( $n = 6$ ,  $p < 0.01$ ). Исходя из полученных данных, можно предположить, что объем-чувствительные хлорные каналы LRRC8 играют важную роль в поддержании работы проводящей системы сердца, обеспечивая насосную функцию сердца.

### Роль трансмембранной хлорной ионной проводимости в реализации эффектов $\alpha_1$ -АР в проводящей системе сердца

В наших экспериментах, направленных на выяснение роли хлорной проводимости в контрольных условиях в проводящей системе сердца, наиболее заметные эффекты наблюдались при действии блокатора кальций-чувствительных хлорных каналов NPPB, который подавляет вызванные ФЭ изменения ВВФСУ,  $\kappa$ ВВФСУ и аккомодации САУ. Этот эффект зависит от величины межстимульного интервала и спонтанного ритма САУ: NPPB

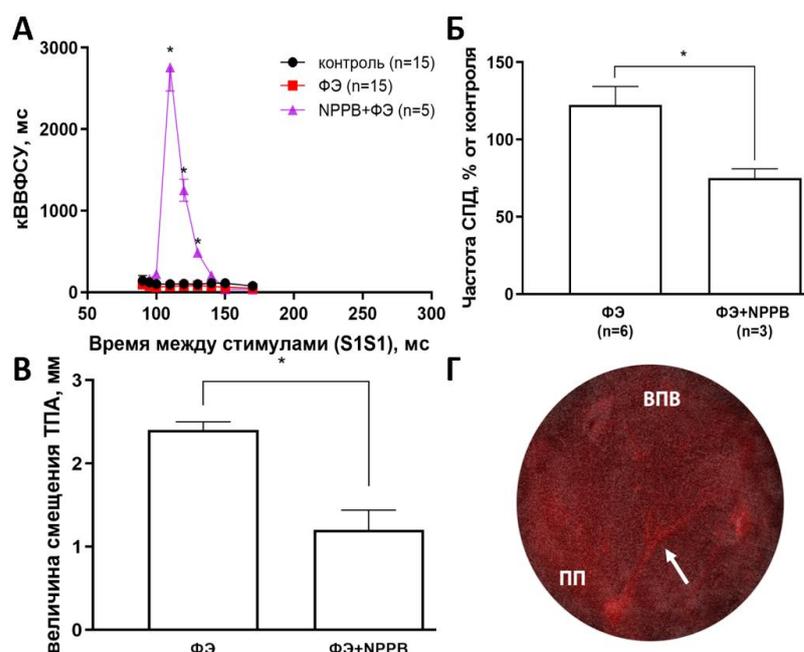
вызывает увеличение кВВФСУ только в диапазоне межстимульных интервалов от 150 до 100 мс с максимумом эффекта при межстимульном интервале 110 мс ( $2767.9 \pm 190.7$  и  $98.7 \pm 31.6$  мс в контроле или  $2804 \pm 91\%$  от контрольного значения,  $p < 0.01$ ,  $n = 5$ ) (Рис. 8 А). Важно, что при активации  $\alpha_1$ -АР на фоне NPPB после прекращения стимуляции автоматия САУ возобновлялась так же медленно как в контроле, а кроме того, восстановление автоматической активности происходило ступенчато. Такой характер изменения ритма указывает на значительное, быстрое смещение точки первичной активации в миокарде правого предсердия, которое возможно при кратковременном возникновении в пейсмекерном миокарде зон функциональной невозбудимости.

При действии ФЭ на фоне NPPB в многоклеточных тканевых препаратах САУ наблюдается формирование электрически невозбудимой зоны в области, в которой в контрольных условиях располагалась ТПА. Кроме того NPPB частично или полностью подавляет влияние, оказываемое ФЭ, на проведение волны возбуждения в САУ: в присутствии NPPB ФЭ не вызывает увеличения площади ТПА ( $0.09 \pm 0.01$  мм<sup>2</sup>) и частоты СПД, которая составляет  $89.7 \pm 7.0\%$  от контрольного значения ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ) (Рис. 8 Б), однако вызывает небольшое смещение ТПА ( $1.2 \pm 0.2$  мм,  $n = 5$ ) (Рис. 8 В).

Кроме того, при обработке САУ, чувствительным к ионам хлора флуоресцентным красителем MQAE, наблюдается статистически значимое снижение средней интенсивности флуоресценции к 6-ой минуте действия ФЭ (с  $48 \pm 11$  до  $45 \pm 11$ ,  $p < 0.05$ ), что говорит о повышении  $[Cl^-]_i$  в тканевом препарате при действии ФЭ (Рис. 8 Г). Наибольший эффект наблюдается в области, окружающей ветви артерии САУ, то есть в той области, в которой согласно литературным данным у крыс локализуется «истинный» пейсмекер. Повышение  $[Cl^-]_i$  будет приводить к тому, что  $E_{Cl}$  становится менее негативным, и это усиливает деполяризующую компоненту тока, формируемого хлорными каналами (вероятно, TMEM16A). Можно предположить, что вызванное активацией  $\alpha_1$ -АР увеличение  $[Cl^-]_i$ , и ЧСС в САУ обусловлено реципрокной стимуляцией НКСС и подавлением КСС.

Таким образом, последовательность событий, наблюдаемых при активации  $\alpha_1$ -АР в САУ может включать повышение  $[Ca^{2+}]_i$  и усиление деполяризующей компоненты трансмембранного хлорного тока, обусловленного  $Ca^{2+}$ -зависимыми хлорными каналами TMEM16A. Деполяризующий эффект усиления хлорной проводимости может быть особенно значим и велик на периферии САУ, где МДП существенно негативнее  $E_{Cl}$ , но где возбудимость миокарда может быть подавлена за счет электротонических свойств.

При действии ФЭ на фоне блокатора объём-чувствительных хлорных каналов DCPiB наблюдается увеличение длительности задержки проведения в АВ-соединении и ЭРП (с  $84 \pm 15$  мс до  $170 \pm 20$  мс,  $p < 0.05$ ), то есть блокада объём-чувствительных хлорных каналов не приводит к подавлению эффектов  $\alpha_1$ -АР в АВУ.



**Рис. 8.** Влияние блокады хлорных каналов на  $\alpha_1$ -адренергические эффекты в САУ. А – Влияние NPPB на снижение кВВФСУ, вызываемое ФЭ, двухфакторная ANOVA, апостериорный тест Шидака, \* –  $p < 0.05$ . Б – Частота спонтанных ПД при действии ФЭ и NPPB. Г – Величина смещения ТПА в тканевых препаратах САУ при действии ФЭ и NPPB. В – Дифференциальное изображение, показывающее

разницу внутриклеточной концентрации хлора между контрольным тканевым препаратом САУ и препаратом к 6-ой минуте действия ФЭ. Яркость – уменьшение интенсивности флуоресценции по сравнению с контролем.

### Вовлеченность катион-хлорных трансмембранных котранспортеров в реализацию эффектов, наблюдаемых при стимуляции $\alpha_1$ -АР в САУ

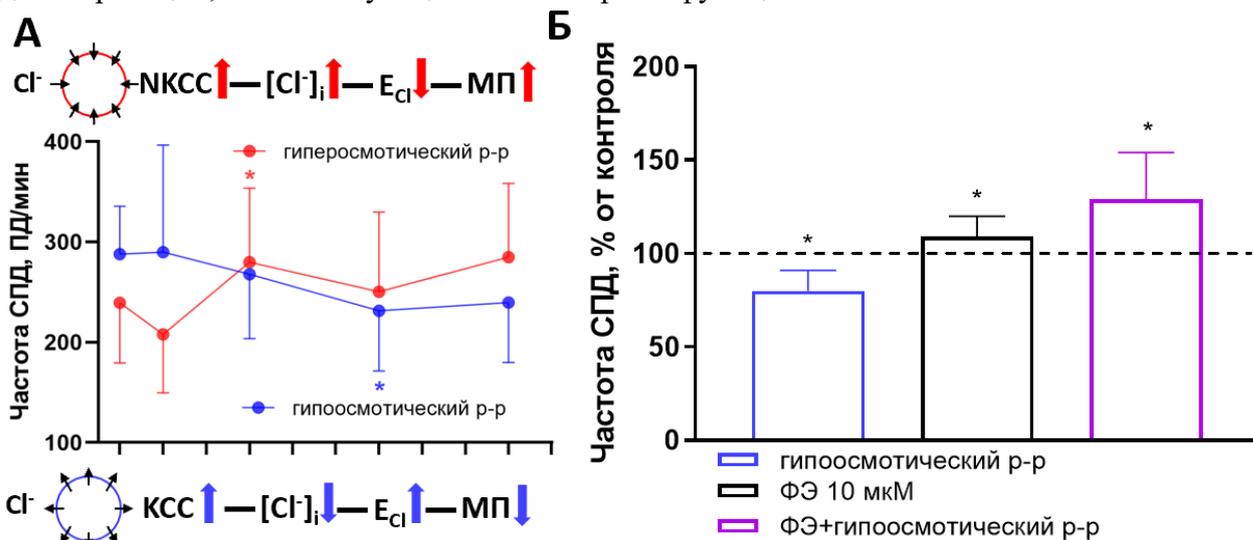
В представленной работе впервые в проводящей системе сердца была выявлена экспрессия генов, кодирующих хлор-катионные котранспортеры КСС1 (*Slc12a4*) и НКСС1 (*Slc12a2*) (Рис. 6. А-Б). Относительный уровень мРНК транспортера КСС1, который отвечает за перенос ионов калия и хлора во внеклеточное пространство, в САУ значительно выше по сравнению с рабочим миокардом и АВУ ( $n = 6$ , для ЛП –  $p = 0.0897$ , для АВУ –  $p = 0.0366$ ). Транспортер НКСС1, переносящий ионы натрия, калия и хлора внутрь клетки из внеклеточного пространства, также обнаруживается как в ЛП, так и в элементах проводящей системы сердца ( $n = 6$ ).

В данной работе впервые показано, что уменьшение объема клетки при снижении осмолярности внешней среды приводит к снижению частоты генерации спонтанных ПД в САУ (с  $288 \pm 19$  СПД/мин до  $231 \pm 21$  СПД/мин,  $n = 6$ ,  $p < 0.05$ ), что сопровождается снижением  $[Cl^-]_i$  и сдвигу  $E_{Cl}$  в сторону отрицательных значений за счет активации катион-хлорного котранспортера КСС1, экспрессия которого в САУ высока (Рис. 9 А). В свою очередь, повышение осмолярности приводит к увеличению частоты спонтанных потенциалов действия (с  $239 \pm 21$  СПД/мин до  $279 \pm 36$  СПД/мин,  $n = 6$ ,  $p < 0.05$ ) (Рис. 9 Б). Обусловленное увеличением осмолярности усиление автоматии САУ сопровождается транзиторным увеличением  $[Cl^-]_i$ , вероятно, за счет активации катион-хлорных мембранных обменников НКСС. Таким образом, проведенные нами функциональные эксперименты впервые выявляют условия, при которых КСС/НКСС оказываются вовлечены в формирование ритма сердца САУ.

### Модуляция работы катион-хлорных котранспортеров при активации $\alpha_1$ -АР САУ

В наших экспериментах активация  $\alpha_1$ -АР не просто подавляет уменьшение частоты СПД, которое возникает в гипотоническом растворе, а при одновременном действии ФЭ

и гипоосмотического раствора изменение частоты оказывается значимо бóльшим (к 9-ой минуте  $333 \pm 38$  ПД/мин,  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ), чем при действии каждого из этих факторов по отдельности. Увеличение частоты при этом сопровождается увеличением площади зоны первичной активации, а также смещением точки первичной активации в область устья верхней полой вены. При изоосмотической реверсии (возвращении препарата в изотонический раствор) на фоне действия ФЭ не происходит изменения частоты СПД, однако наблюдается дополнительное смещение точки первичной активации к устью нижней полой вены. Таким образом, можно предположить, что активация  $\alpha_1$ -АР подавляет активность котранспортёра КСС, что приводит к повышению  $[Cl^-]_i$  и дополнительной деполаризации, способствующей пейсмекерной функции САУ.



**Рис. 9.** Влияние осмолярности раствора на пейсмекерную активность многоклеточного тканевого препарата, включающего область САУ. А – Изменение частоты спонтанных потенциалов действия (СПД) в многоклеточном тканевом препарате в гипо- и гиперосмотическом растворах. Б – Изменение частоты СПД при действии гипоосмотического раствора, ФЭ и гипоосмотического раствора на фоне ФЭ относительно частоты СПД в контроле. Однофакторная ANOVA, апостериорный тест Тьюки. \* – отличие от контроля,  $p < 0.05$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Симпатическая иннервация сердца эволюционировала как способ быстрой регуляции его работы и адаптации к непрерывно меняющимся гемодинамическими потребностями организма. Симпатическая иннервация сердца появляется у низших наземных позвоночных животных и костистых рыб, но наиболее развитой, сложно организованной и высокоактивной оказывается у млекопитающих, для которых характерны высокие ЧСС и минутный объем кровообращения.

Сердце млекопитающих животных, в том числе и человека, является крайне сложным органом, включающим ряд структурно и функционально сопряженных отделов, собственную коронарную систему кровообращения, ритмоводитель и проводящую систему. Ткань сердца млекопитающих сформирована кардиомиоцитами нескольких типов, а также включает более десятка немиокардиальных типов клеток (фибробласты, мезотелиальные клетки, адипоциты, иммунокомпетентные клетки и т.д.). Для быстрой регуляции насосной функции сердца при высокой частоте сокращений необходима тщательная координация и взаимозависимая «настройка» активности всех его тканей и

отделов, но в наибольшей степени элементов его проводящей системы. Такая «настройка» может реализоваться за счет пространственной неоднородности количества рецепторов «симпатических» медиаторов (норадреналина, пуриновых соединений, пептидных медиаторов), дифференциальной экспрессии типов рецепторов и мишеней этих рецепторов, обуславливающих электрические и механические явления.

В связи с вышесказанным, первая часть представленной работы является попыткой ответа на следующие вопросы: присутствуют ли  $\alpha_1$ -АР и P2Y-рецепторы, как элементы симпатической нейротрансмиссии, в таких ключевых структурах сердца как САУ и АВУ? В работе приведены данные, указывающие на присутствие этих рецепторов как в доминантном ритмоводителе ритма – САУ, так и в ключевой структуре проводящей системы – АВУ.

Следующая часть работы была направлена, на решение вопроса о физиологической и патофизиологической роли  $\alpha_1$ -АР и P2-пуринорецепторов в ритмоводителе и проводящей системе сердца. В работе продемонстрировано, что физиологическая роль адренорецепторов  $\alpha_1$ -типа может заключаться в координации электрической активности ключевых структур, определяющих ритмическую и последовательную активацию отделов сердца – синоатриального и атриовентрикулярного узлов. Полученные в работе данные позволяют предположить, что  $\alpha_1$ -АР опосредуют не только и не столько трофические сигналы в зрелом миокарде, сколько принимают участие в быстрой регуляции электрической и, соответственно, механической активности сердца, как и  $\beta$ -адренорецепторы. Более того, на основе наблюдаемых феноменов, сопровождающих активацию  $\alpha_1$ -АР, можно заключить, что они не являются функциональными «дубликатами»  $\beta$ -адренорецепторов в проводящей системе сердца, а дополняют или ограничивают некоторые (положительные хронотропные и дромотропные) эффекты, развивающиеся при активации  $\beta$ -АР. В работе показано, что основной пуриновый медиатор симпатической нейротрансмиссии АТФ посредством пуриновых P2Y-рецепторов может действовать антагонистически основному сигнальному пути, включающему норадреналин. Обобщая результаты можно заключить, что симпатический контроль ритмоводителя и проводящей системы сердца не сводится к активации  $\beta$ -адренорецепторов, а в норме реализуется с вовлечением  $\alpha_1$ -адренорецепторов, и, возможно, P2Y-рецепторов пуриновых котрансмиттеров. Однако избыточная стимуляция как  $\alpha_1$ -АР, так и P2Y-рецепторов может привести к дисфункции атриовентрикулярного соединения. Можно выдвинуть предположение о том, что за счет набора нейромедиаторов и нескольких типов адренорецепторов симпатическая нейротрансмиссия формирует контур авторегуляции в ритмоводителе и проводящей системе сердца без вовлечения иных нейрогуморальных систем. Проведенные в работе эксперименты позволили сформулировать гипотезу, согласно которой физиологическая роль  $\alpha_1$ -АР заключается в поддержании работы САУ и синхронизации его активности с работой АВУ в тех условиях, когда  $\beta$ -адренергическая стимуляция задает чрезвычайно высокую ЧСС.

Заключительная часть работы направлена на решение вопроса о том, за счет какого механизма может реализовываться физиологическая роль  $\alpha_1$ -АР и P2Y-рецепторов в проводящей системе сердца. Установлено, что таким механизмом в пейсмекерных кардиомиоцитах САУ и миокарде АВУ может являться усиление хлорной проводимости и повышение внутриклеточной концентрации ионов хлора, обусловленное изменением баланса активности трансмембранных транспортеров КСС и НКСС. Подтверждение

вовлеченности КСС и НКСС в регуляцию работы САУ позволило выявить новый феномен: зависимость автоматии САУ от осмолярности внеклеточной среды. Таким образом, в работе впервые установлено значение цитоплазматического хлора как фактора, оказывающего влияние на автоматию ритмоводителя сердца, а также показаны механизмы регуляции его уровня.

### **ВЫВОДЫ**

1. В кардиомиоцитах синоатриального (САУ) и атриовентрикулярного узлов (АВУ) сердца крысы обнаруживаются  $\alpha_{1A}$ -адренорецепторы ( $\alpha_{1A}$ -АР) и пуриновые P2-рецепторы.
2. В САУ и АВУ крысы обнаруживается значимый уровень экспрессии генов, кодирующих хлорные каналы (ClC-2, ClC-3, LRRC8A, TMEM16A). В САУ, по данным анализа транскриптома, наблюдается наибольший уровень мРНК TMEM16A, а в АВУ - LRRC8A. В САУ и АВУ выявляется высокий уровень мРНК катион-хлорных трансмембранных симпортеров – KCC1 и NKCC1. В САУ уровень КСС выше, чем НКСС.
3. Стимуляция  $\alpha_1$ -АР приводит к эффектам, способствующим росту ЧСС: снижению времени восстановления функции САУ, миграции и увеличению площади зоны первичной активации, облегчению проведения волны возбуждения из центральной части САУ на его периферию. Активация  $\alpha_1$ -АР приводит к подавлению проведения возбуждения через атриовентрикулярное соединение за счет увеличения длительности атриовентрикулярной задержки и рефрактерности АВ-соединения, гиперполяризации в ткани АВУ и индукции АВ-узловых блоков проведения.
4. Стимуляция пуриновых рецепторов P2-типа приводит к сходным эффектам в САУ и АВУ: подавлению автоматии САУ и снижению скорости проведения в АВУ вплоть до возникновения блоков проведения.
5. Избирательная блокада хлорных каналов различного типа подавляет автоматию САУ и проведение возбуждения в АВ-узле. Активация  $\alpha_1$ -АР приводит к увеличению цитоплазматической концентрации Cl<sup>-</sup> в САУ. Блокада хлорных каналов, для которых обнаруживается наибольшее количество мРНК, приводит к частичному подавлению эффектов активации  $\alpha_1$ -АР в САУ, но не в АВУ.
6. Активация отдельных катион-хлорных симпортеров (KCC1, NKCC1) оказывает существенное влияние на автоматию САУ. Стимуляция  $\alpha_1$ -АР модифицирует эффекты, обусловленные активацией катион-хлорных трансмембранных симпортеров в САУ.

### **СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Статьи, опубликованные в журналах WoS, Scopus, RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.015.7**

**МГУ имени М.В. Ломоносова:**

1. **Я. А. Воронина**, А. М. Кархов, В. С. Кузьмин. Современные представления о структурной основе и молекулярных механизмах трансмембранного транспорта Cl<sup>-</sup> в кардиомиоцитах // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. — 2024. — Т. 79, № 2S. — С. 22-36. (IF – 0.677 РИНЦ) (1.7325/1.213) \*
2. **Воронина Я. А.**, Федоров А. В., Челомбитько М. А., Пиунова У. Е., Кузьмин В. С.  $\alpha_1$ -Адренорецепторы регулируют пейсмекерную функцию синоатриального узла сердца, оказывая влияние на хлорный трансмембранный транспорт // Биологические мембраны. — 2024. — Т. 41, № 1. — С. 58-72. (IF – 0,422 РИНЦ) (1.7325/1.13) \*

3. **Воронина Я. А.**, Кузьмин В. С. Влияние пробенецида на проаритмические эффекты активации альфа-1-адренорецепторов в атриовентрикулярном узле сердца крысы // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. — 2023. — Т.78, № 4. — С. 258-266. (IF –0.677 РИНЦ) (1.924/1.539)\*

4. Abramochkin Denis V., Filatova Tatiana S., Pustovit Ksenia B., **Voronina Yana A.**, Kuzmin Vladislav S., Vornanen Matti. Ionic currents underlying different patterns of electrical activity in working cardiac myocytes of mammals and non-mammalian vertebrates // Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology. — 2022. — Vol. 268. — 111204. (SJR – 2.1, SCOPUS) (2.541/0.762)\*

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

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

$[Cl^-]_i$  – внутриклеточная концентрация ионов хлора

$\alpha_1$ -АР –  $\alpha_1$ -адренорецепторы

$\beta$ -АР –  $\beta$ -адренорецепторы

СIC – потенциал-зависимые хлорные каналы

CFTR – трансмембранный регулятор муковисцидоза (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)

$E_{Cl}$  – хлорный равновесный потенциал

КСС – катион-хлорный котранспортер ионов калия и хлора

log<sub>2</sub>FC - логарифм по основанию 2 изменения флуоресценции (fold change)

LRRC – белки, содержащие повторы, обогащенные лейцином (leucine rich repeats containing protein)

НКСС – катион-хлорный котранспортер ионов натрия, калия и хлора

PBS – фосфатно-солевой буфер (phosphate-buffered saline)

АВЗ – атриовентрикулярная задержка

АВУ – атриовентрикулярный узел

АДФ – аденозиндифосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

(к)ВВФСУ – (корригированное) время восстановления функции синусного узла

ИС – изолированное сердце

ЛП – левое предсердие

ПД – потенциал действия

РВ-ПЦР – полимеразная цепная реакция в реальном времени

САУ – синоатриальный узел

СПД – спонтанные потенциалы действия

ТПА – точка первичной активации

ФЭ – фенилэфрин

ЧСС – частота сердечных сокращений

ЭГ – электрограмма

ЭРП – эффективный рефрактерный период

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Автор выражает искреннюю благодарность Кузьмину Владиславу Стефановичу за чуткое руководство, моральную поддержку и помощь на всех этапах исследования.

Автор сердечно благодарен Кархову Андрею Михайловичу, Пиуновой Ульяне Евгеньевне, Пустовит Оксане Борисовне, Потехиной Виктории Маратовне, Ивановой Александре Дмитриевне, Джуманиязовой Ирине Хамрабековне и Филатовой Татьяне Сергеевне за освоение методов и поддержку.

Автор глубоко признателен заведующему кафедрой физиологии человека и животных Абрамочкину Денису Валерьевичу, а также всем сотрудникам кафедры за формирование интереса к физиологии, советы и поддержку.

Автор выражает благодарность Малыхиной Инне Алексеевне, Осиповой Дарье Дмитриевне и Скоренцевой Ксении Витальевне за внимательное прочтение текста работы и исправление орфографических, грамматических и пунктуационных ошибок.

Автор сердечно благодарен семье, друзьям, студентам, школьникам, сотрудникам биологического факультета и ББС МГУ, Фолк-кемпу и Дубне за моральную поддержку.