

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
Биологический факультет

На правах рукописи

Воронина Яна Алексеевна

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

Специальность – 1.5.5. – Физиология человека и животных

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Кузьмин В.С.

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	7
1. ВВЕДЕНИЕ.....	11
1.1. Актуальность темы исследования	11
1.2. Степень разработанности темы.....	14
1.3. Задачи исследования.....	18
1.4. Научная новизна исследования.....	19
1.5. Теоретическая и практическая значимость исследования.....	20
1.6. Методология и методы исследования	21
1.7. Степень достоверности данных	22
1.8. Публикации	22
1.9. Апробация материалов научно-квалификационной работы	23
1.10. Положения, выносимые на защиту	23
1.11. Личный вклад автора.....	24
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	25
2.1. Проводящая система сердца млекопитающих	25
2.1.1. Анатомические и физиологические особенности САУ сердца млекопитающих	25
2.1.2. Анатомические и физиологические особенности АВУ сердца млекопитающих	27
2.1.3. Патологические изменения структур проводящей системы сердца млекопитающих.....	30
2.2. Симпатическая и адренергическая регуляция работы сердца.....	31
2.2.1. Структура, классификация и сопряженные сигнальные каскады миокардиальных адренорецепторов	31
2.2.2. Эффекты активации миокардиальных адренорецепторов	35
2.3. Пуринергическая регуляторная система.....	36
2.3.1. Мембранные рецепторы пуриновых соединений рабочего и пейсмекерного миокарда	37
2.3.2. Эффекты активации пуриновых P2-рецепторов в рабочем миокарде и проводящей системе сердца	40
2.4. Роль пуринов и пуриновых рецепторов в контроле активности вегетативной иннервации сердца	41
2.5. Хлорные мембранные ионные каналы и транспортеры и их роль в обеспечении электрической активности сердца	41
2.5.1. Трансмембранные хлорные каналы и переносчики.....	42
2.5.2. Транспортеры и обменники хлора.....	53
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	61

3.1. Экспериментальные животные	61
3.2. Получение препаратов рабочего миокарда и различных отделов проводящей системы сердца крысы	61
3.2.1. Получение многоклеточного тканевого препарата правого предсердия крысы, включающего область САУ	61
3.2.2. Получение многоклеточного тканевого препарата, включающего АВУ	62
3.3. Перфузия полученных препаратов сердца крысы	63
3.3.1. Перфузия изолированного сердца крысы	63
3.3.2. Перфузия изолированных многоклеточных тканевых препаратов крысы	63
3.4. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии белков в рабочем миокарде и в проводящей системе сердца крысы	63
3.5. Оценка уровня целевых мРНК в рабочем миокарде и в элементах проводящей системы крысы методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (РВ-ПЦР)	64
3.6. Оценка уровня экспрессии целевых генов методом РНК-секвенирования	67
3.6.1. Выделение РНК	67
3.6.2. Контроль качества РНК	67
3.6.2. Приготовление транскриптомных библиотек	69
3.6.3. Контроль качества транскриптомных библиотек	70
3.6.4. Анализ данных РНК-секвенирования	72
3.7. Регистрация частоты сердечных сокращений и ЭКГ у наркотизированных крыс	73
3.8. Оценка функции проводящей системы в изолированном сердце крысы	74
3.8.1. Оценка времени восстановления функции САУ в изолированном сердце	74
3.8.2. Оценка атриовентрикулярного проведения в изолированном сердце крысы	76
3.9. Оптическое картирование хронотопографии возбуждения в тканевых препаратах САУ сердца крысы	77
3.10. Внутриклеточная регистрация потенциалов действия в многоклеточных тканевых препаратах, включающих АВУ сердца крысы	79
3.11. Меркуриметрический для оценки цитоплазматической концентрации хлора в многоклеточных тканевых препаратах	80
3.12. Визуализация и анализ колебаний внутриклеточной концентрации ионов хлора в многоклеточных тканевых препаратах, включающих САУ крысы	80
3.13. Реактивы, используемые в работе	82
3.14. Статистическая обработка	84

4. РЕЗУЛЬТАТЫ	85
4.1. Экспрессия α_1-адренорецепторов в структурах проводящей системы сердца...	85
4.1.1. Экспрессия α_1 -адренорецепторов в САУ	85
4.1.2. Экспрессия α_1 -адренорецепторов в АВУ	86
4.2. Влияние активации α_1-адренорецепторов на функционирование САУ и АВУ.	91
4.2.1. Влияние активации α_1 -адренорецепторов на электрофизиологические свойства САУ	91
4.2.2. Влияние активации α_1 -адренорецепторов на электрофизиологические свойства АВУ	92
4.3. Экспрессия генов, кодирующих пуриновые P2-рецепторов в структурах проводящей системы сердца	97
4.3.1. Экспрессия генов, кодирующих пуриновые P2-рецепторов в САУ	97
4.3.2. Экспрессия генов, кодирующих пуриновые P2-рецепторы в АВУ	97
4.3. Влияние активации пуриновых P2-рецепторов на функционирование САУ и АВУ	97
4.3.1. Влияние активации пуриновых P2-рецепторов на сердечный ритм <i>in vivo</i>	97
4.3.2. Влияние активации пуриновых P2-рецепторов на электрофизиологические свойства изолированного сердца	98
4.3.3. Влияние активации пуриновых P2-рецепторов на функционирование АВУ у крыс <i>in vivo</i>	98
4.3.4. Влияние активации пуриновых P2-рецепторов на функционирование АВУ в изолированном сердце	98
4.3.5. Влияние активации пуриновых P2-рецепторов на электрофизиологические свойства АВУ в многоклеточных тканевых препаратах	100
4.4. Механизмы, обуславливающие наблюдаемые эффекты активации α-адренорецепторов в проводящей системе сердца	101
4.4.1. Влияние блокады протеинкиназы С на эффекты активации α_1 -адренорецепторов САУ в изолированном сердце	101
4.4.2. Влияние блокады протеинкиназы С на эффекты активации α_1 -адренорецепторов в тканевых препаратах САУ	102
4.4.3. Эффекты блокады хлорной проводимости различных типов на автоматию САУ в изолированном сердце	103
4.4.4. Эффекты блокады хлорной проводимости различных типов на паттерн активации САУ в многоклеточных тканевых препаратах	107
4.4.4. Эффекты блокады хлорной проводимости различных типов на функционирование АВУ в изолированном сердце	108
4.4.5. Влияние блокады хлорной проводимости на эффекты активации α_1 -адренорецепторов САУ в изолированном сердце	112
4.4.6. Влияние блокады хлорной проводимости на эффекты активации α_1 -адренорецепторов в тканевых препаратах САУ	112

4.4.7. Влияние блокады хлорной проводимости на эффекты активации α_1 -адренорецепторов АВУ в изолированном сердце.....	112
4.4.8. Экспрессия генов, кодирующих хлорные каналы в рабочем миокарде и в проводящей системе сердца.....	116
4.4.9. Экспрессия генов, кодирующих катион-хлорные котранспортеры в рабочем миокарде и проводящей системе сердца.....	119
4.5. Внутриклеточная концентрация ионов хлора в тканевых препаратах ЛП и САУ	120
4.6. Влияние изменения осмолярности внеклеточной среды на автоматию САУ .	120
4.7. Влияние изменения осмолярности внеклеточной среды на внутриклеточное содержание хлора в тканевых препаратах САУ	121
4.8. Изменение внутриклеточного содержания хлора в многоклеточном тканевом препарате, включающем область САУ, при активации α_1-адренорецепторов	123
4.9. Влияние стимуляции α_1-адренорецепторов на паттерн активации САУ при изменении осмолярности внеклеточной среды	123
4.10. Влияние блокады анионного транспорта на эффекты активации P2-рецепторов в проводящей системе сердца.....	125
5. ОБСУЖДЕНИЕ	128
5.1. Локализация α_{1A}-адренорецепторов в структурах проводящей системы сердца	128
5.2. Эффекты активации α_{1A}-адренорецепторов в САУ и их физиологическая роль в функционировании сердечно-сосудистой системы	128
5.3. Эффекты активации α_{1A}-адренорецепторов в АВУ и их физиологическая роль в функционировании сердечно-сосудистой системы	131
5.4. Влияние АТФ и других пуриновых нуклеотидов на биоэлектрическую активность САУ и АВУ	132
5.5. Вероятные механизмы, опосредующие эффекты активации α_{1A}-адренорецепторов в проводящей системе сердца	136
5.6. Роль трансмембранной хлорной ионной проводимости в проводящей системе сердца	138
5.7. Роль трансмембранной хлорной ионной проводимости в реализации эффектов α_1-АР в проводящей системе сердца	145
5.8. Влияние активации катион-хлорных котранспортеров на пейсмекерную функцию САУ	148

5.9. Модуляция работы катион-хлорных котранспортеров при активации α_1-АР САУ	149
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	150
7. ВЫВОДЫ	152
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	153

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

$[Ca^{2+}]_i$ – внутриклеточная концентрация ионов кальция

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

$[Cl^-]_o$ – внеклеточная концентрация ионов хлора

9-АС – антрацен-9-карбоновая кислота

α -АР – α -адренорецепторы

β -АР – β -адренорецепторы

α , β -мет-АТФ – α , β -метилен-АТФ

CaCC – кальций-чувствительные хлорные каналы

Cav3 – кавеолин 3

ClC – потенциал-зависимые хлорные каналы

CCC – катион-хлорные котранспортеры (cation-chloride cotransporters) (симпортеры)

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

Cx40/43/45 – коннексины 40/43/45

DAG – диацилглицерол

DCPIB – 4-(2-бутил-6,7-дихлоро-2-циклопентилиндан-1-он-5-ил)оксимасяная кислота

E_{Cl} – хлорный равновесный потенциал

GPCRs – G-белок-сопряженные мембранные рецепторы (G-protein-coupled receptors)

I_{CaL} – кальциевый ток L-типа

$I_{Cl,Ca}$ – кальций-чувствительный хлорный ток

$I_{Cl,RKA}$ – РКА-чувствительный хлорный ток

$I_{Cl,vol}$ – хлорный ток, чувствительный к изменению клеточного объема

$I_{Cl,ir}$ – хлорный ток входящего выпрямления

I_f – funny-ток

I_{Na} – потенциал-зависимый натриевый ток

IP_3 – инозитолтрифосфат

IP_3R – рецепторы инозитолтрифосфата

KCC – катион-хлорный котранспортер ионов калия и хлора

\log_2FC - логарифм по основанию 2 изменения флуоресценции (fold change)

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

MONNA – N-((4-метокси)-2-нафтил)-5-нитроантралиловая кислота

MQAE – N-(этоксикарбонилметил)-6-метоксихинолиния бромид

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

NPPV – 5-нитро-2-(3-фенилпропиламино)бензойная кислота

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

PKA – протеинкиназа A

PKC – протеинкиназа C

PKD – протеинкиназа D

PLC – фосфолипаза C

VRAC – анионные каналы, регулируемые объемом (volume-regulated anion channels)

AB3 – атриовентрикулярная задержка

ABU – атриовентрикулярный узел

АМФ – аденозинмонофосфат

АДФ – аденозиндифосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

АЦ – аденилатциклаза

АЦП – аналого-цифровой преобразователь

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

ВНС – вегетативная нервная система

ГМК – гладкомышечные клетки

ДАБ – двойная автономная блокада

ДПД₉₀ – длительность потенциала действия на уровне 90% реполяризации

ЗПА – зона первичной активации

ИС – изолированное сердце

ЛП – левое предсердие

МДД – медленная диастолическая деполяризация

МП (V_m) – мембранный потенциал

НА – норадреналин

ПД – потенциал действия

ПП – потенциал покоя

ПРБ – пробенецид

РВ-ПЦР – полимеразная цепная реакция в реальном времени

САУ – синоатриальный узел

СПД – спонтанные потенциалы действия

СПР – саркоплазматический ретикулум

ТВ – точка Венкебаха

ТПА – точка первичной активации

ТФ – транскрипционный фактор

УТФ – уридинтрифосфат

УДФ – уридиндифосфат

УМФ – уридинмонофосфат

ФЭ – фенилэфрин

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ЦНС – центральная нервная система

ЧСС – частота сердечных сокращений

ЭГ – электрограмма

ЭРП – эффективный рефрактерный период

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Актуальность темы исследования

Среди заболеваний сердечно-сосудистой системы нарушения ритма сердца (аритмии) занимают одно из первых мест по распространенности. Аритмии часто обусловлены дисфункцией либо естественного доминантного ритмоводителя сердца – синоатриального узла (САУ), либо проводящей системы сердца, критически важной структурой которой является атриовентрикулярный узел (АВУ).

Известно, что как САУ, так и структуры атриовентрикулярного соединения (АВУ и его периферические участки) имеют богатую иннервацию, включающую парасимпатический и симпатический компоненты вегетативной нервной системы (ВНС). Общеизвестно, что активация симпатического отдела ВНС способствует усилению автоматии САУ и «облегчению» проведения возбуждения в АВУ. Положительный хронотропный эффект при симпатической стимуляции обусловлен изменением ритма, генерируемого пейсмекером сердца, а положительный дромотропный – влиянием на атриовентрикулярное проведение.

К настоящему времени накоплен значительный объем данных, указывающих на то, что чрезмерная активность симпатического отдела ВНС, а также стимуляция адренорецепторов проводящей системы сердца могут приводить к нарушению ее нормальной работы. Эти нарушения включают в себя дисфункцию САУ, различного рода блокады проведения возбуждения в АВУ, АВ-узловые re-entry, а также тахикардии, основанные на усилении патологической автоматии АВУ.

Считается, что симпатические эффекты в ритмоводителе сердца и его проводящей системе опосредуются адренорецепторами β -типа (β -АР) и, соответственно, внутриклеточными сигнальными каскадами, сопряженными с этими рецепторами. В то же время, постсинаптические адренорецепторы α_1 -типа (α_1 -АР) также играют важную роль в адренергической регуляции активности различных тканей [O'Connell et al., 2014], не уступая по значимости β -АР. Уровень экспрессии α_1 -АР в САУ и АВУ, их роль в физиологической регуляции работы сердца, а также молекулярные мишени их сигнальных каскадов в ритмоводителе и проводящей системе сердца остаются крайне малоизученными. Остаются не установленными ключевые факторы и ионные механизмы, связанные с адренергической модуляцией, особенно с вовлечением α_1 -АР, приводящие к нарушению нормальной электрической активности САУ и АВУ.

Помимо САУ, различные структуры сердца, такие как миокард устьев легочных вен, кардиомиоциты коронарного синуса и периферии атриовентрикулярных клапанов, также демонстрируют пейсмекерные свойства [Dobrzynski et al., 2013; Ivanova, Kuzmin, 2018]. 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 различий в электрофизиологических эффектах активации α_1 -АР в САУ и АВУ может помочь в решении этой проблемы.

Достоверно известно, что активация симпатических постганглионарных окончаний, помимо выделения основного нейромедиатора, норадреналина (НА), сопровождается высвобождением целого ряда комедиаторов, или котрансмиттеров, также локализованных в везикулах терминалей нервных клеток. В сердце млекопитающих в качестве «симпатических комедиаторов» могут выступать следующие соединения: нейропептид Y, аденозинтрифосфат (АТФ), аденозин [Burnstock, 2013], оксид азота (NO), никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺) и диаденозиновые полифосфаты. Однако именно пуриновые комедиаторы – АТФ и НАД⁺ – в наибольшей степени дополняют и модифицируют адренергические эффекты при активации симпатического отдела ВНС, тем самым изменяя характер клеточного ответа на симпатическую стимуляцию [Pustovit et al., 2019; Пустовит К.Б., Иванова А.Д., Кузьмин В.С., 2018].

Роль пуриновых комедиаторов в регуляции адренергического контроля гладкомышечных стенок сосудов и полых органов хорошо изучена. Кроме того показано, что нуклеотидные комедиаторы принимают участие в контроле электрической и сократительной активности рабочего миокарда предсердий и желудочков крыс, 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 α_1 -АР.

В основе эффектов стимуляции α_1 -АР и P2-рецепторов в сердце может лежать целый спектр тканевых и молекулярных механизмов, которые могут быть связаны с активацией «классических» внутриклеточных сигнальных каскадов, основными элементами которых являются инозитолтрифосфат (IP_3), цитоплазматический кальций ($[Ca^{2+}]_i$), протеинкиназы семейства С (PKC). Однако, как указано выше, основные конечные молекулярные мишени этих сигнальных каскадов в САУ и АВУ остаются неизвестными.

К настоящему времени накапливаются сведения, согласно которым механизм реализации α_1 -адренергических эффектов в гладкомышечных клетках и в ряде тканей другого типа обусловлен не столько повышением $[Ca^{2+}]_i$ и Са-зависимой деполяризацией, сколько усилением хлорной трансмембранной проводимости, активацией хлорных ионных каналов и трансмембранных переносчиков хлора [Kostyunina et al., 2020]. Однако роль хлорной проводимости в контроле электрофизиологических свойств кардиомиоцитов ритмоводителя и проводящей системы сердца практически не изучена. Также не исследован вклад хлорной трансмембранной проводимости в реализацию α_1 -адренергических эффектов в САУ и АВУ.

Имеются крайне противоречивые сведения об уровне цитоплазматического (внутриклеточного) хлора ($[Cl^-]_i$), одного из основных потенциал-образующих ионов в клетках доминантного пейсмекера и проводящей системы сердца. $[Cl^-]_i$ имеет крайне 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 (симпортеров) калия и хлора (KCC) и натрия, калия и хлора (NKCC). Соотношение уровней их экспрессии определяет возбудимость нейронов на разных стадиях онтогенеза [Meor Azlan, Zhang, 2020]. Показано, что эти два переносчика подвержены реципрокной регуляции со стороны α_1 -АР [Modi et al., 2023]. Экспрессия вышеуказанных транспортеров, их роль в регуляции электрической активности пейсмекерной ткани сердца, а также вовлеченность в реализацию α_1 -адренергических эффектов в САУ практически не изучена.

Также в недавних исследованиях было показано, что некоторые из белковых структур, демонстрирующих хлорную проводимость, обладают механочувствительностью

и участвуют в регуляции клеточного объема при изменении осмолярности внеклеточной среды [Mitrokhin et al., 2023]. Тем не менее влияние механочувствительной хлорной проводимости на биоэлектрическую активность миокарда, демонстрирующего пейсмекерные свойства, также не исследована.

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.

1.2. Степень разработанности темы

Специализированные поперечнополосатые мышечные клетки, кардиомиоциты, формируют основную мышечную часть стенки предсердий и желудочков сердца [Woodcock, Matkovich, 2005], называемую миокардом. Известно, что в сердце млекопитающих животных и человека кардиомиоциты представляют собой крайне гетерогенную популяцию клеток, среди которых можно выделить две категории.

К первой группе относятся клетки «рабочего» миокарда желудочков и предсердий, демонстрирующие типичные сократительные и электрофизиологические свойства. Ко второй группе относятся «нетипичные» (или «атипичные») кардиомиоциты. Со времен работ Кейта и Флака [Keith, Flack, 1907], первооткрывателей доминантного ритмоводителя сердца и АВУ, а также в соответствии с работами Сунао Тавары [Almeida De et al., 2020; Aumüller, 2019], кардиомиоциты этих структур принято относить к «нетипичным», или, по меньшей мере, отделять от категории клеток, формирующих сократительный миокард. «Нетипичными» являются кардиомиоциты, формирующие пейсмекерные клетки эктопических очагов автоматии и клетки элементов желудочковой проводящей системы. Вторая группа кардиомиоцитов также не является однородной: их гетерогенность связана с происхождением от разных клеточных клонов, принадлежащих к разным кардиогенным полям, с различным тканевым окружением и локальным действием морфогенетических

факторов. В ходе эмбрионального развития предшественники кардиомиоцитов начинают экспрессировать специфические наборы транскрипционных факторов (ТФ). В результате «программирующего» действия ТФ кардиомиоциты второй группы экспрессируют определенный набор белков ионных каналов, обменников и транспортеров, а также белков круговорота внутриклеточного кальция. Кроме того, за счет действия ТФ кардиомиоциты приобретают специфический профиль мембранных рецепторов и внутриклеточных сигнальных путей.

Все кардиомиоциты второй группы демонстрируют в той или иной степени «пейсмекерный» электрофизиологический фенотип, что означает наличие у них способности к автоматии. Однако в результате пре- и постнатального профилирования отдельные группы кардиомиоцитов приобретают специализированные свойства, позволяющие формировать ткани проводящей системы сердца, такие как САУ, АВУ, эндокардиальные волокна Пуркинье и пр. К настоящему времени, благодаря развитию высокопроизводительных технологий анализа транскриптома и протеомики, становится очевидно, что отличия «нетипичных» кардиомиоцитов от кардиомиоцитов сократительного миокарда не ограничиваются уровнем экспрессии нескольких ключевых белков ионных каналов или «мажорных» мембранных рецепторов. Эти различия охватывают множество молекул, которые формируют трансмембранную проводимость и определяют чувствительность клеток к нейромедиаторам. Более того, существенные различия в экспрессии белков «электрофизиологического профиля» и мембранных рецепторов могут наблюдаться между небольшими группами кардиомиоцитов, например, клетками центральной части и периферии САУ. Такие различия могут являться причиной выраженной функциональной неоднородности и определять локальные особенности электрофизиологии ткани, а также проявляться в разнонаправленном действии эндогенных регуляторных и нейрогормональных факторов, фармакологических соединений и определять разную степень ремоделирования и дисфункции при развитии патологий.

Следует отметить, что для целого ряда важнейших мембранных белков кардиомиоцитов различия в экспрессии выявляются на уровне отделов проводящей системы сердца, например между САУ и АВУ. Известно, что такая структура сердца как АВУ является эволюционно новой и характерна только для эндотермных животных (млекопитающих и птиц), демонстрирующих высокую частоту сердечных сокращений (ЧСС). К настоящему времени установлен паттерн ТФ, определяющих фенотип клеток АВУ [Anderson et al., 2018]; показано, что паттерн ключевых ТФ в САУ и АВУ различается.

АВУ является столь же критически важной структурой для функционирования сердца млекопитающего, как и доминантный ритмоводитель. Тем не менее, многие особенности реализации электрической активности кардиомиоцитов зрелого АВУ, а также механизмы нервного контроля этой активности не выявлены.

Хорошо известно, что кардиомиоциты центральной части САУ и АВУ лишены экспрессии потенциал-чувствительных натриевых каналов Nav1.5, а также калиевых каналов аномального выпрямления семейства 2 (Kir2.x), формирующих реполярирующий ток, необходимый для стабилизации потенциала покоя (ПП). Миокардиальная ткань этих участков сходна по профилю экспрессии белков щелевых контактов: в обеих структурах отсутствуют коннексины высокой проводимости Cx40 и Cx43, а электрическое сопряжение обеспечивается преимущественно коннексинами Cx45, что способствует медленному проведению возбуждения в данной ткани. Однако различия в целом ряде электрофизиологически значимых молекул между САУ и АВУ не установлены. 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_{to2}), обнаруживаемых в сердце [Duan, 2013]. Кроме того, установлены молекулярные механизмы регуляции $[Cl^-]_i$ и хлорного равновесного потенциала (E_{Cl}) посредством хлорных котранспортеров (KCC, NKCC1) и хлор-бикарбонатных обменников [Modi et al., 2023]. Известно, что профиль экспрессии хлорных трансмембранных переносчиков определяется балансом продукции таких ТФ кардиомиоцитов как Nkx2.5/GATA4, Shox, TBX3, 5, 18, 20 [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.

Впервые пуриновые соединения как физиологические регуляторы упоминаются в начале XX века. В 1920-х годах было показано, что адениновые соединения могут регулировать активность сердца. Друри и др. [Drury, Szent-Györgyi, 1929] продемонстрировали, что аденозин и аденозинмонофосфат (АМФ) замедляют ритм сердца, а также подавляют проведение возбуждения в АВУ. Во второй половине XX века стало очевидно, что среди целого ряда пуринов наиболее распространенными эндогенными

физиологическими регуляторами являются аденозин и АТФ: были обнаружены специальные механизмы регулируемого высвобождения АТФ из нервных окончаний, а также механизмы накопления и деградации этих соединений в ткани [Burnstock, Dumsday, Smythe, 1972]. Также было установлено, что мишенями АТФ являются специфические мембранные пуриновые рецепторы. В 1980-х годах АТФ и другие пурины были признаны медиаторами новой полноценной регуляторной «неадренергической», «нехолинергической» системы, названной впоследствии пуринергической системой [Burnstock, 2014], а также комедиаторами адренергической нейротрансмиссии. К настоящему времени 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. Однако механизмы действия и мишени пуриновых котрансмиттеров в кардиомиоцитах САУ и АВУ остаются не до конца установленными.

Система адренергической регуляции сердца включает симпатические нервы, катехоламиновые нейромедиаторы (адреналин, НА) и рецепторы катехоламинов. Согласно общепринятым представлениям, существует 3 семейства адренорецепторов: α_1 , α_2 и β [Brodde, Michel, 1999]; в миокарде преобладают β -АР (около 85% всех адренорецепторов). Известно, что β -АР присутствуют во всех отделах сердца – рабочем миокарде предсердий и желудочков, а также в проводящей системе [Riemann et al., 2003]. β_1 -АР являются основными β -АР сердца, и именно эти рецепторы определяют «классические» симпатические эффекты: положительный хронотропный, дромотропный и инотропный эффекты. Основной объем исследований, касающихся адренергической регуляции работы сердца, направлен на изучение β -АР и сигнализации посредством этих рецепторов. Установлено, что, помимо β_1 -АР, в сердце экспрессируются рецепторы α_1 - и α_2 -типа. Доля постсинаптических α_1 -АР рецепторов в сердце человека составляет до 10-15% от всех АР [Brodde, Michel, 1999]. Однако остается неизвестным, какая часть этих рецепторов экспрессируется гладкомышечными клетками (ГМК) стенки коронарных сосудов, а какая – кардиомиоцитами. Тем не менее, установлено, что α_1 -АР обнаруживаются не только в плазматической, но и в ядерной мембране кардиомиоцитов. Предполагается, что α_1 -АР играют важную роль 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]. Роль α_1 -АР в быстрой регуляции биоэлектрической активности САУ и АВУ, а также внутриклеточные мишени α -адренергической сигнализации в кардиомиоцитах доминантного ритмоводителя и проводящей системы сердца остаются не исследованными. Сведения о вовлеченности хлорной проводимости в реализацию α -адренергических эффектов позволяют предположить значительные тканевые (локальные) различия этого регуляторного механизма.

Таким образом, накопленные к настоящему моменту знания позволяют обосновать фундаментальную значимость и актуальность исследования роли α_1 -адренергической и сопряженной с ней P2-пуринергической сигнализации в реализации физиологической функции ключевыми элементами проводящей системы сердца: синоатриальным и атриовентрикулярным узлами.

В связи с вышесказанным, **цель** представленной работы сформулирована следующим образом: изучить механизмы контроля и модуляции биоэлектрической активности синоатриального и атриовентрикулярного узла сердца, обусловленные активацией α_1 -адренорецепторов или P2-пуриновых рецепторов и выяснить роль трансмембранного транспорта хлорид-анионов в реализации эффектов активации α_1 - и P2-рецепторов.

1.3. Задачи исследования

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

1. Установить уровень экспрессии α_1 -адренорецепторов и P2-пуриновых рецепторов в САУ и АВУ на уровне мРНК или белка.
2. Определить в САУ и АВУ уровень мРНК хлорных ионных каналов и трансмембранных переносчиков хлора как потенциальных мишеней сигнальных каскадов α_1 -адренорецепторов и P2-пуриновых рецепторов.
3. Выявить и сопоставить эффекты, наблюдаемые при активации α_1 -адренорецепторов в САУ и АВУ.
4. Выявить и сопоставить эффекты, наблюдаемые при активации P2-рецепторов пуриновыми медиаторами 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 α_1 -адренорецепторов в САУ и АВУ.
6. Изучить вовлеченность катион-хлорных трансмембранных симпортеров в реализацию эффектов, наблюдаемых при стимуляции α_1 -адренорецепторов в САУ.

1.4. Научная новизна исследования

В данной работе впервые проведено комплексное систематическое исследование эффектов, опосредуемых α_1 -АР в ткани САУ и АВУ. В рамках исследования были впервые изучены потенциальные молекулярные внутриклеточные механизмы, лежащие в основе эффектов активации α_1 -АР в САУ и АВУ. Представленная работа впервые позволила получить сведения о вовлеченности молекул, обладающих хлорной проводимостью, в контроль электрофизиологических свойств пейсмекерной ткани сердца, а также установить их роль, как мишеней внутриклеточных сигнальных каскадов, сопряженных с α_1 -АР.

В частности, в работе впервые проведена оценка уровня мРНК α_{1A} -АР в ткани синоатриального и атриовентрикулярного узлов. Впервые с помощью методов иммунофлуоресценции прямо продемонстрирована локализация α_{1A} -АР в кардиомиоцитах САУ и АВУ, а также в кардиомиоцитах пучка Гиса. Впервые показано, что в кардиомиоцитах пейсмекера и элементах проводящей системы имеется две популяции α_{1A} -АР, а именно популяции рецепторов плазматической и ядерной мембраны.

Впервые проведена оценка количества зрелой мРНК хлорных ионных каналов (ClC-2, ClC-3, TMEM16A, LRRC8A) в предсердном миокарде, миокардиальной ткани САУ и АВУ. Помимо вышесказанного, в работе впервые получены сведения об уровне мРНК основных трансмембранных транспортеров (KCC1, NKCC1) САУ и АВУ. Полученные сведения впервые позволили подтвердить наличие молекулярного субстрата, обуславливающего эффекты α -адренергической стимуляции в ритмоводителе и проводящей системе сердца. Кроме того, в работе впервые выявлено значение внутриклеточной концентрации хлора в миокарде предсердия и САУ.

В работе впервые проведена количественная оценка мРНК пуриновых P2-рецепторов, а также сопоставлены эффекты активации агонистов пуриновых P2-рецепторов в САУ и АВУ. Впервые продемонстрировано сходство эффектов активации P2-рецепторов в АВУ сердца, на основе чего предложена гипотеза о сходстве конечных молекулярных мишеней сигнальных каскадов этих рецепторов.

В настоящей работе впервые установлено, что изменение автоматической активности САУ, вызванное колебаниями осмолярности внеклеточной среды, обусловлено активацией или подавлением активности трансмембранных переносчиков хлора KCC1 и NKCC1, то есть реализуется с частичным вовлечением тех же молекулярных механизмов, что и при активации α_{1A} -АР.

В работе впервые прямо показано, что активация α_{1A} -АР, а также изменение осмолярности внеклеточной среды сопровождается изменением цитоплазматической концентрации анионов хлора.

В целом в представленной работе впервые продемонстрировано, что α_1 -адренергическая компонента симпатической нейротрансмиссии играет значимую роль в формировании нормальной регуляции и физиологическом функционировании двух ключевых отделов проводящей системы сердца – доминантного ритмоводителя (САУ) и АВУ – структуры, интегрирующей предсердный и желудочковый миокард.

1.5. Теоретическая и практическая значимость исследования

Результаты работы обладают теоретической, фундаментальной и практической значимостью. Теоретическая значимость состоит в том, что в представленном исследовании 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. Кроме того, в работе установлена вовлеченность хлорного трансмембранного переноса в опосредовании α -адренергических эффектов и эффектов, определяемых изменением осмолярности в ткани САУ. Эти ранее не изученные эффекты, вероятно, являются общими для всех млекопитающих животных, в том числе человека.

Теоретическая значимость работы определяется несколькими выявленными и изученными аспектами адренергической регуляции электрофизиологии проводящей системы сердца. Первый из этих аспектов связан с разнонаправленным характером α -адренергических эффектов в САУ и АВУ, обусловленных экспрессируемыми α_{1A} -АР («облегчением» и подавлением проведения возбуждения, соответственно). Второй аспект касается установления α_1 -адренорецепторной природы блоков проведения возбуждения в АВУ при симпатической стимуляции. Описанные феномены позволили выдвинуть гипотезу о фундаментальной роли α_1 -АР в проводящей системе сердца, согласно которой α_1 -АР способствуют координации электрофизиологических свойств САУ и АВУ при высокой частоте сердечных сокращений.

Полученные результаты существенно расширяют представления о симпатической регуляции работы ритмоводителя сердца и его проводящей системы, реализуемой НА и пуриновыми медиаторами адренергической нейротрансмиссии. Новое направление в

области фундаментальной электрофизиологии сердца, которые позволяют сформулировать результаты работы, связано с обнаруженной ролью транспортеров хлора КСС и НКСС в работе САУ и выявленным ионным механизмом влияния осмолярности внеклеточной среды на ритм, генерируемый пейсмекером сердца.

Практическая значимость настоящей работы связана с неуклонным ростом встречаемости в популяции нарушений ритма сердца, таких как синдром слабости синусового узла, атриовентрикулярные брадиаритмии и блокады. С прикладной точки зрения результаты работы открывают возможность поиска способов терапии вышеуказанных патологий с помощью воздействия на отдельные популяции α_1 -АР сердца. Результаты данной работы также способствуют поиску фармакологических средств, мишенями которых могут быть хлорные ионные каналы и транспортеры сердца.

1.6. 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 гиперосмотическими растворами, а также фармакологический анализ для выяснения роли и типов 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 мРНК ключевых белков, определяющих анионный трансмембранный транспорт, α_1 -адренергический и пуриновый сигналинг в кардиомиоцитах. Иммунофлуоресцентную микроскопию использовали для идентификации в криосрезах САУ и элементов проводящей системы сердца (а) α_{1A} -аденорецепторов и (б) белков Cav3 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 $[Ca^{2+}]_i$ в многоклеточных препаратах использовали (9) меркуриметрический метод.

Электрофизиологические эксперименты проведены с использованием ИС и тканевых препаратов его различных участков (правое и левое предсердия, САУ, АВУ), полученных от взрослых самцов крыс. 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.

1.7. 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 от автора по запросу.

Статистическая обработка экспериментальных данных выполнена с использованием стандартных методов, в том числе дисперсионного анализа с последующими апостериорными тестами и непараметрическими тестами; эксперименты и результаты, представленные в работе, воспроизводимы. Результаты исследования представлены для ознакомления научному сообществу и опубликованы в рецензируемых научных журналах. В литературном обзоре используются современные сведения, опубликованные в специализированных научных журналах и изданиях. Гипотезы и механизмы феноменов, предложенные при обсуждении полученных результатов, опираются на общепринятые в научном сообществе концепции, а также классические представления мембранной теории. В работу вошли исследования, выполненные при поддержке Российского научного фонда (проект №22-15-00189). Результаты работы одобрены экспертами Российского научного фонда.

1.8. Публикации

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи (в журналах, индексируемых РИНЦ, RSCI, Web of Science, Scopus) и 11 тезисов в сборниках докладов всероссийских и международных научных конференций.

1.9. Апробация материалов научно-квалификационной работы

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).

Апробация диссертационной работы была проведена на заседании кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова 8 октября 2024 года.

1.10. Положения, выносимые на защиту

1. В синоатриальном (САУ), а также в атриовентрикулярном (АВУ) узлах сердца экспрессируются α_1 -адренорецепторы и P2-рецепторы.
2. В ткани САУ и АВУ на уровне мРНК показана экспрессия генов, кодирующих хлорные ионные каналы и катион-хлорные симпортеры.
3. Активация α_1 -адренорецепторов способствует поддержанию пейсмекерной функции САУ. Активация α_1 -адренорецепторов АВУ приводит к подавлению проведения возбуждения, что способствует возникновению АВ-узловых аритмий. Таким образом, эффекты активации α_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 АБУ. Подавление хлорной проводимости способствует уменьшению выраженности эффектов, сопровождающих активацию α_1 -адренорецепторов в САУ, но не в АБУ.
6. Катион-хлорные симпортеры вовлечены в контроль автоматии САУ. Активация α_1 -адренорецепторов приводит к изменению функционирования катион-хлорных трансмембранных симпортеров САУ.

1.11. Личный вклад автора

Личный вклад соискателя Вороной Я. А. 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, 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, подготовку текста диссертации.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Проводящая система сердца млекопитающих

Проводящая система сердца состоит из водителей ритма (пейсмекеров) разного порядка, обеспечивающих автоматическую активность. Основными компонентами проводящей системы сердца являются САУ, АВУ, а также пучок Гиса и волокна Пуркинье. В нормальных физиологических условиях функционирование проводящей системы сердца организовано согласно иерархическому принципу: все структуры проводящей системы находятся в подчинении у доминантного ритмоводителя сердца – САУ, который генерирует ритм с наибольшей частотой.

2.1.1. Анатомические и физиологические особенности САУ сердца млекопитающих

Благодаря множеству исследований с момента открытия САУ Кейтом и Флаком в 1907 г. [Keith, Flack, 1907] в настоящее время значительно увеличилось понимание его электрофизиологических и молекулярных механизмов функционирования [Boyett, Honjo, Kodama, 2000; Chandler et al., 2009; Lakatta, Maltsev, Vinogradova, 2010; Noble, 1960], а также его клеточной и тканевой организации у млекопитающих, включая человека [Chandler et al., 2009; Dobrzynski et al., 2013; James, 1961]. В настоящее время очевидно, что САУ является крайне гетерогенной и сложно организованной тканевой структурой.

САУ млекопитающих локализуется в стенке правого предсердия между устьями верхней и нижней полых вен (в межвенной области). Характерной особенностью САУ является большое количество соединительной ткани, представленной в основном волокнами коллагена и фибробластами [Dobrzynski et al., 2013]. Клетки САУ невелики по сравнению с окружающими предсердными клетками и не имеют четко выраженной структурной организации. В центральной части САУ выявляются клетки Р-типа [James, 1961], которые, помимо маленького размера, содержат небольшое количество не организованных в миофибриллы миофиламентов [Boyett, Honjo, Kodama, 2000]. Кроме того, типичные узловы клетки имеют меньше митохондрий и саркоплазматического ретикулула (СПР) по сравнению с кардиомиоцитами сократительного миокарда [Boyett, Honjo, Kodama, 2000], а у некоторых видов животных было выявлено большое количество кавеол на клеточной мембране кардиомиоцитов центральной части САУ [Alings et al., 1990; Bleeker et al., 1980; Opthof et al., 1985; Opthof et al., 1986; Opthof et al., 1987].

Между клетками центральной части САУ, обладающими «истинной» пейсмекерной активностью, и кардиомиоцитами рабочего миокарда расположены клетки переходного

морфологического и электрофизиологического фенотипа. Эти клетки обеспечивают проведение возбуждения к рабочему миокарду и характеризуются «латентной» пейсмекерной активностью. Скорость проведения возбуждения в САУ очень низкая (0.03-0.05 м/с) по сравнению со скоростью распространения возбуждения в сократительном миокарде (1 м/с). Эта скорость определяется множеством факторов, самым важным из которых является электрическая сопряженность клеток друг с другом. Соответственно, низкая скорость проведения возбуждения в САУ подтверждает низкую электрическую сопряженность клеток, которая обеспечивается щелевыми контактами, образованными коннексаонами. Каждый коннексон состоит из 6 трансмембранных белков, называемых коннексинами. Известно, что в сердце на уровне мРНК экспрессируется несколько типов коннексинов: Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 и Cx46 [Haefliger et al., 1992; Kanter, Saffitz, Beyer, 1990; Reed et al., 1993]. Разный уровень экспрессии коннексинов в проводящей системе сердца и в рабочем миокарде обеспечивает различную скорость проведения, что необходимо для нормального распространения волны возбуждения и согласованного сокращения камер сердца. Например, экспрессия Cx43 характерна для предсердного и желудочкового рабочего миокарда [Boyett, Honjo, Kodama, 2000].

Автоматическая активность ритмоводителей сердца обусловлена спонтанной генерацией потенциалов действия (ПД) в пейсмекерах сердца, что связано с их уникальным электрофизиологическим фенотипом [Кузьмин, Каменский, 2021]. В пейсмекерных кардиомиоцитах, помимо специфических белков щелевых контактов, экспрессируется уникальный набор ионных каналов, транспортеров и обменников. Главной особенностью электрической активности пейсмекерных клеток является спонтанный сдвиг мембранного потенциала (МП или V_m) к значению, необходимому для возникновения ПД. Такой сдвиг МП называется медленной диастолической деполяризацией (МДД). Помимо фазы МДД, особенностями пейсмекерных клеток по сравнению с кардиомиоцитами рабочего миокарда являются отсутствие фазы быстрой деполяризации и медленное нарастание скорости переднего фронта ПД. Кроме того, в клетках узлов автоматии наблюдается более положительное значение МП (-50-60 мВ) по сравнению с рабочим миокардом (-80 мВ), что способствует спонтанной деполяризации [Satoh, 2003].

Электрофизиологические особенности пейсмекерного миокарда определяются совокупностью различных факторов. Например, для клеток пейсмекерного миокарда характерно снижение плотности каналов калиевого тока аномального выпрямления I_{K1} [Irisawa, Brown, Giles, 1993; Noma et al., 1984], который вносит значительный вклад в

формирование и поддержание потенциала покоя (ПП) в кардиомиоцитах рабочего миокарда [Atkinson et al., 2013; Lopatin, Nichols, 2001; Monfredi et al., 2010]. Кроме того, в отличие от кардиомиоцитов сократительного миокарда, где деполяризация происходит благодаря потенциал-зависимым натриевым каналам, формирующим I_{Na} , в пейсмекерных клетках основными деполяризующими токами являются кальциевые токи (I_{CaL} и I_{CaT}).

Способность пейсмекерных клеток к автоматии обеспечивается двумя основными механизмами: «мембранными часами» и «кальциевыми часами». Мембранные часы связаны с работой мембранных ионных каналов и транспортеров, таких как кальциевые каналы (I_{CaL} и I_{CaT}), каналы HCN (I_f), а также Na^+/Ca^{2+} обменники (I_{NCX}). В свою очередь, механизм «кальциевых часов» основан на спонтанном высвобождении внутриклеточного Ca^{2+} из СПР через рианодиновые рецепторы.

2.1.2. Анатомические и физиологические особенности АВУ сердца млекопитающих

В настоящее время в большей степени изучен САУ – естественный доминантный пейсмекер сердца. Другие структуры сердца, обладающие пейсмекероподобными свойствами, такие как участки желудочковой проводящей системы и АВУ, исследованы недостаточно. На данный момент представление о механизмах функционирования АВУ активно дополняется.

АВУ является единственным участком сердца, формирующим электрическую связь предсердий и желудочков. Основная функция АВУ заключается в медленном проведении ПД от предсердий к желудочкам, что создает временную задержку между систолами предсердий и желудочков. Эта задержка обеспечивает заполнение желудочков кровью перед началом их систолы. Кроме того, относительно длительный рефрактерный период АВУ защищает желудочки от предсердных тахикардий, таких как мерцательная аритмия и очаговая предсердная тахикардия, снижая частоту ПД, передаваемых в желудочки. Наконец, в случае, если синусовый узел перестает выполнять свои функции, АВУ может взять на себя функции водителя ритма, хоть и с меньшей скоростью, чем САУ [Dobrzynski et al., 2013].

АВУ расположен у основания межпредсердной перегородки, в верхушке области, известной как треугольник Коха [Anderson et al., 2009; Ko et al., 2004; Li et al., 2008]. Треугольник ограничен устьем коронарного синуса, сухожилием Тодаро и септальной створкой трехстворчатого клапана (Рисунок 1 А). Недавние исследования показали наличие различных структур в АВУ, отличающихся по молекулярным, гистологическим и

электрофизиологическим характеристикам. В АВУ выделяют компактную часть и нижнюю ножку. Компактная часть АВУ представляет собой клеточную структуру, состоящую из мелких «переплетающихся» клеток, которые заметно отличаются от рабочего миокарда предсердий [Petrecca, Shrier, 1998]. Клетки компактной части АВУ, также как и клетки центральной части САУ, имеют меньшее электрическое сопряжение по сравнению с миокардом предсердий и демонстрируют очень низкий уровень экспрессии Sx43. Нижняя ножка АВУ обладает отличными от компактной части морфологическим и электрофизиологическим фенотипами. В отличие от компактной части, в нижней ножке АВУ клетки длиннее и расположены параллельно друг другу. Проксимально к нижней ножке находится нижнее АВ-узловое расширение (Рисунок 1 Б), которое у человека делится на правое и левое нижнее узловое расширения [Hucker, Nikolski, Efimov, 2007].

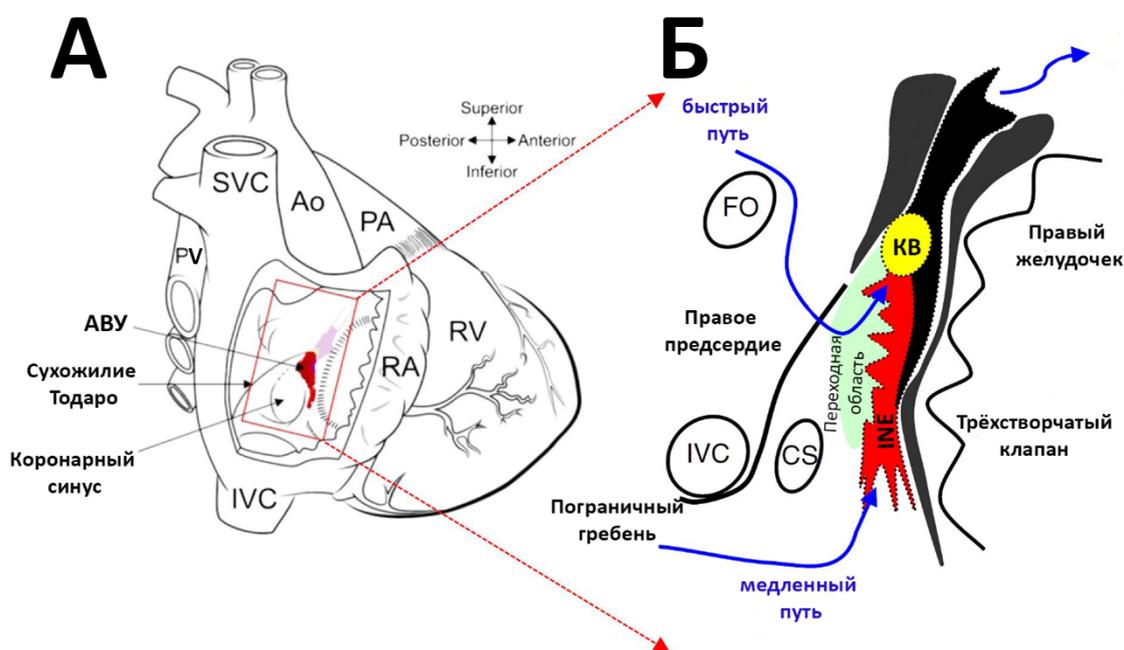


Рисунок 1. Схематические изображения сердца кролика (А) и его атриовентрикулярного соединения (Б). Ao – аорта, KB – компактное вещество, FO – овальная ямка, IVC – нижняя полая вена, PA – легочная артерия, PV – легочная вена, RA – правое предсердие, RV – правый желудочек, SVC – верхняя полая вена, INE – нижнее АВ-узловое расширение. С изменениями из [Saeed et al., 2018].

Клетки АВУ, как и клетки САУ, имеют менее отрицательный ПП и более медленную деполяризацию. В настоящее время в АВУ выделяют три основных электрофизиологических типа клеток: атрионодальные (atrionodal, AN клетки), узловые (nodal, N клетки) и nodo-His (NH) клетки [Billette, 1987; Carvalho de, Almedia de, 1960]. N-клетки обладают пейсмекерной активностью, медленной фазой деполяризации, более положительным значением мембранного потенциала и меньшей амплитудой ПД. При

комбинированном электрофизиологическом и морфологическом анализе N-клетки, как правило, соответствуют клеткам компактной части АВ-узла. AN-клетки обладают переходным электрофизиологическим фенотипом между рабочим миокардом предсердия и N-клетками, значение их МП является более отрицательным по сравнению с N-клетками, а амплитуда ПД и скорость деполяризации у них выше. AN-клетки в АВУ соответствуют клеткам переходной зоны. NH-клетки обладают промежуточными электрофизиологическими характеристиками между N-клетками и клетками пучка Гиса, что соответствует клеткам нижней ножки пучка АВУ [Sano, Tasaki, Shimamoto, 1959].

Приведенная выше классификация основывается на различных электрофизиологических свойствах клеток АВУ, что обусловлено разным уровнем экспрессии мембранных ионных каналов и транспортеров. Было показано, что каналы HCN, через которые течет ток I_f обнаруживаются в N-клетках и отсутствуют в AN- и NH-клетках [Hancox, Levi, 1994]. Натриевый ток I_{Na} представлен во всех AN- и NH-клетках и отсутствует в большинстве N-клеток [Munk et al., 1996], в которых за формирование фронта потенциала действия отвечают кальциевые токи через каналы L- и T-типа [Marionneau et al., 2005]. Так же, как и в центральной части САУ, в АВУ отсутствует калиевый ток аномального (входящего) выпрямления I_{K1} [Hancox, Levi, 1994; Hancox et al., 2003; Sato et al., 2000]. «Кальциевые часы» также играют важную роль в пейсмекерной функции АВУ [Nikmaram et al., 2008].

Наибольший уровень экспрессии среди белков щелевых контактов в АВУ характерен для коннексина Cx40 [Yoo et al., 2006], однако также в АВУ присутствуют коннексины Cx45 [Simon, Goodenough, Paul, 1998; Yuill, Hancox, 2002] и Cx30.2 [Corpen, Severs, Gourdie, 1999]. Для АВУ показана неоднородная экспрессия коннексина Cx43: его уровень низок в нижнем АВ-узловом расширении и компактной части АВУ, тогда как в нижней ножке АВУ экспрессия Cx43 значительно выше. АВУ демонстрирует декрементное проведение возбуждения, что способствует снижению проводимости при увеличении ритма работы предсердий. Атриовентрикулярная задержка (АВЗ) преимущественно возникает между AN- и N-клетками [Billette, 1987].

АВУ обладает «дуализмом» проведения возбуждения благодаря наличию быстрого и медленного путей проведения возбуждения (Рисунок 1 Б). Исследования на препаратах АВ-соединения показывают, что медленный АВ-узловой путь анатомически проходит через правое нижнее узловое расширение и его соединение с нижним узловым пучком [Maier et al., 2003; Marionneau et al., 2005]. В свою очередь, быстрый АВ-узловой путь менее

четко определен, но предположительно включает переходный миокард АВУ и его соединение с компактной частью АВ-узла [Marionneau et al., 2005]. Для этих двух путей характерна разная степень надежности проведения возбуждения.

Пучок Гиса образует анатомическое продолжение АВУ, откуда возбуждение распространяется по правой и левой ножкам пучка Гиса к волокнам Пуркинье, обеспечивая синхронное возбуждение и сокращение рабочего миокарда желудочков.

2.1.3. Патологические изменения структур проводящей системы сердца млекопитающих

Нарушения генерации возбуждения в САУ и проводимости в АВУ представляют собой серьезную причину заболеваемости и смертности во всем мире при сердечно-сосудистых патологиях. Дисфункция САУ возникает из-за аномальной автоматии и/или проводимости, вызванных различными патологическими состояниями, такими как фиброз, атеросклероз и воспалительные процессы. Идиопатический фиброз периферической части САУ ассоциирован с синдромом слабости синусового узла [Morris, Kalman, 2014]. Кроме того, фиброз может провоцировать блоки проведения возбуждения в САУ, что может стать причиной тахи-бради синдрома и остановки сердца [Glukhov et al., 2013]. Известно, что при патологическом ремоделировании САУ возрастает сопряжение фибробластов с миоцитами, что потенциально может привести к дисбалансу между деполяризацией и реполяризацией в САУ [Kamkin et al., 2002].

Синдром слабости синусового узла относится к клиническому синдрому, для которого характерны хроническая дисфункция, подавление генерации и проведения возбуждения в САУ [Sathnur, Ebin, Benditt, 2023]. Он включает в себя ряд аномалий, которые могут приводить к выраженной синусовой брадикардии, паузам синусового ритма, блоку выхода возбуждения из центральной части САУ на периферию и хронотропной недостаточности. Кроме того, может наблюдаться внутрисердечная задержка проводимости, нарушения проводимости в АВ-соединении и пароксизмальная тахикардия как часть тахи-бради синдрома [Manoj et al., 2023]. У пациентов с тахи-бради синдромом периодически возникают трепетание или фибрилляции предсердий, чередующиеся с паузами в синусовом ритме, что может приводит к обмороку.

Нарушения проведения в АВУ являются широко распространенными, часто сопровождаются и отягчают патологии сердечно-сосудистой системы, для которых характерны гипертрофические изменения миокарда. В общей популяции различные варианты аритмий, связанных с нарушением АВ-проведения встречаются почти у 10%

обследованных лиц, а среди пожилых людей этот показатель достигает 40%. Разнообразие внутриузловых путей проведения служит потенциальным аритмогенным субстратом. Из-за высокой гетерогенности АВ-соединения даже незначительные изменения в электрофизиологических свойствах могут вызвать нарушения АВ-проведения [Markowitz, Lerman, 2018], что приводит к развитию бради- и тахикардий. АВ-блокады проявляются в виде задержек или нарушений передачи электрического импульса от предсердий к желудочкам, что может негативно сказываться на гемодинамике и кровоснабжении органов, включая само сердце. Пациенты с выраженными нарушениями АВ-проведения, как правило, подвержены большому риску прогрессирующей асистолии, желудочковых аритмий, включая фибрилляцию и внезапная сердечная смерть [Kashou, Kashou, 2018].

2.2. Симпатическая и адренергическая регуляция работы сердца

Регуляция работы сердца осуществляется симпатическим и парасимпатическим отделами вегетативной нервной системы (ВНС) с помощью так называемых сердечных нервов, которые идут в миокард вдоль коронарных сосудов и заканчиваются на миоцитах и сосудах всех камер сердца [Kawashima, 2005]. В этом разделе будет представлена характеристика адренорецепторов и сопряженных с ними внутриклеточных каскадов миокарда, опосредующих эффекты симпатического отдела ВНС.

2.2.1. Структура, классификация и сопряженные сигнальные каскады миокардиальных адренорецепторов

В сердце симпатические эффекты реализуются за счет высвобождения нейромедиатора НА и сопутствующих комедиаторов постганглионарными нервными окончаниями. НА является агонистом адренорецепторов, которые подразделяются на α - и β -адренорецепторы [Bylund et al., 1994]. Эти рецепторы относятся к классу G-белок-сопряженных мембранных рецепторов (GPCRs) и представляют собой семидоменные трансмембранные белки с внеклеточным N-концевым и внутриклеточным C-концевым доменами (Рисунок 2). Эффекты активации адренорецепторов определяются аминокислотной последовательностью пятого и седьмого доменов [Latek et al., 2012]. Эндогенными агонистами адренорецепторов млекопитающих являются катехоламины: адреналин, вырабатываемый мозговым веществом надпочечников, и НА, который является медиатором центральной нервной системы (ЦНС) и симпатического отдела ВНС.

G-белок состоит из трех субъединиц: α , β и γ . При активации рецептора происходит гидролиз G-белка на α - и $\beta\gamma$ -субъединицы. α -субъединица является основной каталитической субъединицей, которая определяет тип G-белка. $\beta\gamma$ -субъединица также

вносит вклад в регуляцию сигнальных каскадов, воздействуя непосредственно на различные ионные каналы. Например, $\beta\gamma$ -субъединица может оказывать влияние на потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа, аденилатциклазы (АЦ) [Taussig et al., 1994], фосфолипазы C (PLC) [Dupré et al., 2009; Zhang et al., 1996], фосфоинозитид-3-киназы [Hamm, 1998; Tang, Downes, 1997] и митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК).

α_1 -адренорецепторы

α_1 -АР присутствуют во многих тканях и органах, включая гладкие мышцы, ЦНС и сердце. Существует три подтипа α_1 -АР: α_{1A} -, α_{1B} -, α_{1D} -, все из них связаны с $G_{q/11}$ -белком. У большинства видов животных (мыши, морские свинки, кролики, свиньи и коровы) уровень α_1 -АР в сердце имеет относительно одинаковое значение. В то же время у крыс он в 10 раз выше [Brodde, Michel, 1999]. Литературные данные об экспрессии разных подтипов α_1 -АР в сердце достаточно противоречивы. Исследования показали наличие мРНК α_{1A} -, α_{1B} - и α_{1D} -АР в сердце [Colucci, Wright, Braunwald, 1986], однако на уровне белка в кардиомиоцитах выявлены только α_{1A} - и α_{1B} -АР [O'Connell и др., 2003].

После активации α_1 -АР $G_{q/11}$ -субъединица стимулирует PLC $_{\beta}$. Это приводит к гидролизу фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (PIP $_2$), компонента клеточной мембраны, с образованием вторичных посредников - инозитолтрифосфата (IP $_3$) и диацилглицерола (DAG). В свою очередь, IP $_3$ связывается с рецепторами (IP $_3$ R) на мембране СПР, что приводит к повышению внутриклеточной концентрации кальция ([Ca $^{2+}$] $_i$) за счет его высвобождения из СПР [Ahles, Engelhardt, 2014; Pierpont et al., 1985]. Главной внутриклеточной мишенью DAG в кардиомиоцитах является семейство DAG-зависимых протеинкиназ C (PKC), относящихся к классу серин/треониновых киназ, широко распространенных в различных тканях и органах млекопитающих.

Семейство PKC делится на 3 группы: кальций-зависимые, кальций-независимые и атипичные, которые не зависят от кальция и DAG, но активируются фосфатидилсеринном. Показано, что в сердце имеются все три группы PKC [Pucéat, Vassort, 1996]. Мишенями PKC являются различные ионные каналы и транспортеры. Фосфорилирование субстратов PKC может обуславливать быстрые эффекты. В свою очередь, при активации PKC в сердце также могут реализовываться отставленные эффекты за счет регуляции транскрипции генов. Некоторые исследователи отмечают, что в сердце α_{1B} -АР могут быть ассоциированы также с G_i -белком [Steinberg, 2012].

Помимо мембранной локализации α_1 -АР могут располагаться в ядерной мембране клеток, в том числе и в кардиомиоцитах. Исследования на мышцах показали, что до 80%

α_1 -АР кардиомиоцитов располагаются на внутренней ядерной мембране [O'Connell et al., 2014; Wu et al., 2014]. Эффекты агонистов α_1 -АР на миокард имеют более длительный латентный период по сравнению с агонистами β -АР, которые локализуются исключительно в плазматической мембране. В частности, задержка эффектов активации α_1 -АР на миокард составляет порядка 2-5 минут, в то время как эффекты активации β -АР проявляются в течение секунд [O'Connell et al., 2014]. Было показано, что при действии фенилэфрина (ФЭ) на клеточные ядра в них активируется РКС [Wu et al., 2014]. Предполагается, что при стимуляции ядерных α_1 -АР активируется PLC ϵ , которая участвует в регуляции малых G-белков (Rho, Ras, Rap) и приводит к активации MAPK-киназного каскада [Lopez et al., 2001]. Кроме того, эффекты активации ядерных α_1 -АР также могут быть обусловлены активацией киназы ERK (extracellular signal-regulated kinase) в кавеолах на плазматической мембране [Wright et al., 2008]. Однако вопросы, касающиеся регуляции транскрипции генов при активации α_1 -АР и механизмов передачи сигнала из ядра в цитоплазму, остаются недостаточно изученными.

α_2 -адренорецепторы

α_2 -АР широко представлены в тканях и органах и участвуют в регуляции множества физиологических процессов [Ahles, Engelhardt, 2014]. Известно, что α_2 -АР расположены в мембране пресинаптической терминали, где их активация приводит к ингибированию выброса НА через механизм отрицательной обратной связи. Также было показано, что α_2 -АР находятся на мембране гладкомышечных клеток (ГМК), и их активация вызывает вазоконстрикцию [Badino, Odore, Re, 2005]. Данные о локализации α_2 -АР в сердце довольно противоречивы. Известно, что они располагаются на пресинаптической мембране симпатических нервных окончаний, иннервирующих сердечную мышцу. На данный момент считается, что α_2 -АР не экспрессируются в кардиомиоцитах [Badino, Odore, Re, 2005]. Однако некоторые исследования указывают на наличие минимального уровня экспрессии α_2 -АР в эндокарде [Berkowitz et al., 1994].

α_2 -АР включают в себя три подтипа: α_{2A} -, α_{2B} - и α_{2C} -АР, которые связаны с G $_i$ -белком. При активации G $_{\alpha i}$ -субъединицы происходит ингибирование АЦ, что приводит к снижению внутриклеточной концентрации циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) и, соответственно, активности протеинкиназы А (РКА). РКА фосфорилирует различные ферменты, ионные каналы и рецепторы, тем самым модулируя клеточные функции. Поскольку основные эффекты активации АР в кардиомиоцитах реализуются за счет активации α_1 - и β -АР, то эффекты активации и внутриклеточные каскады α_2 -АР миокарда

далее рассмотрены не будут.

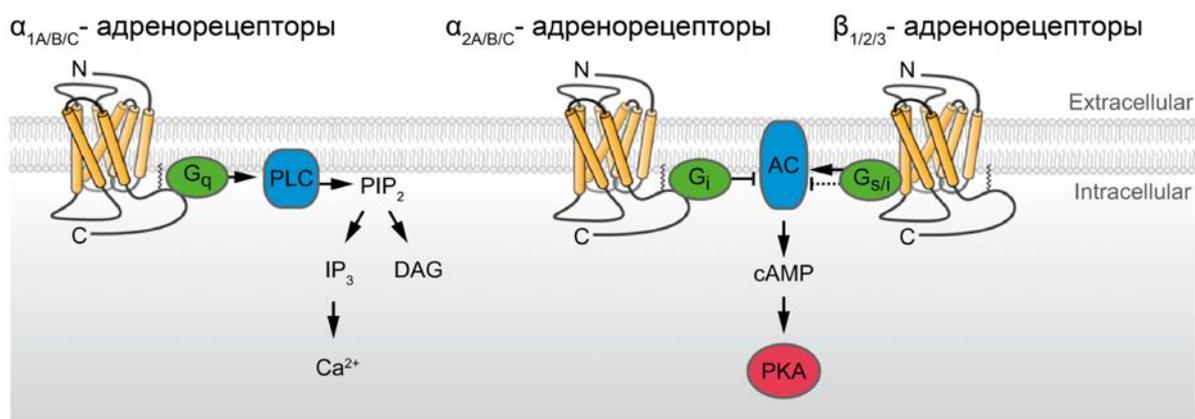


Рисунок 2. Молекулярные каскады передачи сигнала при активации адrenoцепторов разного типа. PLC – фосфолипаза C, IP_3 – инозитолтрифосфат, AC – аденилатциклаза, cAMP – цАМФ, PKA – протеинкиназа A. С изменениями по [Ahles, Engelhardt, 2014].

β -адrenoцепторы

β -АР, в частности β_1 -АР, считаются преобладающим типом АР как в рабочем предсердном и желудочковом миокарде, так и в проводящей системе сердца. Все подтипы β -АР (β_1 , β_2 и β_3) сопряжены с G_s -белком, $G_{s\alpha}$ -субъединица которого активирует АЦ. Это приводит к увеличению цитоплазматического уровня цАМФ и активации PKA. В миокарде PKA воздействует на множество мишеней, в частности, на кальциевые каналы L-типа [Bers, 2002]. В свою очередь цАМФ может напрямую стимулировать каналы HCN в пейсмекерном миокарде, тем самым активируя ток I_f . HA обладает большей селективностью к β_1 -АР по сравнению с β_2 -АР, в то время как для адреналина характерна одинаковая селективность к этим типам АР [Riemann et al., 2003]. Показано, что при длительной стимуляции β_2 -АР также могут переключаться на G_i -белок [Ahles, Engelhardt, 2014; Lymperopoulos, 2013]. Вероятно, такое переключение на ингибиторный G-белок играет кардиопротекторную роль.

Несмотря на то, что доминирующими β -АР сердца являются рецепторы первого подтипа, в кардиомиоцитах также имеются и β_2 - и β_3 -АР. Из-за значительных различий в уровне экспрессии разных подтипов β -АР эффекты активации β_2 - и β_3 -АР в миокарде являются менее значимыми по сравнению с эффектами активации β_1 -АР [Xiao et al., 2006]. Плотность β -АР в САУ человека в 3 раза превышает таковую в предсердиях [Rodefeld et al., 1996].

2.2.2. Эффекты активации миокардиальных адренорецепторов

Как β -, так и α -АР играют важную роль в регуляции биоэлектрической активности различных отделов сердца, в том числе и его проводящей системы. Эффекты активации β -АР миокарда хорошо изучены. Стимуляция β_1 - и β_2 -АР вызывает положительные хронотропный, инотропный и луситропный эффекты. При этом наблюдается увеличение минутного объема кровообращения и скорости проведения возбуждения в АВУ и рабочем миокарде [Colucci, Wright, Braunwald, 1986]. β_3 -АР могут быть сопряжены как с G_i -, так и с G_s -белками, поэтому данные об эффектах их активации в миокарде довольно противоречивы. Согласно одним исследованиям, активация приводит к отрицательному инотропному эффекту в результате увеличения продукции NO [Tavernier et al., 2003]. В то же время другие исследования указывают на положительный инотропный эффект при активации β_3 -АР, связанный с фосфорилированием кальциевых каналов L-типа (I_{CaL}) [Skeberdis et al., 2008]. Активация β_3 -АР сопутствует различным патологическим состояниям [Brodde, Michel, 1999], в частности аритмиям различного генеза [Hasan, 2013; Zhou et al., 2018].

Установлено, что α_1 -АР сопряжены с внутриклеточными сигнальными каскадами, приводящими к ремоделированию кардиомиоцитов и их гипертрофии [Cotecchia et al., 2015], а экспрессия различных подтипов АР существенно изменяется при сердечно-сосудистых патологиях. Смещение баланса передачи адренергических сигналов в сторону α -адренергических путей, которое, например, может происходить при гипертрофических изменениях в сердце, способствует появлению аритмий различного генеза. Было показано, что активация α_1 -АР у крыс приводит к формированию блоков проведения возбуждения в миокарде торакальных вен и способствует формированию аритмий по типу re-entry [Ivanova et al., 2021]. Также известно, что α -адренергическая стимуляция в сердце может приводить к изменению конфигурации ПД миокарда предсердий крысы [Мансур и др., 2023], а также к нарушению проведения в АВ-соединении [Takata et al., 2014].

Согласно другим исследованиям, агонисты α_1 -АР обладают кардиопротекторными свойствами [O'Connell et al., 2014]. Активация ядерных α_1 -АР запускает фосфатидил-инозитольный каскад, что приводит к выбросу кальция из околоядерного пространства в саркоплазму, а также к активации кальций-кальмодулин зависимой киназы (CaMK), PKC и последующей активации протеинкиназы D PKD. Эти киназы могут фосфорилировать гистонацетилазу II типа (HDAC5) [Vega et al., 2004; Wu et al., 2014], которая является репрессором гипертрофических изменений сердца [Grozingler, Schreiber, 2000]. При

действии селективного агониста α -АР фенилэфрина наблюдается увеличение длительности потенциала действия на уровне 90% реполяризации (ДПД₉₀) в миокарде предсердий и желудочков у разных видов млекопитающих [Vogel, Terzic, 1989]. Есть данные о том, что ФЭ увеличивает ДПД₉₀ в кардиомиоцитах волокон Пуркинье собаки [Robinson, LIU, Rosen, 2000]. Однако эффекты активации α -АР в проводящей системе сердца, в частности в САУ и АВУ, до сих пор остаются неизученными.

Хорошо известно, что активация α_1 -АР в ГМК приводит к целому спектру эффектов, опосредуемых различными внутриклеточными механизмами. Несмотря на значительные различия, могут существовать общие механизмы, опосредующие эффекты активации α_1 -АР в гладкой мускулатуре и кардиомиоцитах. К таким механизмам может относиться регуляция активности хлорных ионных каналов и хлорной проводимости [Гайнуллина, Тарасова, Швецова, 2024]. Показано, что активация α_1 -АР приводит к усилению хлорной проводимости, что вносит вклад в регуляцию тонуса гладких мышц [Lamb, Kooy, Lewis, 2000].

2.3. Пуринергическая регуляторная система

Симпатические эффекты реализуются не только за счет выделения из нервных окончаний НА, но и за счет других комедиаторов, к которым относятся различные пуриновые соединения. Внеклеточные пурины, включая аденозин, АДФ и АТФ, играют важную роль в клеточном сигналинге, обеспечивая широкий спектр биологических эффектов. Среди пуриновых соединений важнейшим комедиатором симпатической нервной системы является АТФ [Dunn, Zhong, Burnstock, 2001], эффект которого реализуется через мембранные пуриновые рецепторы [Burnstock, 2017]: ионотропные P2X и метаботропные P2Y [Fredholm et al., 1994]. Пуриновые рецепторы обнаруживаются повсеместно и практически невозможно найти клетку, не чувствительную к АТФ и его аналогам [Burnstock, 2007]. Известно, что пуриновые комедиаторы оказывают влияние на биоэлектрическую активность рабочего миокарда [Pustovit et al., 2019] и проводящей системы сердца [Пустовит К.Б., Кузьмин В.С., Сухова, 2015]. Далее будут рассмотрены особенности строения и классификации пуриновых рецепторов, а также сигнальные каскады и механизмы действия пуриновых соединений в рабочем миокарде и проводящей системе сердца.

2.3.1. Мембранные рецепторы пуриновых соединений рабочего и пейсмейкерного миокарда

Пуриновые рецепторы делятся на 3 типа: P1, P2X и P2Y рецепторы. В настоящее время известны 4 подтипа аденозиновых P1-рецепторов, основным лигандом которых является аденозин (A1, A2A, A2B, A3). Поскольку основным пуриновым медиатором симпатического отдела ВНС является АТФ, то ниже будут представлены данные именно о P2-рецепторах. P2X-рецепторы являются лиганд-активируемыми ионными каналами.

P2Y-рецепторы

P2Y-рецепторы представляют собой G-белок-связанные рецепторы внеклеточных нуклеотидов [Burnstock, Kennedy, 1985]. P2Y-рецепторы делятся на подтипы, которые различаются аминокислотной последовательностью, фармакологическим профилем и сигнальными путями. На сегодняшний день у млекопитающих идентифицировано 8 типов P2Y-рецепторов, разделенных на 2 подгруппы [Kügelgen von, 2019] (Таблица 1).

Первая подгруппа включает рецепторы P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, сопряженные с $G_{\alpha q/11}$ -белками, активация которых стимулирует PLC, приводя к увеличению уровня IP_3 и выбросу кальция из клеточных депо [Kügelgen Von, Hoffmann, 2016]. Также в эту подгруппу входит P2Y11-рецептор, сопряженный с G_s -белком, активация которого приводит к стимуляции АЦ и росту уровня цАМФ. P2Y-рецепторы имеют различное сродство к разным лигандам. Кроме активации PLC, было показано, что P2Y-рецепторы также оказывают влияние на кальциевые и калиевые каналы [Kügelgen Von, Hoffmann, 2016].

Вторая группа включает рецепторы P2Y12, P2Y13 и P2Y14, сопряженные с G_i -белком, при активации которого наблюдается ингибирование АЦ, снижение цитоплазматического уровня цАМФ и подавление активности РКА, что обеспечивает регуляцию активности различных ионных каналов и транспортеров. P2Y-рецепторы формируют гомо- и гетеродимеры, аналогично другим GPCR [Ecke et al., 2008].

Таблица 1. Подтипы P2Y рецепторов и сопряженные с ними G-белки.

Подтип P2Y-рецептора	G-белок, регуляция вторичного посредника	Эндогенные агонисты
P2Y1	G _{q/11} ; PLC↑	АДФ=АТФ
P2Y2	G _{q/11} ; PLC ↑	УТФ=АТФ
P2Y4	G _{q/11} ; PLC ↑	УТФ=УМФ>АТФ
P2Y6	G _{q/11} ; PLC ↑	УДФ>УТФ>>АТФ
P2Y11	G _{q/11} ; PLC ↑ G _s ; AC↑	АТФ
P2Y12	G _{q/11} ; PLC ↑ G _{i/o} ; ↓ аденилатциклазы	АДФ
P2Y13	G _{i/o} ; ↓ аденилатциклазы	АТФ=АДФ
P2Y14	G _{i/o} ; ↓ аденилатциклазы	УДФ-галактоза = УДФ-глюкоза

P2X-рецепторы

АТФ-управляемые P2X-рецепторы являются неселективными катионными каналами, которые состоят из трех субъединиц и принимают участие во многих физиологических процессах. Эти рецепторы относятся к уникальному классу лиганд-активируемых ионных каналов и состоят из шести трансмембранных спиралей (три из которых формируют пору, а три окружают ее) и сравнительно небольшого внеклеточного домена, содержащего три АТФ-связывающих кармана [Alves et al., 2014]. На данный момент известно 7 субъединиц ионотропных P2X-рецепторов (P2X1–7), которые могут формировать как гомо-, так и гетеромеры. Каждый из 7 подтипов P2X рецепторов обладает уникальным фармакологическим профилем. Большое физиологическое значение имеет степень десенситизации специфических P2X-рецепторов, поскольку она определяет временные параметры передачи сигнала от P2X-рецептора и регулирует ответ на постоянное присутствие АТФ.

P2X-рецепторы в зависимости от скорости десенситизации можно разделить на две основные группы: первая включает в себя быстро десенситизирующиеся рецепторы (в течение 100-300 мс), а вторая – рецепторы, которые медленно десенситизируются или даже полностью сохраняют свою активность. Обычно все быстро десенситизирующиеся

P2X-рецепторы чувствительны к α , β -метилен-АТФ (α , β -мет-АТФ), а также 2-метилтио-АТФ и АТФ. К этой группе относятся P2X1- и P2X3-рецепторы [Ralevic, Burnstock, 1998].

Ко второй группе относятся P2X-рецепторы, которые не десенситизируются при длительном воздействии агониста. Кроме того, P2X-рецепторы этой группы можно разделить на две подгруппы: 1) чувствительные к α , β -метАТФ (гетеромеры P2X2- и P2X3-рецепторов) и 2) нечувствительные или мало чувствительные к α , β -метАТФ (P2X2-, P2X4-, P2X5-, P2X6-рецепторы или их гетеромеры) [Evans, Surprenant, 1996]. Интересно, что замена внутриклеточных N- или C-концевых частей P2X-рецепторов первой группы соответствующими частями рецепторов второй группы может привести к образованию, по крайней мере, частично десенситизирующихся или недесенситизирующихся рецепторов [Bavan et al., 2011].

Установлено, что сайт связывания АТФ находится на границе двух соседних субъединиц P2X-рецептора [Marquez-Klaka et al., 2007]. Связывание АТФ с P2X-рецепторами демонстрирует положительный кооперативный эффект. Для активации рецептора необходимо наличие более одной молекулы АТФ, при этом две молекулы являются необходимыми и достаточными для открытия каналов P2X-рецепторов. Также в нормальных физиологических условиях с P2X-рецепторами связываются три молекулы АТФ, несмотря на то что для открытия канала требуются только две молекулы [Fryatt et al., 2016]. Эндогенными регуляторами P2X-рецепторов являются двухвалентные катионы, такие как Mg^{2+} и Ca^{2+} , которые подавляют ток через P2X-рецепторы. В то же время Zn^{2+} усиливает катионную проводимость P2X-рецепторов, индуцированную АТФ. Кроме того, уровень pH также влияет на ток через P2X-рецепторы [King et al., 1996].

При связывании АТФ с субъединицами рецептора происходит изменение конформации их внутриклеточной части, что приводит к открытию центрального канала рецептора. P2X-рецепторы обеспечивают быструю (в течение 10 мс) и селективную проницаемость для катионов (Na^+ , K^+ и Ca^{2+}) [Dubyak, El-Moatassim, 1993]. Основным механизмом, посредством которого активированные P2X-рецепторы регулируют клеточные функции, является повышение $[Ca^{2+}]_i$.

Исследования показали, что P2X-рецепторы функционально взаимодействуют с рядом других белков, включая GPCR. Кроме того, активность P2X-рецепторов регулируется взаимодействием мембраносвязанных фосфоинозитидов с проксимальной областью C-концевого домена P2X2-рецепторов [Fujiwara, Kubo, 2006]. Существуют

иммуногистохимические доказательства наличия нескольких подтипов P2X-рецепторов в кардиомиоцитах крысы, а мРНК всех подтипов P2X-рецепторов можно обнаружить как в сердце крысы, так и в сердце человека.

2.3.2. Эффекты активации пуриновых P2-рецепторов в рабочем миокарде и проводящей системе сердца

Эффекты активации P2-рецепторов варьируют в зависимости от лиганда и имеют выраженные межвидовые различия [Кузьмин и др., 2008b; Кузьмин и др., 2008a]. В желудочковом миокарде лягушки АТФ вызывает следующие эффекты: сначала наблюдается увеличение сократимости, за которым следует период ее снижения, а затем вновь медленное и продолжительное восстановление. АТФ усиливает выброс ионов кальция из СПР кардиомиоцитов лягушки через P2Y-рецепторы. В предсердии морской свинки АТФ, АДФ и β , γ -метАТФ оказывают отрицательное хронотропное и инотропное действие, тогда как агонист P2X-рецепторов α , β -мет-АТФ оказывает стимулирующее действие [Burnstock, 2007]. Увеличение поступления кальция в кардиомиоциты через P2X-рецепторы приводит к положительному инотропному и хронотропному эффектам АТФ. АТФ активирует катионную проводимость в изолированных кардиомиоцитах предсердия лягушки, желудочка крысы, кролика и морской свинки, а также САУ кролика [Burnstock, Pelleg, 2015]. АТФ увеличивает силу сокращения как в изолированных кардиомиоцитах, так и в целом сердце. Исследования показывают вклад именно P2X-рецепторов в эти эффекты, а нечувствительность к α , β -метАТФ может свидетельствовать об участии P2X2- или P2X4-подтипов рецепторов [North, 2002].

Активация P2Y-рецепторов стимулирует продукцию IP_3 , увеличивает $[Ca^{2+}]_i$ и сократительную способность желудочковых и предсердных кардиомиоцитов. Кроме того, АТФ влияет на активность кальциевых каналов L-типа в желудочковых кардиомиоцитах и в клетках САУ. В кардиомиоцитах мыши положительные инотропные эффекты АТФ реализуются за счет активации P2Y11-рецепторов. Активация P2-рецепторов в предсердии морской свинки приводит к усилению K^+ -тока задержанного выпрямления посредством внутриклеточных механизмов, которые не зависят от РКА, РКС и свободного внутриклеточного кальция, что, вероятно, связано с активацией P2Y-рецепторов [Burnstock, 2007].

Продолжительный стресс и инфаркт миокарда приводят к патологическим изменениям в сердце, таким как фиброз и клеточная гибель. Эти изменения вызывают сердечную дисфункцию и, в конечном итоге, сердечную недостаточность. Во время

ишемии сердца АТФ выделяется из кардиомиоцитов и фибробластов [Dolmatova et al., 2012]. Кроме того, при хронической сердечной недостаточности и дистрофической кардиомиопатии у мышей наблюдается повышенная экспрессия P2Y₂- и P2Y₆-рецепторов [Oliveira Moreira De, Santo Neto, Marques, 2017]. Известно, что активация P2Y₂-рецепторов защищает сердце от ишемического повреждения. Также антагонисты P2Y₁₂-рецепторов применяются в фармакологии для терапии различных сердечно-сосудистых заболеваний [Cattaneo, Schulz, Nylander, 2014].

2.4. Роль пуринов и пуриновых рецепторов в контроле активности вегетативной иннервации сердца

Как медиаторы, так и комедиаторы влияют на передачу сигналов в нервной системе, действуя на уровне пресинаптических окончаний. Они могут как подавлять, так и модулировать не только собственную секрецию, но и экзоцитоз других нейромедиаторов. АТФ может изменять характер активности симпатических и парасимпатических нервов, а также влиять на секрецию НА и ацетилхолина [Каримова и др., 2016]. Кроме того, АТФ и аденозин способны стимулировать чувствительные нервные окончания, в результате оказывая влияние на сердечно-сосудистую систему, регулируя контроль работы сердца со стороны ВНС.

Стимуляция симпатических нервов приводит к выделению АТФ и аденозина из перфузированного сердца кролика. Было показано, что в предсердиях крысы активация P₂-рецепторов приводит к подавлению секреции НА в результате пресинаптического ингибирования его высвобождения из симпатических нервов [Kügelgen von, Stoffel, Starke, 1995]. В то же время активация P_{2X}-рецепторов в синапсоммах симпатических постганглионарных нейронов способствует высвобождению из везикул НА [Sesti et al., 2002]. В клеточных культурах, полученных из симпатических ганглиев, наблюдается аналогичный эффект: происходит усиление высвобождения НА из пресинаптических терминалей [Boehm, 1999]. У морской свинки P_{2X}-рецепторы симпатических нервных окончаний правого предсердия стимулируют высвобождение НА [Sperlágh et al., 2000]. Наоборот, АТФ выделяется при активации АР из симпатических нервов в предсердии морской свинки [Tokunaga et al., 1995].

2.5. Хлорные мембранные ионные каналы и транспортеры и их роль в обеспечении электрической активности сердца

Молекулярные механизмы, лежащие в основе потенциальных эффектов α_1 -АР и P₂-пуриновых рецепторов в проводящей системе сердца, остаются неизученными.

Известно, что активация α_1 -АР приводит к деполяризации ГМК стенки сосудов и вазоконстрикторному ответу за счет целого спектра механизмов, в том числе за счет усиления хлорной проводимости [Lamb, Kooy, Lewis, 2000]. Кроме того, эффекты активации пуриновых рецепторов в сердце также могут быть опосредованы модуляцией хлорной проводимости [Fisher et al., 2008]. Значительное количество хлорных ионных каналов экспрессируется в кардиомиоцитах [Duan, 2013]. Ниже будут рассмотрены структурные и биофизические свойства, а также молекулярная регуляция белковых комплексов – переносчиков хлора, идентифицированных в миокарде.

2.5.1. Трансмембранные хлорные каналы и переносчики

Хлор является преобладающим неорганическим анионом в биологических системах, который участвует в формировании потенциала покоя и определяет электрофизиологические свойства возбудимых клеток и тканей, в том числе и миокарда. На данный момент очевидно, что внутриклеточная концентрация анионов хлора ($[Cl^-]_i$), равновесный потенциал для анионов хлора (E_{Cl}), а также трансмембранные хлорные токи (I_{Cl}) являются факторами, которые значительно влияют на функционирование нейрональной ткани, мышечных клеток скелетной мускулатуры, гладкомышечных клеток стенки сосудов. К примеру, хлорный гомеостаз определяет возбудимость, величину ПП, тонус, сократимость, синаптическую передачу и способность к реакции на нейромедиаторы в различных типах ткани. Также показано, что анионы хлора и трансмембранные хлорные токи определяют конфигурацию ПД в различных участках здорового сердца, а нарушение гомеостаза и трансмембранного переноса хлора вызывает изменение нормальной электрической активности, что приводит к сердечным патологиям и нарушениям ритма сердца. Перемещение анионов хлора через плазматическую мембрану реализуется белками трех функциональных типов: ионными каналами, обменниками и котранспортерами.

На данный момент свойства хлорных ионных каналов подтверждены для пяти семейств (групп) трансмембранных макромолекул [Duran et al., 2009]. Первое семейство включает пентамерные лиганд-управляемые анионные каналы (например, рецепторы глицина или рецепторы гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) А-типа), относящиеся к классу Cys -петлевых рецепторов. К настоящему времени нет доказательств экспрессии лиганд-управляемых хлорных каналов в миокарде и/или мембране кардиомиоцитов. Единственным представителем второй группы является трансмембранный регулятор муковисцидоза (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) – трансмембранный переносчик ABC-типа, который обладает хлорной проводимостью.

Следующее (третье) семейство включает гомодимерные «двухпоровые» потенциал-управляемые хлорные каналы, обозначаемые ClC (chloride channels). Однако, из 9 типов хлорных каналов семейства ClC, найденных у млекопитающих, только 4 являются «настоящими» каналами (ClC-1, -2, -Ca и -Kb), а остальные – Cl⁻/H⁺-обменниками (ClC-3, -4, -5, -6, -7). Четвертое семейство включает потенциал- и Ca²⁺-зависимые хлорные каналы, обозначаемые CaCC. В настоящее время показано, что свойствами Ca²⁺-зависимого хлорного канала обладают гомодимерные «двухпоровые» белки TMEM16A и TMEM16B. Наконец, к пятому семейству относятся гексамерные «паннексин-подобные» анионные каналы, регулируемые объемом (volume-regulated anion channels, VRAC), которые образованы белками группы LRRC8 (белки, содержащие повторы, обогащенные лейцином – leucine rich repeats containing protein, LRRC). В настоящее время имеется крайне мало информации касательно функционирования, распределения и регуляции VRAC-каналов, состоящих из мономеров LRRC8 в сердце.

Помимо вышеперечисленных пяти семейств, имеется целый спектр белков и макромолекулярных белковых комплексов, которые имеют признаки хлорной проводимости. Среди таких структур-кандидатов следует упомянуть бестрофины (BEST1-4), TMEM206, белки семейства TWEETY (TTYH1-3), а также белки семейства SLCO2 (SLCO2A1 – трансмембранный переносчик простагландинов). Бестрофины являются пентамерными Ca²⁺-управляемыми хлорными каналами [Miller, Vaisey, Long, 2019] с узким диапазоном чувствительности к внутриклеточному Ca²⁺. Преимущественно бестрофины экспрессируются в сетчатке. Димерные белки TWEETY также могут быть Ca²⁺-управляемыми хлорными каналами [Li, Hoel, Brohawn, 2021]. Предполагается, что TMEM206 является основной, порообразующей субъединицей канала, проводящего рН-чувствительный, активируемый «закислением» хлорный ток; в свою очередь, SLCO2A1 возможно является молекулярной основой хлорного тока и каналов сверхвысокой проводимости, обозначаемых «Maxi-Cl» [Okada et al., 2021]. Имеющиеся к настоящему моменту данные о свойствах вышеперечисленных 4-х типов молекул достаточно противоречивы, а их экспрессия в миокарде надежно не установлена. В связи с этим, здесь будут рассмотрены лишь те макромолекулы, для которых подтверждена хлорная проводимость и экспрессия в сердце, а также имеются сведения, указывающие на функциональную роль этих каналов в миокарде (Таблица 2). Перечень таких каналов включает CFTR, ClC-2, CaCC (TMEM16A) и VRAC (LRRC8x).

Таблица 2. Основные характеристики хлорных ионных каналов миокарда

Каналы	CFTR	ClC2	CaCC (TMEM16A)	VRAC (LRRC8)
Лиганд-управляемость	нет	нет	нет	нет
Электронейтральность	нет	нет	нет	нет
Избирательность	ионы галогенов	ионы галогенов	ионы галогенов	ионы галогенов, органические осмолиты
Потенциал-управляемость (гейтинг)	-	+	при $[Ca^{2+}]_i < 1$ мкМ	-
Выпрямление	Гольдмановское	входящее	при $[Ca^{2+}]_i < 1$ мкМ выходящее	Гольдмановское
Кальций-чувствительность	-	-	+++	+
Механочувствительность	-	+	+	+++
Регуляция протеинкиназой А	+++	+	-	-
Регуляция протеинкиназой С	+	-	-	-

Трансмембранный регулятор муковисцидоза – CFTR

Каналы CFTR относятся к большому суперсемейству АТФ-связывающих кассетных транспортеров, широко представленных во всех живых организмах [Locher, 2016]. АВС-транспортеры обеспечивают выведение малых органических молекул во внеклеточную среду из мембраны и цитоплазмы за счет гидролиза АТФ. Белки этого семейства имеют довольно консервативную структуру. Молекула канонического АВС-транспортера состоит из четырех доменов, два из которых являются трансмембранными, а остальные – цитозольным и нуклеотид-связывающими. Каждый из двух трансмембранных доменов содержит 6 α -спиралей. Как правило, у эукариот все четыре домена АВС-транспортера являются частью одной полипептидной цепи. CFTR относится к классу белков АВС, для которых характерна связь четырех доменов в одну полипептидную цепь. Гомологичные

части CFTR связаны друг с другом цитозольной регуляторной цепью – R-доменом [Locher, 2016] (Рисунок 3 А).

Для каналов CFTR характерно так называемое Гольдмановское выпрямление. Это означает, что зависимость величины тока, текущего через CFTR, от мембранного потенциала (вольт-амперная характеристика), близка к Гольдмановской. Такой вид вольт-амперной характеристики указывает на отсутствие каких-либо воротных механизмов в канале CFTR. При записи электрической активности одиночных активированных каналов CFTR наблюдаются типичные дискретные ступенчатые скачки проводимости и дискретные переходы между закрытыми и открытыми состояниями. Достаточно длительные периоды пребывания CFTR в открытом состоянии (0,1–0,2 мс) сменяются периодами закрытого состояния (1-2 мс) [Csanády, Vergani, Gadsby, 2019; Tabcharani et al., 1993].

Для того, чтобы канал CFTR приобрел способность перейти в открытое состояние, необходимо, во-первых, фосфорилирование регуляторной R-цепи цАМФ-зависимой протеинкиназой (РКА) [Berger et al., 1991], а во-вторых – связывание АТФ с нуклеотид-связывающими доменами [Anderson et al., 1991]. Несмотря на то, что АТФ необходим для открытия канала CFTR, внутриклеточная концентрация АТФ не является регулятором активности каналов, поскольку физиологическая регуляция проводимости каналов осуществляется за счет фосфорилирования/дефосфорилирования белка CFTR. Показано, что фосфорилирование CFTR протеинкиназой С (РКС) приводит к открытию канала CFTR [Berger et al., 1991]. По некоторым данным, полная активация CFTR возможна только при фосфорилировании РКС в дополнение к РКА [Jia, Mathews, Hanrahan, 1997]. На активность CFTR также могут влиять АМФ-зависимая протеинкиназа (АМРК) [Hallows et al., 2000], тирозинкиназы [Billet et al., 2015] и Ca^{2+} /кальмодулин-зависимые протеинкиназы (СаМК) [Csanády, Vergani, Gadsby, 2019]. В свою очередь, «классические» фосфатазы белков, например, фосфатаза 2А (PP2A), дефосфорилируя CFTR, снижает его проводимость и уменьшает время пребывания канала в открытом состоянии [Luo et al., 1998]. Таким образом, CFTR является типичным каналом, проводимость и величина тока которого зависят от уровня фосфорилирования. Считается, что большая часть так называемого РКА-зависимого хлорного тока ($I_{Cl, RKA}$) формируется каналами CFTR.

Поскольку CFTR является АВС-транспортером, целый ряд органических анионов с молекулярной массой 200-1000 Да могут блокировать CFTR. Как правило, степень блокирования зависит от величины МП и оказывается более выраженной при более отрицательных значениях МП. Потенциал-зависимость блокирующего действия

наблюдается для таких соединений как флюфенаминовая кислота, глибенкламид, 5-нитро-2-(3-фенилпропиламино)бензойная кислота (NPPB) [Uramoto et al., 2003], 3-(N-морфолино)пропансульфоновой кислота (MOPS) и антрацен-9-карбоновая кислота [Csanády, Vergani, Gadsby, 2019].

Семейство хлорных каналов ClC

Трансмембранные белки семейства ClC широко представлены у всех типов животных. У млекопитающих ClC экспрессируются в большинстве типов клеток и участвуют в поддержании анионного гомеостаза, потенциала покоя, а также в регуляции клеточного объема. Среди белков этого семейства можно выделить две структурно похожие, но функционально различные группы. К первой группе относятся потенциал-зависимые хлорные каналы (ClC-1, -2, -Ka и -Kb, K – kidney – «почечные»). ClC-1 (ClCN1) является самым изученным хлорным каналом. Экспрессия ClC-1, как и ClC-Ka/b, в сердце не показана. Ко второй группе (ClC-3, -4, -5, -6, -7) относятся трансмембранные белки, которые проницаемы не только для ионов хлора, но и для протонов, и, фактически, являются Cl⁻/H⁺-обменниками (антипортерами), которые в основном локализуются в мембране внутриклеточных органелл (эндосом, лизосом, везикул).

Все белки семейства ClC состоят из двух идентичных субъединиц, хотя могут образовывать и гетеродимеры [Jentsch, Pusch, 2018]. Каждая из субъединиц содержит 18 α -спиралей, 17 из которых являются трансмембранными. Некоторые α -спирали являются короткими и не полностью пересекают мембрану, что приводит к появлению небольших петель внутри мембраны, которые формируют внутриканальные «пути» для анионов и протонов. С-концевой фрагмент каждой субъединицы ClC-белков содержит два эволюционно консервативных регуляторных домена цистатионин β -синтазы (CBS), которые связывают цитоплазматический АТФ, АМФ и другие пуриновые нуклеотиды.

Важно, что трансмембранный перенос ионов хлора каждой субъединицей каналов ClC-семейства является кинетически независимым, так как каждая субъединица димерного канального комплекса формирует собственный структурно полноценный ионный путь (Рисунок 3 Б). Следует отметить, что ионы хлора могут перемещаться внутри канала по двум траекториям вблизи цитоплазматической границы мембраны, поэтому ионный путь ClC не является «порой» в строгом смысле этого термина. Каналы ClC обладают различными типами воротного механизма, определяющими их потенциал-зависимость. Выделяют быстрый воротный механизм («быстрые активационные ворота»), определяющий индивидуальное состояние каждой «монопоры», а также медленный

воротный механизм, влияющий на доступность пути обоих мономеров одновременно [Okamoto et al., 2019]. Высказано предположение о том, что быстрая потенциал-зависимая активация (быстрый воротный механизм) не связана с наличием потенциал-чувствительных сегментов в канальном комплексе [Jesús-Pérez De et al., 2016]. Действительно, субъединицы и канальные комплексы ClC лишены сенсора потенциала с канонической структурой. Вероятно, механизмы потенциал-зависимой активации и деактивации значительно различаются для ClC-каналов разного типа (ClC-1, -2, -Ca и -Kb). Эта особенность выражается в том, что вольт-амперные характеристики ClC-1, -2, -Ca и -Kb имеют различный вид.

ClC-2 являются потенциал-зависимыми хлорными каналами плазматической мембраны, которые обнаруживаются в большинстве тканей млекопитающих [Jentsch, Pusch, 2018]. Среди всех ClC в сердце и непосредственно в кардиомиоцитах обнаруживается высокий уровень экспрессии именно ClC-2.

Как и другие каналы этого семейства, ClC-2 – димеры с двумя порами [Weinreich, Jentsch, 2001]. Для ClC-2 характерны медленные и быстрые воротные механизмы, определяющие потенциал-зависимость канала. Предполагается, что быстрая потенциал-зависимая активация ClC-2 обусловлена электростерическим механизмом: в тех условиях, когда $V_m < E_{Cl}$ (например, при гиперполяризации) происходит поступление внутриклеточных ионов хлора во внутренние «воротные» порообразующие области молекулы. Электростатическое отталкивание ионов хлора и поляризованного отрицательно заряженного остатка глутамата приводит к изменению положения последнего в результате разрушения одних и формирования других водородных связей («глутаматные ворота»), что делает пору доступной для перемещения анионов [Okamoto et al., 2019]. В тех условиях, когда $V_m > E_{Cl}$ электрическое поле препятствует поступлению внутриклеточного Cl^- в канал и преодолению электростерических глутаматных ворот. Таким образом, гиперполяризация ($V_m < E_{Cl}$) приводит к активации, а деполяризация ($V_m > E_{Cl}$) к деактивации канала. Электростерический воротный механизм определяет то, что вольт-амперная характеристика для ClC отклоняется от «классической» кривой с Гольдмановским выпрямлением и приобретает вид кривой с направленным внутрь (или «аномальным», или «входящим») выпрямлением («inward rectifying», «ir»).

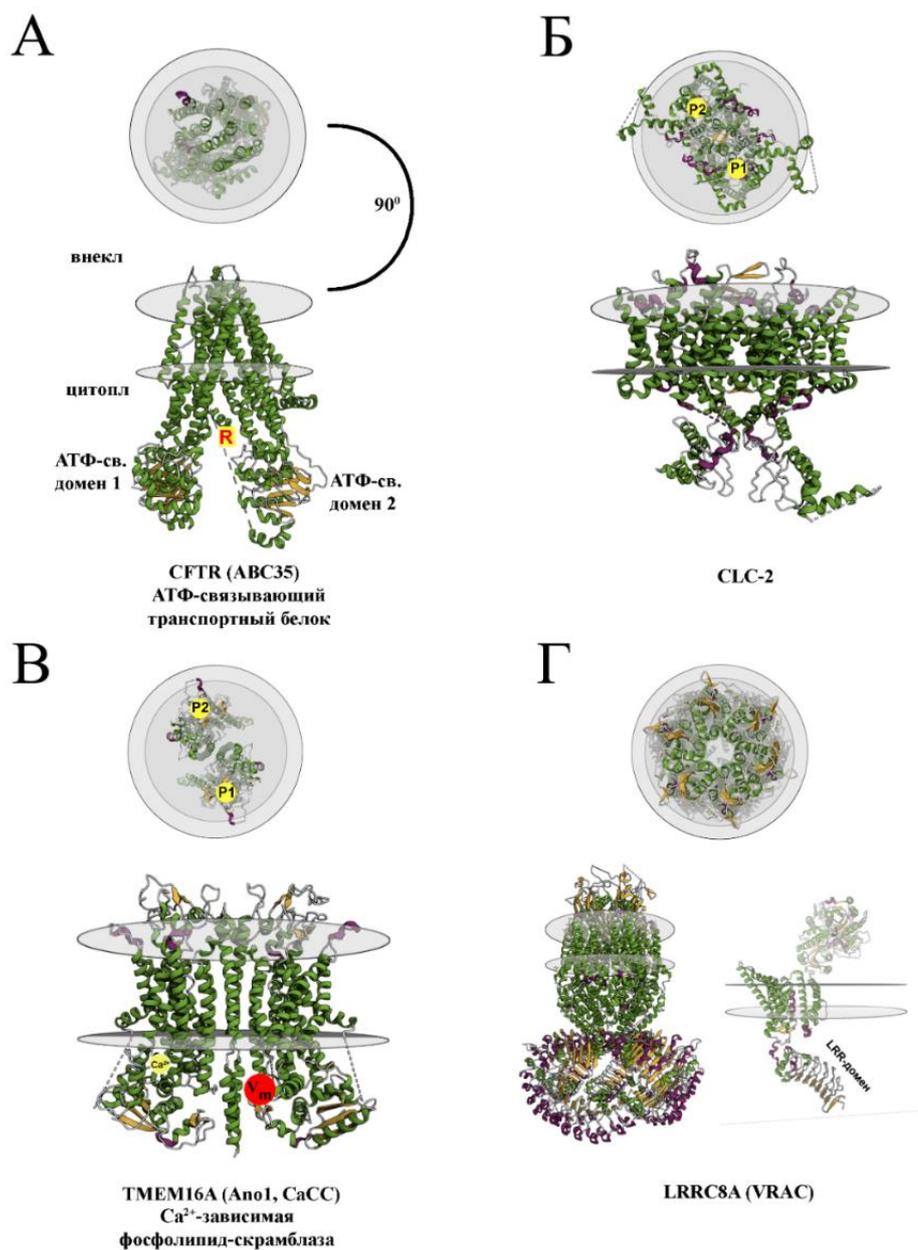


Рисунок 3. Структура основных белковых комплексов, обладающих свойствами хлорных анионных каналов в миокарде. На верхних панелях показан вид канала с внеклеточной стороны в плоскости плазматической мембраны. Зеленым цветом в структуре белка показаны α -спирали, желтым цветом – β -складки, фиолетовым цветом – 3_{10} -спираль. А – Структура канала CFTR и его расположение в плазматической мембране с указанием локализации АТФ-связывающих доменов и регуляторного домена (R). Б – Структура канала CLC-2 и его расположение в плазматической мембране с указанием ионных пор, формируемых каждой из субъединиц канала (P1 и P2). В – Структура канала TMEM16A и его расположение в плазматической мембране с указанием ионных пор, формируемых каждой из субъединиц канала (P1 и P2), кальций-связывающего «кармана» канала (Ca²⁺) и потенциал-чувствительного участка канала (V_m). Г – Структура канала LRRC8A и его расположение в плазматической мембране с указанием домена, содержащего повторы, обогащенные лейцином (LRR). Молекулярные структуры сконструированы с помощью <https://www.rcsb.org/>

В связи с особенностями воротного механизма, в нативных условиях анионный ток через каналы ClC-2 является активируемым гиперполяризацией с входящим выпрямлением ($I_{Cl,ir}$). Амплитуда и потенциал реверсии тока $I_{Cl,ir}$ зависят от концентрации ионов хлора по обе стороны мембраны. Повышение $[Cl^-]_i$ приводит к смещению E_{Cl} к менее отрицательным значениям и соответственному смещению значения МП, при котором этот канал может быть активирован и проводить деполяризующий ток – *входящий* по направлению движения положительных зарядов, но *выходящий* по направлению перемещения анионов Cl^- . При низкой $[Cl^-]_i$ ток через каналы ClC-2 приобретает сильную зависимость от внеклеточной концентрации хлора ($[Cl^-]_o$).

Состояние канала ClC-2 сильно зависит от внутриклеточного pH: небольшое снижение pH (закисление цитоплазмы, повышение $[H^+]_i$) приводит к облегчению активации канала, однако при дальнейшем снижении pH канал закрывается [Arreola, Begenisich, Melvin, 2002]. Механизм увеличения проводимости при снижении pH заключается в том, что протоны нейтрализуют отрицательный заряд глутамата «глутаматных ворот», облегчая поступление внутриклеточного хлора в вестибюль канала. Кроме того, каналы ClC-2 также могут быть активированы внутриклеточной гиперволемией [Arreola, Begenisich, Melvin, 2002]. Каналы ClC-2 могут быть прямой или косвенной мишенью протеинкиназ различного типа [Palmada et al., 2004; Park, Begenisich, Melvin, 2001]. Проблемой в исследовании свойств и роли ClC-2 является отсутствие их низкомолекулярных лигандов с высоким сродством и избирательностью [Jentsch, Pusch, 2018].

Ca²⁺-чувствительные хлорные каналы - CaCC

Как указано выше, структуры, обладающие хлорной проводимостью, потенциал-зависимостью и чувствительностью к Ca^{2+} , обозначают как CaCC. Хлорный ионный ток, демонстрирующий потенциал- и Ca^{2+} -чувствительность, формируемый CaCC, принято обозначать как $I_{Cl,ca}$. Ранее считалось, что молекулярной основой CaCC являются гомодимерные канальные белки, где каждый мономер состоит из 8 трансмембранных сегментов (α -спиралей) [Duran et al., 2009]. Такие белки были названы аноктаминами (Ano) [Caputo et al., 2008; Yannoukakos et al., 1994]. Однако в недавних исследованиях [Dang et al., 2017; Paulino et al., 2017a; Paulino et al., 2017b] установлено, что каждый мономер порообразующей субъединицы CaCC включает 10 трансмембранных α -спиралей. Белки такого типа ранее получили обозначение TMEM16, как одно из семейств слабо похожих трансмембранных белков с неизвестной функцией, объединяемых в группу TMEM (TransMEmbrane Members). На данный момент нет никаких сомнений, что гомодимеры

TMEM16A (Ano1) или TMEM16B (Ano2) являются молекулярными субстратами для CaCC и порообразующими субъединицами для тока $I_{Cl, Ca}$ [Hartzell et al., 2009]. Каждый из мономеров гомодимерного канала TMEM16 имеет пору, проницаемую для ионов хлора. Таким образом, CaCC являются «двухпоровыми» каналами (Рисунок 3 В). Каналы TMEM16A(B) широко экспрессируются в кардиомиоцитах мышей, собак [Horváth et al., 2016], кроликов [Sipido, Callewaert, Carmeliet, 1993] и свиней [Li и др., 2004]. Уровень экспрессии TMEM16 в миокарде человека, в отличие от других млекопитающих, невысок [Chemaly El и др., 2014].

Проводимость каналов TMEM16A, экспрессируемых в гетерологических системах, увеличивается при деполяризации, но снижается при гиперполяризации, поэтому ток $I_{Cl, Ca}$ демонстрирует свойства тока *выходящего* выпрямления [Berg, Yang, Jan, 2012]. Однако основной особенностью CaCC/TMEM16A является регуляция его проводимости цитозольным Ca^{2+} [Pedemonte, Galletta, 2014].

Каждый из димеров канала CaCC/TMEM16A может связывать два иона Ca^{2+} . Связывание, по-видимому, происходит кооперативно [Kuruma, Hartzell, 2000; Yang и др., 2008]. Однако в структуре TMEM16A не обнаружено канонических Ca^{2+} -связывающих мотивов. Предполагается, что последовательность аминокислот в первой внутриклеточной петле образует «кальциевый карман» (Рисунок 3 В), характерный, например, для Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов большой проводимости [Duran и др., 2009]. Отрицательно заряженные остатки аминокислот «кальциевого кармана» TMEM16A обращены в «просвет» проводящей поры [Brunner и др., 2014].

Считается, что потенциал-чувствительность CaCC/TMEM16A обусловлена прямым потенциал-зависимым связыванием Ca^{2+} отрицательно заряженными аминокислотными остатками «кальциевого кармана» [Dang и др., 2017; Paulino и др., 2017a]: чем положительнее потенциал, тем более эффективно ионы Ca^{2+} проникают из цитоплазмы в Ca^{2+} -связывающий карман, нейтрализуя негативный электростатический заряд в поре и делая ее доступной для ионов хлора. Кроме того, чем выше $[Ca^{2+}]_i$, тем больше каналов TMEM16A будет активировано. Таким образом, потенциал-чувствительность и зависимость от $[Ca^{2+}]_i$ для CaCC/TMEM16A являются связанными характеристиками. Повышение $[Ca^{2+}]_i$ приводит к увеличению как входящей, так выходящей компоненты тока через CaCC/TMEM16A.

Тем не менее, $I_{Cl, Ca}$ при низкой (базальной, $<0,1$ мкМ) $[Ca^{2+}]_i$, соответствующей состоянию покоя клетки, также может быть потенциал-зависимо активирован [Schulte,

2010]. Считается, что потенциал-зависимость CaCC/ТМЕМ16А при нулевой или очень низкой $[Ca^{2+}]_i$ обусловлена либо наличием у канала отдельного «неканонического» Ca^{2+} -независимого сенсора потенциала (Рисунок 3 В), либо – потенциал-зависимым протонированием аминокислотных остатков Ca^{2+} -связывающего кармана и других цитоплазматических участков молекулы [Ma и др., 2017]. Закисление цитоплазмы приводит к увеличению вероятности пребывания ТМЕМ16А в открытом состоянии, увеличению $I_{Cl,Ca}$ при всех значениях МП [Chun и др., 2015]. Помимо прочего, проводимость ТМЕМ16А и величина $I_{Cl,Ca}$ зависит от $[Cl^-]_o$. В итоге, механизм активации каналов ТМЕМ16А крайне сложен, поскольку определяется $[Ca^{2+}]_i$, мембранным потенциалом, внутриклеточным рН и $[Cl^-]_o$; канал CaCC/ТМЕМ16А нельзя, в строгом смысле, определить как *потенциал-управляемый*. В свою очередь, наличие потенциал-чувствительности при нулевой $[Ca^{2+}]_i$ не позволяет рассматривать канал и как *лиганд-управляемый*.

Установлено, что активация CaCC/ТМЕМ16А происходит за счет Ca^{2+} , поступающего через потенциал-зависимые кальциевые каналы, неселективные катионные каналы, а также при высвобождении Ca^{2+} из СПР [Ferrera, Caputo, Galletta, 2010]. ТМЕМ16В менее чувствителен к Ca^{2+} , чем ТМЕМ16А, а кинетика Ca^{2+} -зависимой активации и деактивации ТМЕМ16В намного быстрее, чем у ТМЕМ16А [Caputo и др., 2008; Pifferi, Dibattista, Menini, 2009]. Следует отметить, что после активации кальцием для ТМЕМ16А/В не наблюдается инактивации канала со временем.

CaCC/ТМЕМ16А является мишенью целого ряда внутриклеточных сигнальных молекул и киназ [Schulte, 2010]. Комплекс Ca^{2+} /кальмодулин активирует ТМЕМ16А [Jung и др., 2013; Voske и др., 2013]. Как и в случае с многими другими каналами, фосфолипиды (фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат) и производные холестерина [Cirigliani и др., 2011] оказывают существенное влияние на способность CaCC/ТМЕМ16А к активации [Pritchard и др., 2014]. В некоторых работах выявлена чувствительность ТМЕМ16А к механическим стимулам [Bulley и др., 2012]. Для CaCC/ТМЕМ16А показана активация, опосредованная GPCR [Pedemonte, Galletta, 2014; Yang и др., 2012].

Показано, что классические блокаторы анионной проводимости – DIDS (4,4'-диизотиоциано-2,2'-стильбен-дисульфоновая кислота), NPPВ и антрацен-9-карбоновая кислота (9-AC) [Duran и др., 2009] обладают блокирующим действием на CaCC/ТМЕМ16. В ряде исследований показано, что такие соединения как T16inh-A0, CaCCinh-A01, бензбромарон, дихлорфен и гексахлорфен могут быть блокаторами ТМЕМ16А [Balderas и др., 2012; Huang и др., 2012]. Предполагается, что высокоселективным ингибитором

TMEM16A является N-((4-метокси)-2-нафтил)-5-нитроантралиловая кислота (MONNA) [Oh и др., 2013].

Хлорные каналы, регулируемые внутриклеточным объемом (VRAC) – LRRC8x

Молекулярный субстрат для трансмембранной анионной проводимости, регулируемой объемом, долгое время не был установлен. В литературе имеется множество вариантов обозначения предполагаемых «объем-чувствительных» каналов, например, VSOR (чувствительные к объему каналы выходящего выпрямления), VSOAC (чувствительные к объему каналы анионов/органических осмолитов) или VRAC (регулируемые объемом анионные каналы), которые представляют собой гомо- или гетерогексамеры, сформированные трансмембранными белками семейства LRRC8.

Гетерогексамеры LRRC8 могут включать мономеры пяти разных типов: LRRC8A...E [Ghouli, Fiacco, Binder, 2022]. Все LRRC8 имеют трансмембранный порообразующий домен, который состоит минимум из четырех трансмембранных α -спиралей и в высокой степени гомологичен трансмембранному домену коннексинов и иннексинов. Предполагается, что филогения LRRC8 связана с паннексинами и другими белками щелевых контактов [Lutter и др., 2017]. Помимо трансмембранного домена, каждая молекула белка LRRC8 имеет внеклеточный домен и внутриклеточный, С-концевой домен, богатый лейциновыми повторами (LRR) с характерной третичной структурой (Рисунок 3 Г) [Jentsch, 2016]. Биофизические свойства каналов-гексамеров зависят от их субъединичного состава [Deneka и др., 2018; Kasuya и др., 2018].

Белок LRRC8A, также известный как Swell1, является обязательной субъединицей гексамерного канала VRAC/LRRC8 [Qiu и др., 2014; Voss и др., 2014]. Функциональный канал представляет собой гетеромер, включающий LRRC8A и любые другие мономеры (LRRC8B, C, D или E) [Jentsch, Pusch, 2018]. Подавление экспрессии LRRC8A приводит к уменьшению активируемого гиперволумией хлорного тока ($I_{Cl,vol}$), однако элиминация любой другой из субъединиц не влияет на этот ток [Okada и др., 2017; Voss и др., 2014].

Установлено, что VRAC/LRRC8 экспрессируются во всех типах клеток позвоночных животных, в том числе и в кардиомиоцитах. Показано, что в сердце в наибольшей степени экспрессируется LRRC8C [Pervaiz и др., 2019]. Кардиомиоциты человека экспрессируют LRRC8A, LRRC8B, LRRC8C и LRRC8E.

Считается, что эти каналы играют ключевую роль в поддержании клеточного объема [Ghouli, Fiacco, Binder, 2022]. Проводимость вышеуказанных каналов увеличивается в ответ на гиперволумию и гипоосмотический стресс, что способствует возвращению клеток к

исходному объему и исходной осмолярности за счет регулируемого выхода из цитоплазмы ионов галогенов и отрицательно заряженных органических осмолитов. Считается, что восстановление клеточного объема реализуется за счет пассивного трансмембранного, направленного наружу перемещения молекул воды, происходящего вслед за активацией VRAC/LRRC8 [Lutter и др., 2017].

Хлорный анионный ток через каналы VRAC/LRRC8, обозначаемый как $I_{Cl,vol}$ или $I_{Cl,swell}$, имеет входящую и выходящую компоненту и демонстрирует свойства выходящего выпрямления, близкого к Гольдмановскому. Для $I_{Cl,vol}$ характерна инактивация со временем, наблюдаемая при положительных значениях МП. Выраженность этой инактивации зависит от типа белков LRRC, формирующих ионный канал [Ghouli, Fiasso, Binder, 2022]. Анионная избирательность VRAC/LRRC8 обусловлена высоким положительным электростатическим зарядом проводящего пути канала.

Проводимость VRAC/LRRC8 зависит от концентрации внутриклеточного АТФ, pH цитоплазмы, а также от $[Ca^{2+}]_i$ [Centeio и др., 2020; Liu и др., 2019]. Повышение $[Ca^{2+}]_i$ способствует увеличению проводимости VRAC при всех значениях МП. При снижении pH от 7,4 до 6 проводимость увеличивается, однако дальнейшее снижение pH подавляет VRAC/LRRC8.

VRAC/LRRC8 являются мишенью киназ, сопряженных с GPCR [Nilius и др., 1997]. Фосфорилирование киназами PKCa и PKC β усиливает активацию VRAC/LRRC8 каналов внутриклеточным АТФ [Rudkouskaya и др., 2008]. Проводимость VRAC/LRRC8 модулируется пуриновыми рецепторами P2Y2-типа [Fisher и др., 2008]. Также известно, что ингибирование киназы легких цепей миозина подавляет проводимость, а ингибирование фосфатазы легких цепей миозина увеличивает проводимость VRAC/LRRC8 [Ghouli, Fiasso, Binder, 2022]. Кроме того, ингибирование ROCK/Rho-киназного пути приводит к нарушению активации VRAC/LRRC8 вплоть до полного подавления их проводимости [Nilius и др., 1999].

2.5.2. Транспортёры и обменники хлора

Наряду с хлорными каналами в сердце широко представлены хлорные трансмембранные АТФ-независимые переносчики и обменники, которые определяют $[Cl^-]_i$ и, соответственно, E_{Cl} , оказывая влияние на электрофизиологические характеристики миокарда (Таблица 3). В настоящее время известно множество хлор-катионных и хлор-анионных трансмембранных переносчиков, которые могут быть как электронейтральными, так и электрогенными. Ключевую роль среди хлор-катионных котранспортеров (или

симпортеров) в сердце играют NKCC и KCC, относящиеся к крупной группе трансмембранных молекул SLC12 (SoLute Carrier) [Modi и др., 2023]. Среди хлор-анионных транспортеров в сердце важны хлор-бикарбонатные антипортеры, или $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменники [Wang, 2014], являющиеся членами семейств SLC4 или SLC26 [Jentsch, Pusch, 2018].

Таблица 3. Основные характеристики котранспортеров и обменников хлора в миокарде.

Транспортеры	Котраспортеры		Обменники	
	NKCC1	KCC1	HCO ₃ ⁻ /Cl ⁻ -обменник	
	SLC12A2	SLC12A4	SLC4A	SLC26A
стехиометрия	1Na ⁺ :1K ⁺ :2Cl ⁻ (все ионы внутри)	1K ⁺ :1Cl ⁻ (все ионы наружу)	1HCO ₃ ⁻ (наружу): 1Cl ⁻ (внутри)	nHCO ₃ ⁻ (наружу):1Cl ⁻ (внутри) или 1HCO ₃ ⁻ (наружу):2Cl ⁻ (внутри) или 1HCO ₃ ⁻ (наружу):1Cl ⁻ (внутри)
электронейтральность	+	+	+	+/-
потенциал-зависимость	+	+	-	-
механочувствительность	активация при уменьшении объема клетки	активация при увеличении объема клетки	-	-
зависимость от [Cl⁻]_i	повышение [Cl ⁻] _i подавляет NKCC	повышение [Cl ⁻] _i подавляет KCC	-	-

Котранспортеры катионов и хлора

Котранспортеры катионов и хлора (CCC – Cation Chloride Cotransporter) обеспечивают трансмембранный электронейтральный симпорт Cl^- и K^+ или Na^+ . Семейство SLC12 включает единственный котранспортер SLC12A3, переносящий один ион Na^+ и один Cl^- (NCC), два котранспортера (SLC12A2 - NKCC1 и SLC12A1 - NKCC2), которые осуществляют одновременный (однаправленный) перенос Na^+ , K^+ и двух Cl^- (NKCC), а также четыре котранспортера, осуществляющие однаправленный перенос K^+ и Cl^- (KCC, SLC12A4 - KCC1, SLC12A5 - KCC2, SLC12A6 - KCC3, SLC12A7 - KCC4) [Meor Azlan, Zhang, 2020]. Структура всех CCC (SLC12) сходна – мономер котранспортера включает 12 трансмембранных α -спиралей и крупные внутриклеточные N- и C-концевые домены [Hartmann, Nothwang, 2015] (Рисунок 4). Все котранспортеры этого семейства, за исключением KCC4, являются димерами [Modi и др., 2023; Nan и др., 2022].

Активность CCC находится под тесным контролем со стороны множества регуляторных факторов, например, агонистов GPCR. Более того, полученные к настоящему времени данные указывают на тканеспецифичный характер регуляции CCC со стороны рецепторов и их внутриклеточных сигнальных каскадов [Lang, Voelkl, 2013]. Например, в изолированных гладкомышечных клетках аорты крысы увеличение концентрации цАМФ при стимуляции β -АР и АЦ вызывает подавление активности NKCC1, тогда как повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ увеличивает его активность [Orlov, Tremblay, Hamet, 1996; Smith, Smith, 1987]. В тоже время, повышение внутриклеточной концентрации циклического гуанозинмонофосфат (цГМФ) в гладкомышечных клетках не оказывает влияния на NKCC1, но повышает активность KCC [Adragna и др., 2000].

Котранспортеры семейства CCC имеют сайты фосфорилирования для протеинкиназ различного типа. [Kahle и др., 2006]. Действительно, фосфорилирование серин/треониновыми киназами семейства WNK влияет на активность CCC [Modi и др., 2023]. Фосфорилирование NKCC1-2 и NCC киназами семейства WNK приводит к увеличению активности этих переносчиков. В свою очередь, фосфорилирование KCC этими киназами приводит к подавлению активности транспортеров [Orlov и др., 2014]. Таким образом, регуляция активности NKCC и KCC является реципрокной. Парадоксально, но в целом ряде работ установлено, что «классические» серин/треониновые киназы – PKA и PKC – не оказывают влияния на NKCC и KCC [Kahle и др., 2006].

Изменение клеточного объема влияет на активность CCC. Уменьшение объема клетки («сжатие»), снижение натяжения клеточной мембраны, например, при увеличении

осмолярности внешней среды, приводит к активации НКСС, но подавляет КСС. Увеличение проводимости НКСС в таких условиях приводит к поступлению Na^+ , K^+ и Cl^- в цитоплазму, увеличению концентрации внутриклеточных осмолитов и восстановлению объема клетки при действии гиперосмотического шока.

Наоборот, увеличение объема клетки, например, в результате уменьшения осмолярности внеклеточной среды, набухание клетки и растяжение мембраны приводит к увеличению проводимости КСС, в результате чего $[\text{K}^+]_i$ и $[\text{Cl}^-]_i$ снижаются, а действие гипоосмотического шока на клетку ослабляется и происходит восстановление объема клетки [Mount и др., 1999; Orlov и др., 2014].

Таким образом, как и каналы VRAC/LRRC8, котранспортеры КСС, НКСС принимают участие в регуляции объема клетки, поддержании ионного и осмотического гомеостаза клеток. КСС и НКСС работают реципрокно - действие НКСС обратное эффектам КСС. За счет регуляции объема клетки КСС и НКСС участвуют в регуляции клеточной пролиферации [Orlov и др., 2014]. Следует отметить, что активность КСС зависит от $[\text{Cl}^-]_i$. Например, повышение $[\text{Cl}^-]_i$ подавляет НКСС, но стимулирует КСС [Lytle, McManus, 2002].

Фармакология КСС хорошо развита, поскольку эти котранспортеры являются мишенями «петлевых диуретиков» – соединений, применяемых в терапии артериальной гипертензии. Наиболее известным петлевым диуретиком является фуросемид, который, наряду с другими мишенями, блокирует работу НКСС2 в проксимальных извитых канальцах, подавляя реабсорбцию натрия и стимулируя выведение воды [Delpire, 2021; Gagnon и др., 2013].

Котранспортеры КСС опосредуют электронейтральный Na^+ -независимый перенос ионов K^+ и Cl^- через плазматическую мембрану. КСС обнаружен практически во всех тканях: эпителиях, нейронах и других клетках мозга, почках, скелетных мышцах и сердце [Garneau и др., 2019]. Транскрипты всех четырех типов переносчиков КСС обнаруживаются в сердце, однако только КСС1, КСС3 и КСС4 экспрессируются на уровне белка [Mount и др., 1999; Uhlen и др., 2015]. Транскриптомный анализ одиночных клеток, выделенных из различных отделов сердца человека (левое и правое предсердие, левый и правый желудочек, верхушка желудочка, межжелудочковая перегородка), позволяет заключить [Modi и др., 2023], что повсеместно экспрессируемым транспортером почти во всех типах клеток сердечной ткани является КСС1, в то время как КСС3 и КСС4 обнаруживаются только в желудочковых кардиомиоцитах. Таким образом, удаление Cl^- из кардиомиоцитов преимущественно реализуется изоформой КСС1, как и в большинстве клеток и тканей

организма млекопитающих животных. Тем не менее, профиль экспрессии КСС является видоспецифичным. Уровень транскриптов КСС2 в сердце человека крайне низок [Karlsson и др., 2021; Litviňuková и др., 2020]. Однако КСС2 обнаруживается в желудочковых кардиомиоцитах сердца курицы, где, вероятно, способствует снижению $[Cl^-]_i$ при стимуляции β -АР [Ludwig, Rivera, Uvarov, 2017].

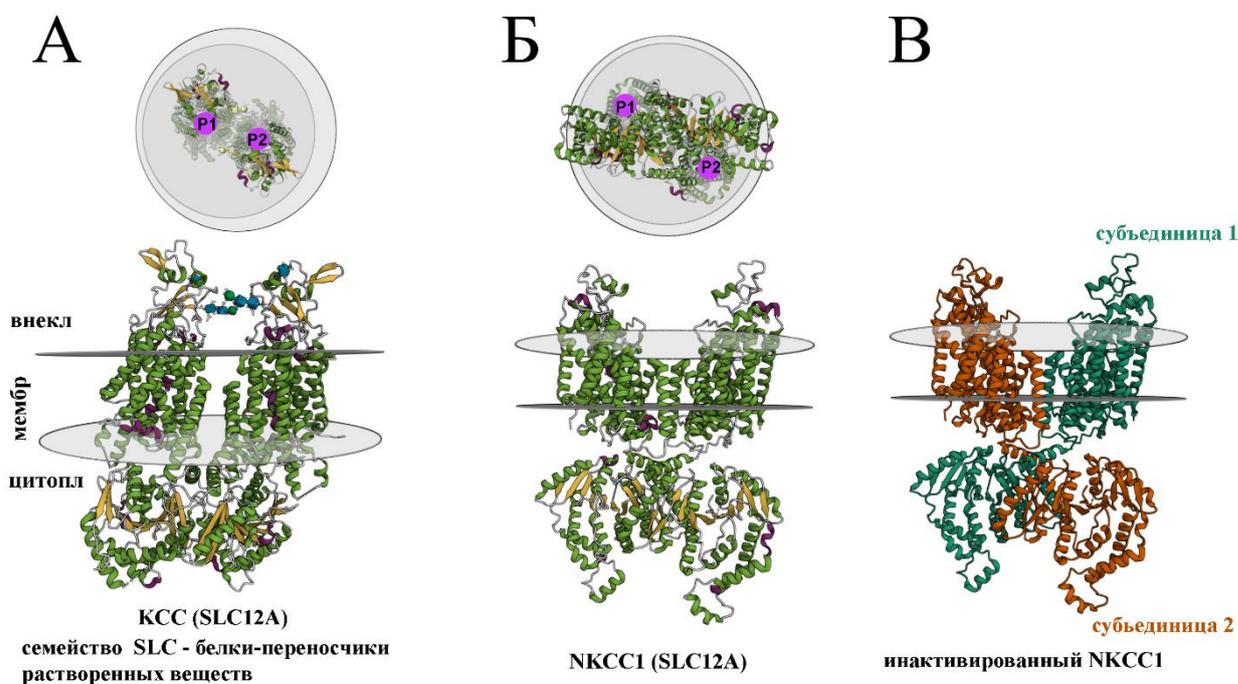


Рисунок 4. Структура хлорных трансмембранных котранспортеров (симпортеров). На верхних панелях показан вид транспортеров с внеклеточной стороны в плоскости плазматической мембраны. Зеленым цветом в структуре белка показаны α -спирали, желтым цветом – β -складки, фиолетовым цветом – 3_{10} -спираль. А – Структура котранспортера катионов калия и анионов хлора (КСС) семейства SLC12A с указанием пор или анионных проводящих путей, формируемых каждой субъединицей димера (P1 и P2). Б – Структура котранспортера катионов калия, натрия и анионов хлора (НКСС1) семейства SLC12A с указанием пор или анионных проводящих путей, формируемых каждой субъединицей димера (P1 и P2). В – Взаиморасположение субъединиц инактивированного транспортера НКСС1. Молекулярные структуры сконструированы с помощью <https://www.rcsb.org/>

Котранспортеры НКСС опосредуют электронейтральный перенос ионов Na^+ , K^+ и двух Cl^- через плазматическую мембрану. Котранспортеры НКСС экспрессируются повсеместно [Modi и др., 2023].

В норме НКСС1 обнаруживается во всех областях сердца как на уровне мРНК, так и на уровне белка [Litviňuková и др., 2020; Uhlen и др., 2015]. К настоящему времени подтверждения экспрессии «почечной» изоформы НКСС2 (SLC12A1) в сердце отсутствуют [Hartmann, Nothwang, 2015]. Как и в случае с КСС, перенос Cl^- в

кардиомиоциты осуществляется повсеместно экспрессируемой изоформой НКСС, то есть НКСС1.

Транспортеры КСС и НКСС связаны не только функционально, но и на уровне регуляции экспрессии их генов: у мышей, нокаутных по КСС3, наблюдается снижение экспрессии НКСС1. Реципрокное ослабление экспрессии НКСС у КСС-нокаутов, видимо, способствует компенсаторному снижению $[Cl^-]_i$. Однако компенсация, видимо, происходит не полностью, так как у КСС-нокаутов наблюдаются ряд патологических изменений в сердечно-сосудистой системе, включая гипертрофические изменения миокарда [Garneau и др., 2016].

Cl⁻/HCO₃⁻-обменники

Хлор-бикарбонатные обменники (антипортеры) сердца относятся к двум различным семействам: SLC4A и SLC26A. Семейство SLC4A включает в себя Na⁺-зависимые Cl⁻/HCO₃⁻-обменники (NDCBE и NCBE) и Na⁺-независимые Cl⁻/HCO₃⁻-обменники (AE1 (SLC4A1), AE2 (SLC4A2) и AE3 (SLC4A3)). Семейство SLC26A включает в себя пять различных Cl⁻/HCO₃⁻-обменников (SLC26A3, пендрин, SLC26A6, SLC26A7 и SLC26A9). На данный момент в сердце показана экспрессия электронейтральных обменников AE1-3, а также обменников SLC26A3 и SLC26A6 [Alvarez и др., 2004; Wang, Wang, 2016]. Однако сведения о том, какой обменник является в сердце основным, противоречивы. Вероятно, профиль экспрессии вышеперечисленных обменников видоспецифичен, различается в определенных отделах сердца и меняется в ходе онтогенеза. Например, экспрессия AE1 в сердце мышей сильно снижается в ходе пренатального онтогенеза [Alvarez и др., 2004].

Обменники AE1-3 (SLC4A1-3) являются гомодимерами, мономер которых состоит из трех доменов: цитоплазматического N-концевого домена, трансмембранного домена и цитоплазматического C-концевого домена (Рисунок 5 А). Наиболее известным и изученным Cl⁻/HCO₃⁻-обменником является SLC4A1 (AE1, Band 3) – хлор-бикарбонатный обменник плазматической мембраны эритроцитов. В зрелом миокарде AE3 практически не обнаруживается.

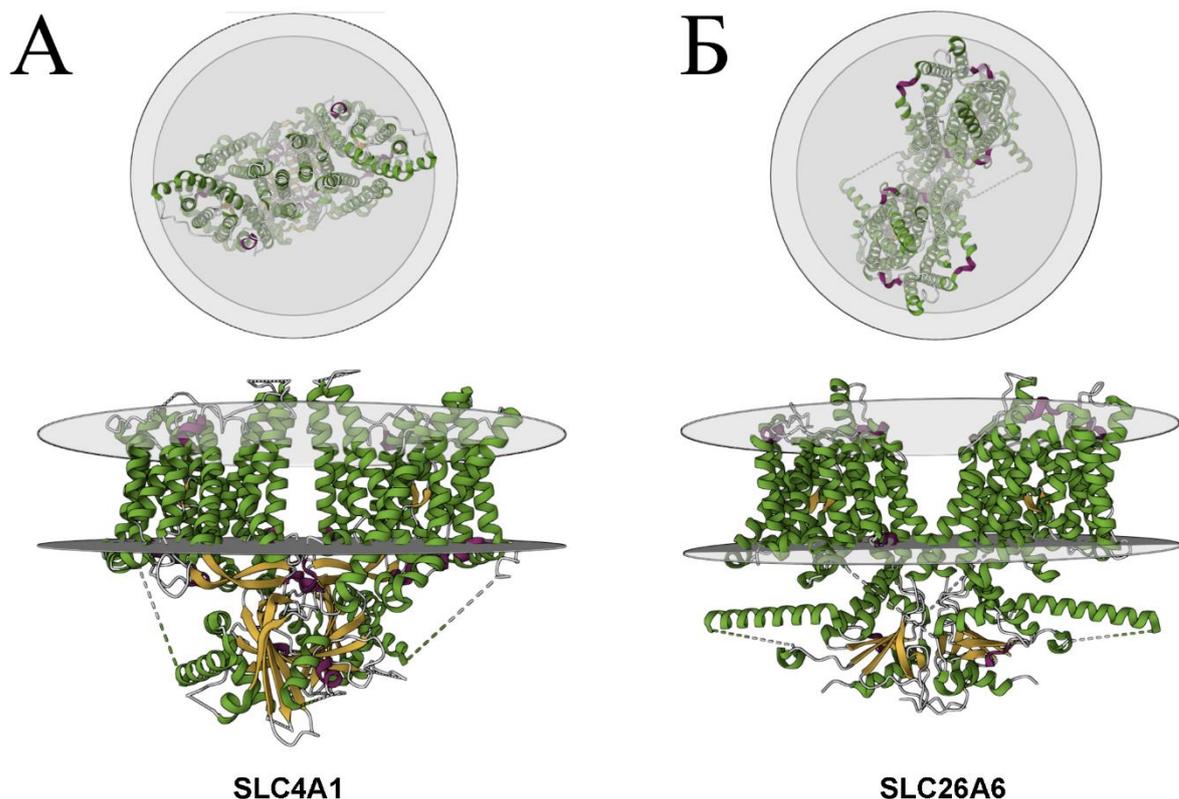


Рисунок 5. Структура хлор-бикарбонатных трансмембранных обменников (антипортеров). На верхних панелях показан вид обменников с внеклеточной стороны в плоскости плазматической мембраны. Зеленым цветом в структуре белка показаны α -спирали, желтым цветом – β -складки, фиолетовым цветом – 3_{10} -спираль. А – Структура натрий-независимого хлор-бикарбонатного обменника AE1 (SLC4A1) и его расположение в плазматической мембране. Б – Структура хлор-бикарбонатного обменника SLC26A6 и его расположение в плазматической мембране. Молекулярные структуры сконструированы с помощью <https://www.rcsb.org/>

Обменник AE2 экспрессируется в большинстве тканей. Экспрессия AE2 в сердце довольно низкая, а его наличие в кардиомиоцитах на данный момент остается неподтвержденным [Nilius и др., 1999]. AE3 считается $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменником возбудимых тканей, поскольку он экспрессируется только в сердце, мозге и сетчатке [Bonag, Casey, 2008]. В нескольких работах показано, что уровень мРНК AE3 (SLC4A3) в сердце достаточно высок [Kudrycki, Newman, Shull, 1990]. Таким образом, AE3 является основным электронейтральным хлор-бикарбонатным обменником в сердце и локализуется в основном в плазматической мембране, формирующей Т-трубочки. Интересно, что в кардиомиоцитах, помимо присутствия AE3 в плазматической мембране, показано наличие данного обменника в мембране цистерн СПР [Alvarez и др., 2007].

Хлор-бикарбонатные обменники SLC26A также являются димерами, каждый мономер которого включает 10-14 трансмембранных сегментов [Lohi и др., 2003] (Рисунок 5 Б). По разным литературным данным, обменники SLC26A кардиомиоцитов могут быть либо электрогенными (со стехиометрией $2\text{HCO}_3^-:1\text{Cl}^-$), либо электронейтральными [Chernova и др., 2005]. Также как и АЕЗ, SLC26A обнаруживается в мембране Т-трубочек и СПР кардиомиоцитов [Alvarez и др., 2007]. За счет способности перемещать анионы либо в клетку, либо из клетки основной функцией $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменников является регуляция цитоплазматического pH [Cingolani и др., 2003].

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Экспериментальные животные

В работе было использовано 295 самцов крыс стока Wistar (2-4 мес, 250±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.

В ходе экспериментов были соблюдены все актуальные требования этических норм работы с лабораторными животными в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (№123, Страсбург, 18 марта 1986 г.). Исследование одобрено этическим комитетом Научно-исследовательского института экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова Национального медицинского исследовательского центра кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России (№ ЛЭС/01.11.23). Перед экспериментами животных содержали в виварии течение 2 недель в стандартных условиях при световом режиме 12:12 с доступом к воде и пище *ad libitum*.

3.2. Получение препаратов рабочего миокарда и различных отделов проводящей системы сердца крысы

Перед эвтаназией животным вводили раствор гепарина (1000 ед./кг, внутривенно в 0,2-0,4 мл физ. раствора). Через 30 минут после введения гепарина крыс декапитировали. После эвтаназии животным вскрывали грудную клетку, извлекали сердце 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.

3.2.1. Получение многоклеточного тканевого препарата правого предсердия крысы, включающего область САУ

Для выделения препарата правого предсердия крысы сердце фиксировали правым предсердием вверх, вводили браншу ножниц в нижнюю полую вену и делали разрез к ушку правого предсердия, вырезали стенку правого предсердия с ушком, вскрывали верхнюю и

нижнюю полые вены, раскрывая препарат таким образом, чтобы эндокардиальная поверхность была доступна.

3.2.2. Получение многоклеточного тканевого препарата, включающего АВУ

Для получения препаратов АВУ извлекали сердце, как указано выше, с помощью апикобазальных разрезов вскрывали правое предсердие и правый желудочек, отсекали все участки предсердного миокарда за исключением полосы ткани шириной 2-3 мм прилегающей к анетриолатеральному и септолateralному лепесткам трикуспидального клапана. Удаляли весь желудочковый миокард за исключением полосы 2-3 мм прилегающей к анетриолатеральному и септолateralному лепесткам трикуспидального клапана. Полученный препарат, включающий атриальную и вентрикулярную полосы миокарда, разворачивали в экспериментальной камере таким образом, чтобы поверхность миокарда, обращенная в правый желудочек, и предсердие были обращены вверх. С помощью микроножниц отрезали сухожильные тяжи, фиксирующие основание лепестков клапана к эндокардиальной поверхности правого желудочка; получали доступ к миокардиальному участку в основании антериосептальной межлепестковой комиссуры и миокарду в основании септолateralного лепестка трикуспидального клапана (Рисунок 6).

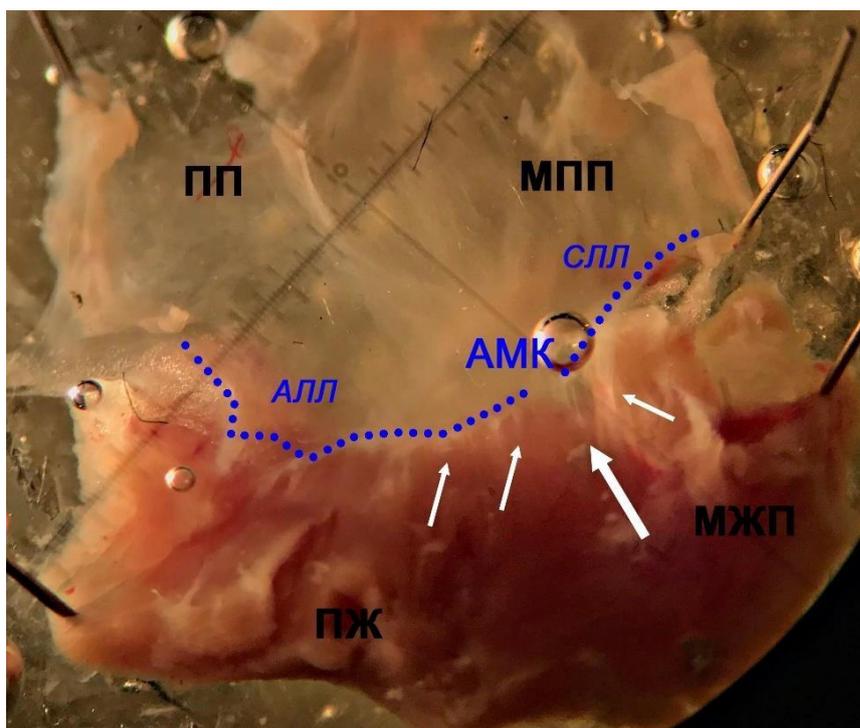


Рисунок 6. Изолированный тканевой предсердно-желудочковый препарат сердца крысы, включающий участки АВ-соединения. ПП – правое предсердие, МПП – межпредсердная перегородка, ПЖ – свободная стенка правого желудочка, МПЖ – межжелудочковая перегородка, АМК – антериосептальная межлепестковая комиссура, анетриолатеральный (АЛЛ) и септолateralный лепестки (СЛЛ) трикуспидального клапана. Стрелками указаны места отведения ПД.

3.3. Перфузия полученных препаратов сердца крысы

3.3.1. Перфузия изолированного сердца крысы

После выделения ИС осуществляли его ретроградную перфузию при 37°C; для перфузии использовали раствор Кребса-Хензеляйта следующего состава (в мМ): NaCl – 118.5, KCl – 4.7, CaCl₂ – 2.5, NaHCO₃ – 25.0, KH₂PO₄ – 1.2, MgSO₄ – 1.2, глюкоза – 11.0. Перфузионный раствор непрерывно насыщали карбогеном (95% O₂, 5% CO₂) для оксигенации и стабилизации pH (7,4). Во всех экспериментах в препаратах ИС коронарный проток составлял не менее 10 мл/мин.

3.3.2. Перфузия изолированных многоклеточных тканевых препаратов крысы

Изолированные тканевые препараты сердца крысы размещали в перфузионной камере эндокардиальной стороной вверх. Раствор для перфузии имел следующий состав (в мМ): NaCl – 129.0, KCl – 4.0, NaH₂PO₄ – 20.9, MgSO₄ – 0.5, NaHCO₃ – 20.0, CaCl₂ – 1.2, глюкоза – 5.0. Скорость протока в перфузионной камере при использовании перистальтического насоса BT100-2J (Longerpump, Китай) составляла 8-10 мл/мин (3 объема перфузионной камеры в минуту). Температура раствора была постоянной в течение всего эксперимента и составляла 37°C. Перфузионный раствор непрерывно насыщали карбогеном (95% O₂, 5% CO₂) для оксигенации и стабилизации pH (7,4). Перед началом эксперимента препараты адаптировали в перфузионной камере в течение 20-30 мин.

3.4. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии белков в рабочем миокарде и в проводящей системе сердца крысы

При иммунофлуоресцентном анализе экспрессии α_1 -АР были использованы тканевые препараты левого предсердия (ЛП, n = 3), САУ (тканевые участки радиусом 2 мм от места бифуркации артерии САУ, но не включающие ткань пограничного гребешка) крыс (n = 3) и АВУ (выделение многоклеточного препарата описано в разделе 3.2.2., n = 3). Кроме того, в препаратах АВУ также оценивали экспрессию маркера зрелых рабочих кардиомиоцитов – кавеолина 3 (Cav3). 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 фосфатно-солевом буфере (PBS) срезы инкубировали с 10% козьей сывороткой (ПраймБиоМед, Россия) на PBS в течение 30 минут при комнатной температуре во влажной камере. Срезы промывали в растворе PBS в течение 20 мин и дистиллированной водой (2 раза).

Для окрашивания срезы инкубировали 60 мин при комнатной температуре с кроличьими поликлональными антителами к α_{1A} -AP (Thermo Fisher Scientific, PA1-047, США, разведенными 1:100 на PBS с 1% бычьим сывороточным альбумином (BSA) или с кроличьими поликлональными антителами к кавеолину-3 (Thermo Fisher Scientific, PA1-066, США, разведенными 1:400 на PBS с 1% BSA). После отмывки в PBS срезы инкубировали со вторичными козьими антителами (Thermo Fisher Scientific, A-11036, США, 1:500), конъюгированными с Alexa Fluor 568 и растворенными в PBS с 1% BSA, в течение 40 минут в темноте. Препараты заключали в среду Aqua-Poly и далее исследовали на конфокальном микроскопе.

Окрашенные препараты анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия) с объективом Plan-Apochromat 20x/0,8 M27. Для возбуждения флуоресценции антител использовали диодный лазер с длиной волны 555 нм. При визуализации получали стековые изображения (4 стека, разрешение каждого стека 2048×2048 пкс, 8 бит/пкс) в конфокальном режиме (диаметр точечной диафрагмы – 1 мкм, интервал между стековыми плоскостями – 1 мкм), которые затем с помощью с помощью программного обеспечения Carl Zeiss ZEN 7.0 преобразовывали после удаления фоновой флуоресценции и шума в «однослойные» проекции, построенные по максимальным интенсивностям флуоресценции. Анализ изображений, включающий идентификацию областей специфической флуоресценции, 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 флуоресцентных пикселей в бинарном изображении к общей площади изображения. Количество пикселей, соответствующих специфической флуоресценции, нормировали на площадь среза, вмещающую 1000 клеточных ядер.

3.5. Оценка уровня целевых мРНК в рабочем миокарде и в элементах проводящей системы крысы методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (РВ-ПЦР)

Тотальную РНК левого предсердия, САУ и АВУ крысы выделяли с использованием ExtractRNA (Евроген, Россия), следуя рекомендациям производителя. Методика получения препаратов описана в разделе 3.2. Образцы гомогенизировали с использованием стерильных пестиков (Axugen, США), после чего образцы центрифугировали (10 мин, при 4°C, 15000 g) и отбирали супернатант. Тотальную РНК очищали при помощи хлороформа

(60 мкл, центрифугирование 15 мин. -4°C , 12000 g), отбырали супернатант. Тотальную РНК осаждали 96% этанолом (3 объема супернатанта, 20 минут инкубации, -20°C). В качестве соосадителя РНК использовали гликоген (2 мкл, 10 мг/мл). Затем раствор центрифугировали (10 мин. при 4°C , 12000 g). Осажденную РНК растворяли в 20 мкл деионизированной воды, свободной от нуклеаз (Евроген, Россия).

Полученный раствор тотальной РНК смешивали с 10-кратным реакционным буфером, добавляли раствор дезоксирибонуклеаза I (ДНКазы I) (2000 е.а./мл, НЕВ, США) и оставляли на 15 мин при 37°C . Затем раствор очищали от ДНКазы, добавляя 1:1 смесь фенола и хлороформа и центрифугировали. Количество и качество осажденной РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США), абсорбцию измеряли при длине волны 260 нм, (260/280 нм). Проводили электрофорез в 2% агарозном геле с целью выяснения целостности полученной РНК.

Библиотеку кДНК синтезировали с помощью ревертазы MMLV (Евроген, Россия). Для обратной транскрипции использовали 2 мкг РНК. Первую цепь кДНК синтезировали с помощью набора реагентов производства компании Евроген (#SK021, Россия), следуя рекомендациям производителя. Качество полученной кДНК оценивали методом ПЦР с помощью готовой смеси для ПЦР 5x ScreenMix (Евроген, Россия) согласно инструкции. После завершения реакции проводили электрофорез в 2% агарозном геле с целью подтверждения наличия продукта ПЦР.

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. Прямой (F) и обратный (R) праймеры (специфичные для крысы, *Rattus norvegicus*) указаны в Таблице 4. В работе определяли относительный уровень мРНК следующих генов: *Adra1a* (adrenoseptor alpha 1A), кодирующий адренорецептор α_{1A} ; *Cftr* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), кодирующий хлорный канал CFTR; *Clcn2* (chloride channel 2), кодирующий потенциал-зависимый хлорный канал ClC-2; *Clcn3* (chloride channel 3), кодирующий потенциал-зависимый хлорный канал ClC-3; *Tmem16a*

(transmembrane member 16A), кодирующий кальций-зависимый хлорный канал TMEM16A; *Lrrc8a* (leucine rich repeat containing 8 VRAC subunit A), кодирующий объем-чувствительный хлорный канал; *Slc12a4* (solute carrier family 12 member 4), кодирующий котранспортер KCC1; *Slc12a2* (solute carrier family 12 member 2), кодирующий котранспортер NKCC1 (Таблица 4).

Таблица 4. Последовательности праймеров (прямой – F, обратный – R, (специфичные для крысы, *Rattus norvegicus*), используемые в работе.

	Ген	Описание	Референ- сная последо- вательн ость NCBI	Последовательность праймеров 5'-3'	Эффект ив- ность прай- меров	Размер ПЦР- продукта
1	<i>Rplp0</i>	ribosomal protein lateral stalk subunit P0	NM_0224 02.2	F: AGGGTCCTGGCTTTGTCTGTGG R: AGCTGCAGGAGCAGCAGTGG	2.072	135
2	<i>Adra1a</i>	adrenoceptor alpha 1A	NM_0171 91.2	F: GTAGCCAAGAGAGAAAGCCG R: CAACCCACCACGATGCCAG	1.968	212
3	<i>Clcn2</i>	chloride channel 2	NM_0171 37.2	F: GGTATCTATGAGAACGAGTCC R: CTTTCATCACGGTTCCACACT	1.954	217
4	<i>Clcn3</i>	chloride channel 2	NM_0533 63.3	F: GATCTCAAGCAGATGCGGGG R: GAGCTCCTCATCGCTACTCG	1.893	175
5	<i>Tmem 16a</i>	transmembrane member 16A	NM_0011 07564.1	F: TGTGATCTCCTTCACGTCTG R: CATACTTGTGTTCTGACCACG	1.81	224
6	<i>Lrrc8a</i>	leucine rich repeat containing 8 VRAC subunit A	NM_0010 24782.1	F: CTCGTTTGAGTCGATCCGAGA R: ACCTCTAACTCCAGCAGGTCA	1.891	297
7	<i>Slc12a4</i>	solute carrier family 12 member 4	NM_0192 29.2	F: TACGTGGGAGGCATCAAGTC R: CTGTGGCAGAAGAAAGTCCA	1.82	161
8	<i>Slc12a2</i>	solute carrier family 12 member 2	NM_0317 98.2	F: TCCTCAGTCAGCCATACCCAAA R: TCCCGACAACACAAGAACCT	1.89	102

Температурный режим инкубации смеси для ПЦР в реальном времени представлен в Таблице 5. Полученные в результате РВ-ПЦР данные обрабатывали в программе Microsoft Excel (2019) (Microsoft Corporation). Кривые плавления и пороговый цикл были определены с помощью программного обеспечения CFX-96. Все образцы анализировали в трех повторностях, для расчетов использовали среднее пороговое число циклов. Относительный уровень экспрессии генов был определен с использованием метода «ΔΔCt» [Livak, Schmittgen, 2001].

Таблица 5. Температурный режим инкубации смеси для ПЦР в реальном времени.

температура, °С	время, мин	циклы
95	3	
95	0,1	40 циклов
58	0,1	
72	0,1	

3.6. Оценка уровня экспрессии целевых генов методом РНК-секвенирования

3.6.1. Выделение РНК

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. На начальном этапе проводили гомогенизацию ткани с тризолом и шариками для гомогенизации. К выделенной РНК добавляли 2 мкл ингибитора активности РНКаз RiboLock (Thermo Fisher Scientific, USA).

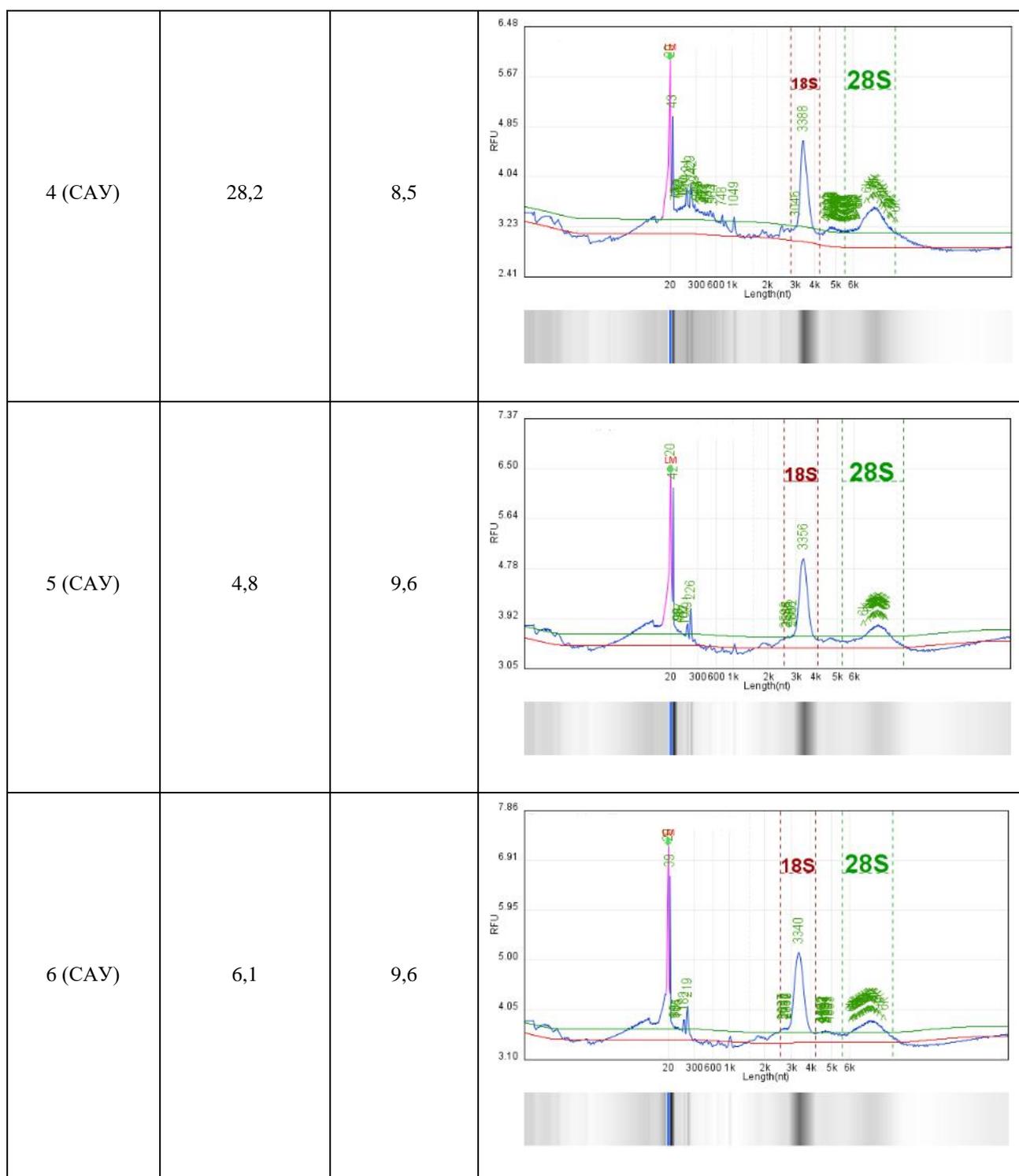
Качество выделенной тотальной РНК проверяли на приборе Qsep400 (BiOptic, Taiwan) с использованием набора RNA Cartridge Kit R1-O-4CH (BiOptic, Taiwan). Количество выделенной РНК измеряли при помощи набора Qubit RNA Broad Range (Thermo Fisher Scientific, USA).

3.6.2. Контроль качества РНК

Результаты контроля качества выделенной РНК представлены в Таблице 6.

Таблица 6. Контроль качества выделенной РНК.

Номер образца	Концентрация, нг/мкл	RIN (RQN)	Профиль Qsep400
1 (ЛП)	87,4	9,35	<p>The Qsep400 profile for sample 1 (ЛП) shows a concentration of 87.4 ng/ml and an RIN of 9.35. The graph plots RFU (2.77 to 7.64) against Length in nucleotides (20 to 6k). Key peaks are labeled: 200 (green), 182 (blue), 1017 (green), 183 (red), 28S (green), and 5.8k (green). A secondary peak is visible at 5.8k.</p>
2 (АВУ)	51,6	9,3	<p>The Qsep400 profile for sample 2 (АВУ) shows a concentration of 51.6 ng/ml and an RIN of 9.3. The graph plots RFU (2.68 to 8.07) against Length in nucleotides (20 to 6k). Key peaks are labeled: 200 (green), 180 (blue), 473 (green), 1011 (green), 183 (red), 28S (green), and 5.8k (green). A secondary peak is visible at 5.8k.</p>
3 (САУ)	16,4	8,9	<p>The Qsep400 profile for sample 3 (САУ) shows a concentration of 16.4 ng/ml and an RIN of 8.9. The graph plots RFU (2.64 to 7.75) against Length in nucleotides (20 to 6k). Key peaks are labeled: 200 (green), 182 (blue), 1017 (green), 183 (red), 28S (green), and 5.8k (green). A secondary peak is visible at 5.8k.</p>

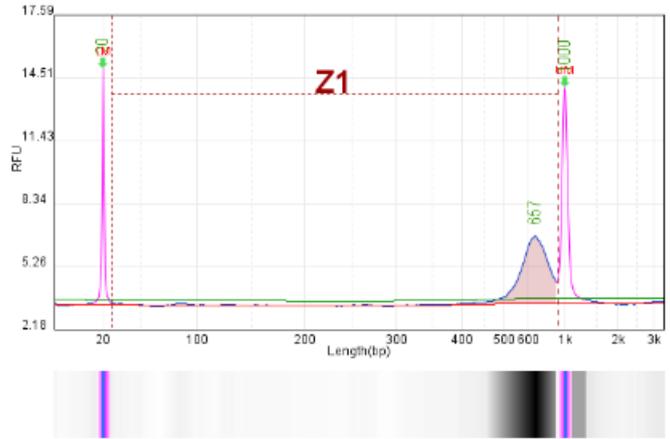
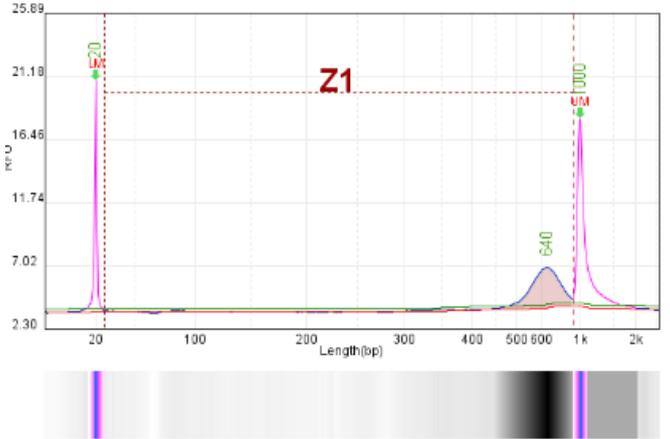


набора SpectraQ HS (Raissol, Россия). Секвенирование проводили на приборе SURFSeq 5000 (GeneMind, China) с использованием набора SURFSeq 5000 Sequencing Kit V1.0 FCH 300cycles (GeneMind, China).

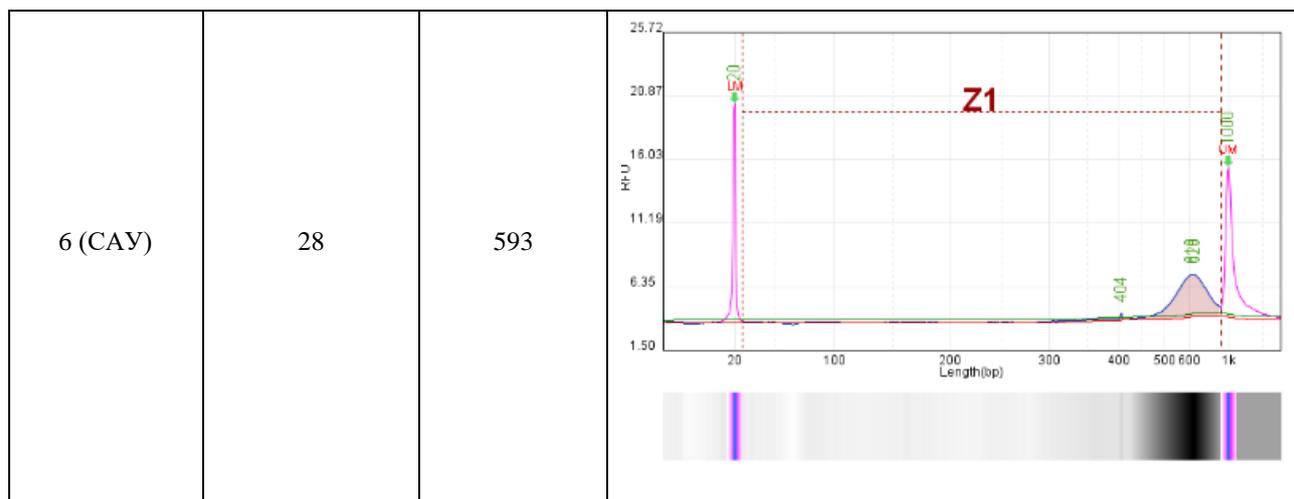
3.6.3. Контроль качества транскриптомных библиотек

Результаты контроля качества транскриптомных представлены в Таблице 7.

Таблица 7. Контроль качества транскриптомных библиотек.

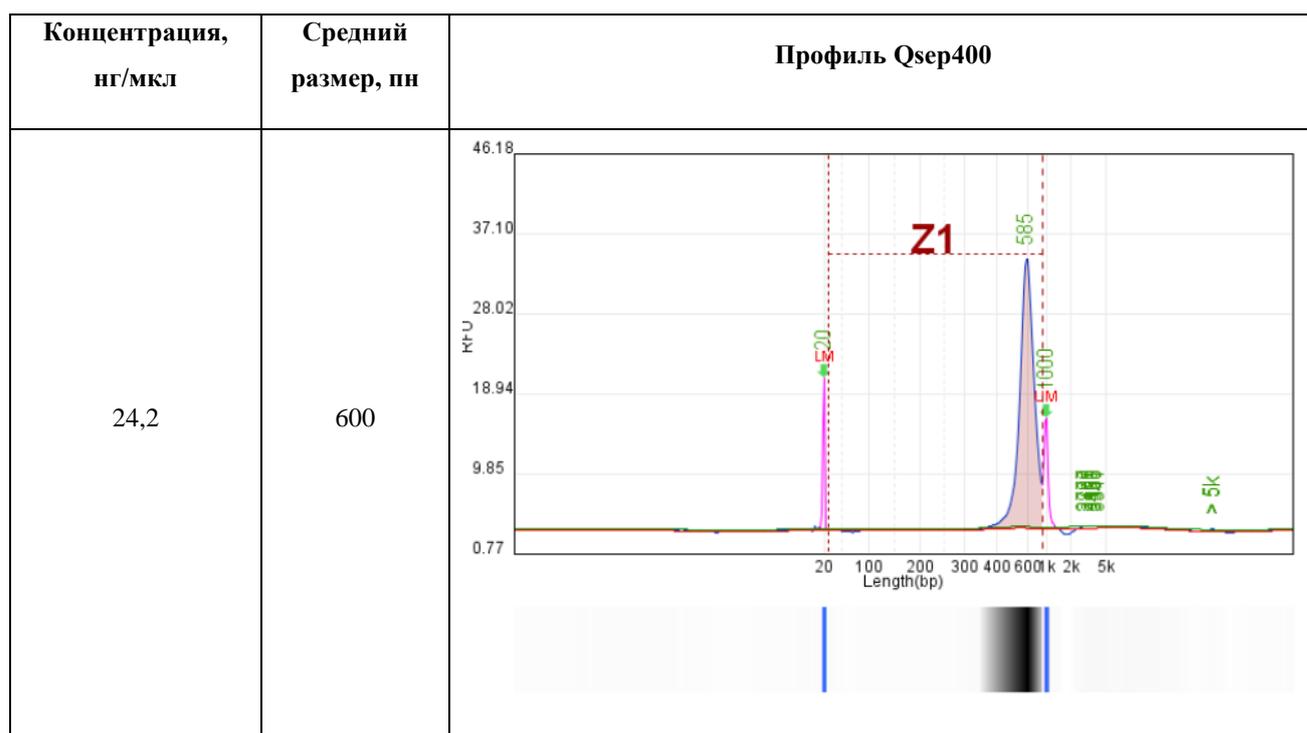
Номер образца	Концентрация, нг/мкл	Средний размер, пн	Профиль Qsep400
1 (ЛП)	80,8	634	
2 (АВУ)	76,8	603	

3 (CAY)	71,4	634	
4 (CAY)	13,8	581	
5 (CAY)	21,2	608	



Полученные библиотеки были объединены по принципу эквимоллярности. Контроль качества готового пула представлен в Таблице 8.

Таблица 8. Контроль качества пула библиотек.



3.6.4. Анализ данных РНК-секвенирования

Оценка качества ридов проводили при помощи FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Удаление адаптеров проводили с использованием Cutadapt v. 4.9 [Martin, 2011]. В необработанных данных количество сгенерированных парных чтений на образец варьируется от 51966025 до 86210684

прочтений. Чтения были картированы на геном *Rattus norvegicus* с использованием программы STAR (версия 2.7.11b) [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 АВУ по сравнению с левым предсердием.

3.7. 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 с использованием компьютерной программы Lab Chart Pro (ADInstruments, США).

В части экспериментах с записью ЭКГ применяли индукцию двойной автономной блокады (ДАБ) при помощи подкожного введения 1 мл раствора, содержащего блокатор β -АР атенолол (2 мг/кг) и блокатор М-холинорецептора атропин (1 мг/кг) для того, чтобы исключить влияние симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы. У экспериментальных крыс введение атропина и атенолола приводило к снижению ЧСС в течение 5-10 минут. Регистрацию ЭКГ у наркотизированной крысы вели в течение 5 минут до ДАБ и в течение 20 минут после.

Обработку результатов эксперимента производили в программе Lab Chart Pro (ADInstruments, США) с использованием встроенного модуля анализа параметров ЭКГ. Оценивали частоту сердечных сокращений и длительность PR-интервалов (параметр, соответствующий длительности проведения возбуждения от предсердий к желудочкам).

3.8. Оценка функции проводящей системы в изолированном сердце крысы

Для оценки функциональных изменений в САУ и АВУ сердца крысы использовали метод перфузии изолированного по Лангендорфу сердца (при постоянном перфузионном давлении - 80 мм рт. ст.) крысы. После предварительной анестезии (3,5% изофлюрана в смеси с кислородом) и гепаринизации (1000 ед/кг, внутривенно) крыс декапитировали, вскрывали грудную клетку и извлекали сердце, которое помещали в ванночку с холодным перфузионным раствором (4°C) и отмывали от крови. Затем препарат сердца крысы через аорту фиксировали на канюле и осуществляли ретроградную перфузию при 37°C; для перфузии использовали раствор Кребса-Хензеляйта (состав приведен в разделе 3.3.1.).

Длительность каждого эксперимента не превышала 40 минут от подключения препарата сердца к установке для перфузии. Вещества поступали в перфузионный раствор через шприц с катетером в инфузоре LSP04-1A (Longer Precision Pump Co, Ltd; Китай). Непосредственно перед подачей агонистов и блокаторов измеряли проток раствора через сердце в течение одной минуты. Затем на инфузоре устанавливали скорость подачи вещества равную 1% от протока раствора через сердце (коронарные сосуды).

3.8.1. Оценка времени восстановления функции САУ в изолированном сердце

После подключения ИС к перфузионной установке с помощью микроманипуляторов на поверхность ушка правого предсердия помещали биполярные серебряные электроды для регистрации ЭГ с помощью дифференциального усилителя (Нейробиолаб, NBL302, Россия); 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 10-минутного периода адаптации в начале эксперимента определяли длительность интервалов между возбуждениями, спонтанно генерируемыми САУ. Затем биполярные стимулирующие электроды, подключенные к аналоговому изолятору и генератору импульсов (Нейробиолаб, DL360, Россия), размещали в области САУ. С помощью стимулирующих электродов, с частотой на 10% превышающей «синусный» ритм (180 ± 20 мс) в течение 5 мин наносили возбуждающие стимулы (длительность – 2 мс, амплитуда – 2-6 В) для подавления автоматизма САУ. 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 (Рисунок 7 А). Корректированное время восстановления функции синусного узла (кВВФСУ) рассчитывали, как разницу между ВВФСУ и исходным спонтанным ритмом САУ.

Также для каждого из межстимульных интервалов рассчитывали скорость «аккомодации» САУ, которую определяли как отношение длительностей 10-го и последнего цикла возбуждения САУ за минутный период спонтанной активности (Рисунок 7 Б).

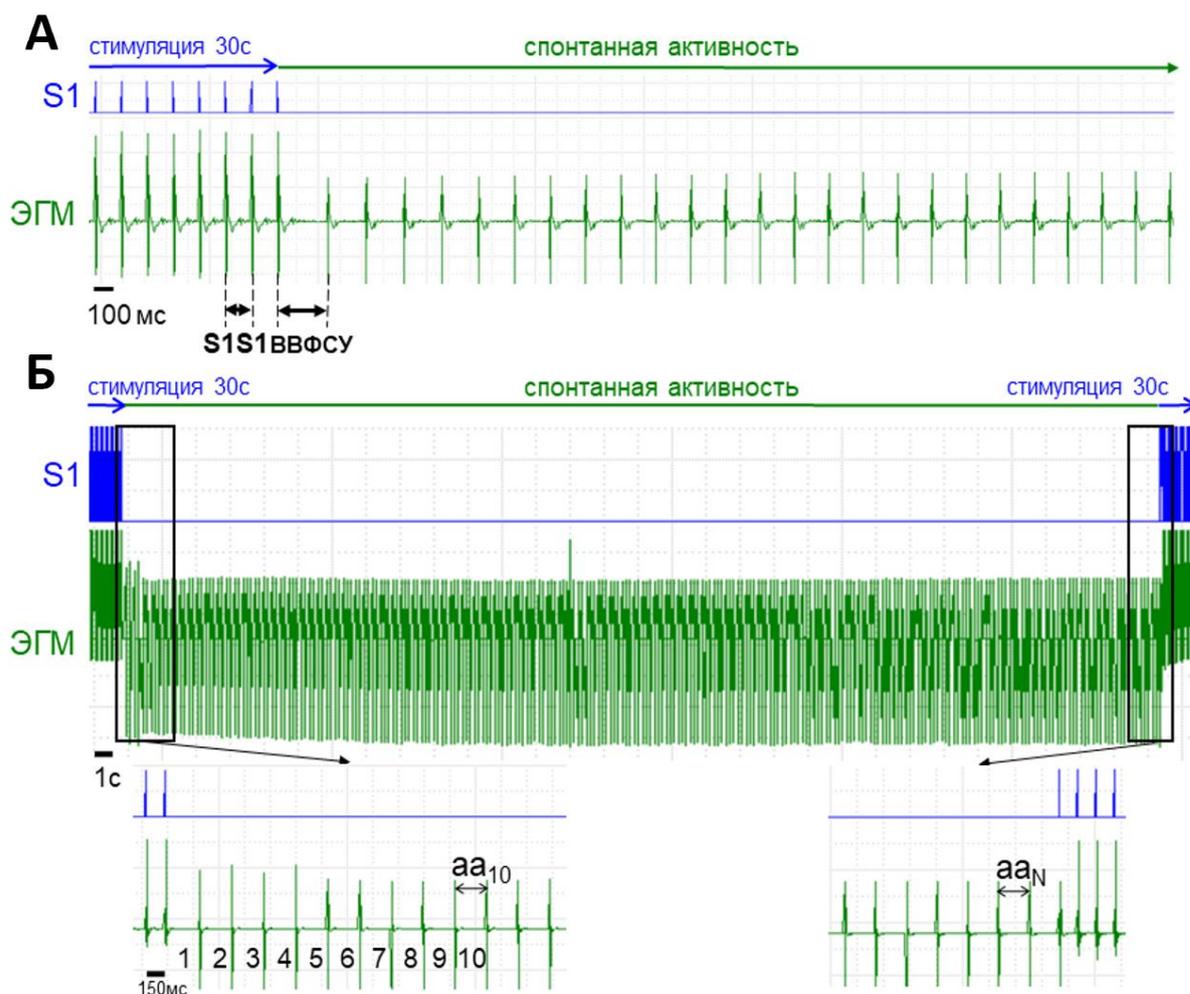


Рисунок 7. Схема эксперимента по оценке времени восстановления функции синусного узла (ВВФСУ) (А) и скорости аккомодации САУ (Б). S1S1 – межстимульный интервал, aa₁₀ – длительность десятого спонтанного кардиоцикла после стимуляции, aa_N – длительность последнего спонтанного кардиоцикла перед началом последующей стимуляции, ЭГМ — электрограмма.

Во всех сериях экспериментов определяли ВВФСУ и скорость аккомодации САУ в контрольных условиях, при действии 10 мкМ агониста α_1 -АР фенилэфрина, блокатора протеинкиназы С (PKC) бисиндолилмалеимида (ВІМ), а также блокаторов хлорных каналов: 4-(2-бутил-6,7-дихлоро-2-циклопентилиндан-1-он-5-ил)оксимасляная кислота (ДСРІВ), 9-АС, NPPB и MONNA (концентрации представлены в разделе 3.14, все реактивы Sigma, США). Кроме того в ряде экспериментов исследуемые параметры определяли при действии 10 мкМ фенилэфрина на фоне ВІМ, а также на фоне NPPB.

3.8.2. Оценка атриовентрикулярного проведения в изолированном сердце крысы

После подключения ИС к перфузионной установке с помощью микроманипуляторов на поверхность левого предсердия (в области основания ушка предсердия), а также на поверхность левого желудочка в области «верхушки» сердца помещали биполярные серебряные электроды для регистрации ЭГ. ЭГ регистрировали с помощью дифференциального усилителя (Нейробиолаб, NBL302, Россия); усиленный и отфильтрованный сигнал регистрировали с помощью аналого-цифрового преобразователя (5 КГц, E-154, L-Card, Россия), подключенного к персональному компьютеру; для записи и обработки ЭГ использовали программное обеспечение PowerGraph 3.3 (Ди-софт, Россия).

После 10 минут адаптации ИС определяли длительность интервалов между возбуждениями предсердий и величину атриовентрикулярной задержки (АВЗ) при естественном «синусном» ритме. Затем биполярные стимулирующие электроды, подключенные к аналоговому изолятору и генератору импульсов (Нейробиолаб, DL360, Россия), размещали на границе правого предсердия и предсердной перегородки, предварительно разрушив синоатриальный узел путем удаления миокарда межвенной области правого предсердия. С постоянными межстимульными интервалами наносили возбуждающие стимулы (2 мс, 2–6 В), вызывающие возбуждение предсердий с частотой на 10% больше «синусного» ритма (180 ± 20 мс).

Оценивали следующие функциональные характеристики АВУ: длительность (1) и величину осцилляций (2) АВЗ при антероградном (предсердно-желудочковом) режиме проведения возбуждения, длительность эффективного рефрактерного периода (ЭРП) АВУ (3), значение «точки Венкебаха» (ТВ) (4), а также встречаемость блоков проведения в АВУ (5). Использовали следующий протокол: каждые 30 с уменьшали длительность межстимульного интервала от «синусового» ритма на 10 мс вплоть до 110 мс, далее интервал уменьшали с шагом 5 мс, а начиная со 100 мс – с шагом 2 мс вплоть до ЭРП.

Длительность ЭРП определяли как наибольший межстимульный интервал, при котором возбуждение желудочков происходит в ответ лишь на каждый второй очередной возбуждающий стимул. Для каждого значения межстимульного интервала величину АВЗ определяли как разницу между моментом возникновения предсердного и желудочкового кардиоцикла. Блок проведения в АВУ определяли по отсутствию возбуждения желудочков после очередного стимула. Встречаемость блоков проведения в АВУ рассчитывали для каждого препарата как отношение количества блоков проведения в АВУ к общему количеству кардиоциклов при длительности межстимульных интервалов, соответствующих ТВ. Значение ТВ определяли как межстимульный интервал, при котором возникает хотя бы единичный блок проведения в АВУ в течение 30 с. Величину осцилляций АВЗ (ΔAB , то есть разброс между самыми короткими и самыми длинными АВЗ) рассчитывали по формуле, приведенной ниже:

$$\Delta AB = \frac{AB_{n-1} - AB_{n+1}}{SIS1_{TB}} * 100, \text{ где}$$

AB_{n-1} – длительность АВЗ (наибольшая) в цикле, предшествующем блоку проведения в АВУ, AB_{n+1} – длительность АВЗ (наименьшая) в цикле, последующем блоку проведения в АВУ, $SIS1_{TB}$ – величина межстимульных интервалов в ТВ.

После определения функциональных характеристик АВУ в контрольных условиях ($n = 20$) устанавливали «исходную» частоту стимуляции на 20 мин, затем определяли функциональные характеристики либо в присутствии 0,1–10 мкМ агониста α_1 -АР ФЭ, либо в присутствии АТФ, либо в присутствии блокаторов хлорной (анионной проводимости): пробенецида (ПРБ), 9-АС, DCPIB, NPPV и MONNA. Затем у части препаратов проводили регистрацию функциональных характеристик АВУ при одновременном действии 10 мкМ ФЭ и блокатора хлорной проводимости (DCPIB или ПРБ) или при действии АТФ на фоне ПРБ.

3.9. Оптическое картирование хронотопографии возбуждения в тканевых препаратах САУ сердца крысы

Для анализа хронотопографии активации САУ, а также анализа паттерна распространения возбуждения в синоатриальной области правого предсердия использовали метод оптического картирования электрической активности миокарда, основанный на потенциал-зависимой флуоресценции мембранного зонда di-4-ANEPPS. Для насыщения зондом тканевых препаратов правого предсердия крысы перфузировали в течение 30 мин раствором Тироде, содержащим 5 μ M di-4-ANNEPS (Sigma-Aldrich, США).

Флуоресценцию di-4-ANEPPS возбуждали с помощью кольцевого светодиодного осветителя с максимумом спектра излучения 470 нм, (5 Вт), суммарным световым потоком до 1500 люмен. Флуоресцентные сигналы регистрировали с помощью высокочувствительной фотодиодной (PDA) матрицы H469V-012 (WuTech H-469V, Gaithersburg, MD, USA), имеющей 256 фотодиодов и включенной в состав оптико-электронной установки. Для разделения возбуждающего света и эмиссии использовали красный фильтр (пропускание > 610 нм), помещенный на входе фотодиодной матрицы. Оптическая система матрицы была настроена таким образом, что при картировании «охватывала» участок препарата длиной 5.5 мм ($S \approx 19 \text{ мм}^2$). Поле съемки PDA также проецировали на фотокамеру (NexImage, Celestron), что позволяло осуществлять анатомическую локализацию оптических сигналов при анализе данных.

Флуоресценцию препаратов регистрировали с интервалами 0.61 мс в течение 1000 мс, таким образом получали записи, включающие не менее трех циклов возбуждения препарата. Сигналы от всех фотодиодов матрицы поступали на АЦП, регистрацию и обработку сигнала осуществляли при помощи программы Cadrioplex (RedShirtImaging, США). В результате прослеживания изменения уровня флуоресценции во времени по каждому фотодиоду матрицы получали оптические сигналы, соответствующие потенциалам действия («оптические» ПД).

Проводили фильтрацию шума, основанную на применении скользящей медианы (по 5 точкам). После фильтрации оптические сигналы нормализовали на фоновую флуоресценцию (F_0). На основе оптических ПД строили изохронные карты, отражающие моменты одновременной активации в картируемой области миокардиальных препаратов. Для построения изохрон определяли максимальное значение производной оптических ПД (dF/dt_{\max}) для каждого фотодиода PDA, подразумевая, что значение dF/dt_{\max} соответствует максимальной скорости фазы деполяризации ПД в «точке» миокарда и соответствует моменту активации «точки» в ткани.

На основе изохрон 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.

3.10. Внутриклеточная регистрация потенциалов действия в многоклеточных тканевых препаратах, включающих АВУ сердца крысы

Биоэлектрическую активность в изолированных миокардиальных препаратах АВУ (получение препаратов описано в разделе 3.2.2.) регистрировали при помощи стандартной микроэлектродной техники. Отведение потенциалов действия (ПД) осуществляли с эндокардиальной стороны многоклеточного препарата при помощи стеклянных микроэлектродов (сопротивление 10-30 МОм, изготавливали при помощи пуллера Sutter Instrument, США) из медицинских стеклянных катетеров (WPI, США) с внешним диаметром 1,2 мм, внутренним – 0,6 мм. Электрод заполняли электролитом (3М КСl). Сигнал от микроэлектрода поступал на усилитель (А-М system 1600, США), далее через АЦП (Е-154, L-card, Россия) сигнал поступал на компьютер, где был записан при помощи программы «Power Graph 3.3.8» («ДИСофт», Россия).

Стабильного отведения ПД добивались путем погружения микроэлектрода в верхние слои фиксированного в перфузионной камере препарата миокарда при помощи микроманипулятора Narishige MM-3 (Япония).

Анализ данных, зарегистрированных при помощи микроэлектродной техники в препаратах АВУ, проводили с использованием различных программ. Такие параметры как уровень мембранного потенциала покоя (МПП), частота следования спонтанных потенциалов действия (СПД), максимальная скорость нарастания переднего фронта ПД (dv/dt_{max}) анализировали в программе «Power Graph 3.3.8» («ДИСофт», Россия).

Исследование биоэлектрической активности в препаратах АВУ крыс осуществляли согласно следующему протоколу: после извлечения многоклеточного препарата АВУ, помещали его в перфузионную камеру и адаптировали при постоянном протоке раствором Тиродэ (37°C) в течение 30-40 минут. В течение следующих 15-20 минут регистрировали биоэлектрическую активность, при этом стимуляция препарата происходила эндогенно, в собственном ритме АВУ. В нескольких точках АВУ (Рисунок б) отводили ПД, выбирая участок, в котором потенциал покоя был наименее негативен (-60-65 мВ), наблюдалась диастолическая деполяризация с наибольшим наклоном (0,01-0,04 В/с), а скорость фронта ПД была наименьшая (20-50 В/с). Таким образом, отводили ПД в наиболее близком участке миокарда к переходу между пенетрирующей частью АВУ и основанием правой части пучка Гиса. В расчет брали только те ПД, где наблюдали отчетливую диастолическую деполяризацию, а скорость фронта ПД не превышала 5 В/с, что гарантировало принадлежность ПД к ведущему (истинному) ритмоводителю.

Функциональные эксперименты, направленные на выявление и описание эффектов пуринов в АБУ сердца, проводили по следующей схеме: контрольная запись (1 мин), подача АТФ и запись ПД (10 мин), затем «отмыв» в течение 15-20 мин.

3.11. Меркуриметрический для оценки цитоплазматической концентрации хлора в многоклеточных тканевых препаратах

Для оценки внутриклеточной концентрации хлора в тканевых препаратах ЛП и САУ выделяли многоклеточные препараты (раздел 3.2). 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) образует с индикатором дифенилкарбазоном ($C_{13}H_{12}N_4O$) в кислой среде ($pH = 2,5 \pm 0,2$) окрашенное в фиолетовый цвет комплексное соединение, при появлении которого прекращают титрование.

3.12. Визуализация и анализ колебаний внутриклеточной концентрации ионов хлора в многоклеточных тканевых препаратах, включающих САУ крысы

Для анализа колебаний внутриклеточной концентрации ионов хлора в многоклеточном тканевом препарате, включающем область САУ, использовали метод, основанный на регистрации Cl^- -зависимой флуоресценции зонда MQAE (N-(этоксикарбонилметил)-6-метоксихинолиния бромид, Sigma-Aldrich, США).

Зонд MQAE является этерифицированным производным хинолина, поэтому в цитоплазме MQAE может подвергаться гидролизу с отщеплением ацетатной группы (Рисунок 8 А). В результате гидролиза интенсивность хлор-зависимой флуоресценции снижается, однако, скорость гидролиза низкая и флуоресценция зонда остается стабильной в течении, как минимум, 60 минут.

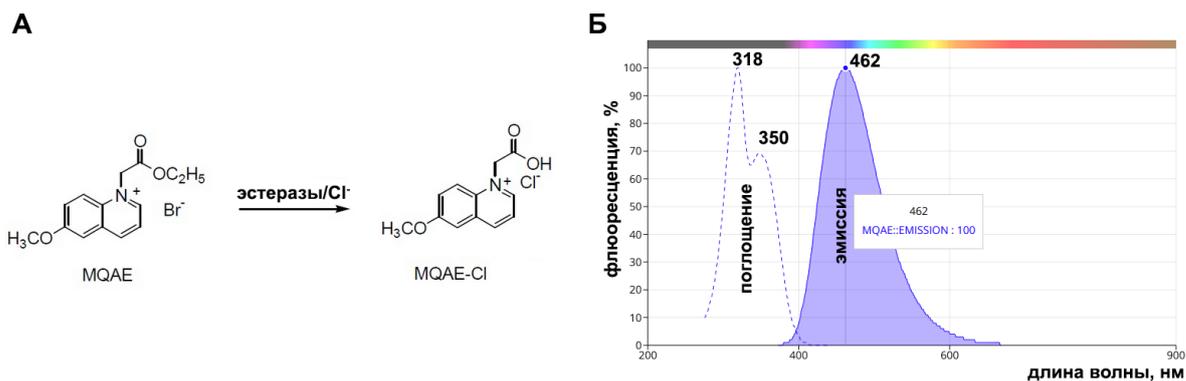


Рисунок 8. А – Структура MQAE. Замена аниона брома хлором приводит к тушению флуоресценции MQAE. Б – Спектры поглощения и эмиссии MQAE.

Анионы хлора замещают ионы брома в комплексе «флуорофор MQAE»-галоген-анион. Анионы хлора выступают в роли тушителя флуоресценции MQAE. Поэтому, повышение $[Cl^-]_i$ приводит к ослаблению флуоресценции (снижению квантового выхода флуоресценции) MQAE; интенсивность флуоресценции MQAE обратно пропорциональна внутриклеточной концентрации хлора. Константа Штерна-Фольмера для зонда составляет $K_{sv}=200 \text{ M}^{-1}$, таким образом MQAE демонстрирует чувствительность к изменению концентраций Cl^- в миллимолярном диапазоне (5-25 мМ), характерном для цитоплазмы кардиомиоцитов и других клеток. Важно, что стационарная интенсивность флуоресценции MQAE демонстрирует линейную зависимость от $[Cl^-]_i$ в диапазоне 5-25 мМоль.

MQAE имеет два максимума спектра поглощения – 318 и 350 нм (Рисунок 8 Б). Для снижения повреждающего воздействия на ткань в данной работе для возбуждения флуоресценции MQAE использовали источник возбуждающего света с длиной волны 350 нм («мягкий» ультрафиолет длинноволнового диапазона). В качестве источника возбуждающего света использовали светодиоды Seoul VIOSYS с пиком излучения 365 нм и полушириной спектра – 9 нм (суммарная мощность 12 Вт, суммарный световой поток до 2500 люмен).

MQAE имеет максимум спектра эмиссии 462 нм (Рисунок 8 Б). Для регистрации флуоресценции использовали зеленый фильтр с длиной волны отсечения $>480 \text{ нм}$. Флуоресцентные сигналы регистрировали с помощью высокочувствительной CCD камеры (M-Shot, MS60-2, Китай), время экспозиции составляло 10 мс. Оптическая система была настроена таким образом, что при регистрации флуоресценции «охватывался» участок тканевого препарата, включающего межвенную область и САУ, диаметром 5.5 мм

($S \approx 19 \text{ мм}^2$). Поле съемки проецировали на фотокамеру (M-shot, MS50), что позволяло осуществлять анатомическую локализацию оптических сигналов при анализе данных.

Для насыщения зондом тканевые препараты правого предсердия крысы, включающие САУ, перфузировали в течение 30 мин раствором Тироде, содержащим 1 мМ MQAE. Хлор-зависимую флуоресценцию регистрировали в контрольных условиях, а также через 1, 3, 6 и 9 минут перфузии раствором с измененной осмолярностью или действия агониста α -АР.

Анализ флуоресцентных сигналов осуществляли с использованием программы ImageJ (ImageJ 1.50i) используя плагин Bio-Formats Explorer ImageJ. (imagej.net/Bio-Formats). После вычитания фона методом скользящего параболоидного усреднения, используя стандартные процедуры ImageJ, осуществляли суммирование значений флуоресценции в 10 последовательно снятых (повторных контрольных или повторных экспериментальных) изображениях для каждого пикселя. Далее рассчитывали среднее значение интенсивности флуоресценции по всей площади изображения. Полученные значения использовали для сопоставления интенсивности хлор-зависимой флуоресценции, пропорциональной $[Cl^-]_i$, в межвенной области правого предсердия в контрольных условиях и при экспериментальном воздействии. В некоторых случаях получали дифференциальные изображения, осуществляя процедуру попиксельного вычитания яркости флуоресценции в изображениях, полученных в контрольных и экспериментальных условиях. Дифференциальные изображения использовали для выявления областей ткани в области САУ и его периферии, демонстрирующих наибольшее изменение $[Cl^-]_i$ при экспериментальных воздействиях.

3.13. Реактивы, используемые в работе

Таблица 9. Реактивы, используемые в работе

Название	Фармакологическая активность	Производитель	Растворитель	Рабочая концентрация /доза
9-АС	Блокатор хлорных каналов	Sigma Aldrich	DMSO	10 мкМ
α , β -метилтен-АТФ	Агонист P2X-рецепторов	Sigma Aldrich	H ₂ O	10 мкМ
ВМ	Блокатор протеинкиназы С	Sigma Aldrich	DMSO	10 мкМ

DCPIB	Блокатор хлорных каналов	Sigma Aldrich	DMSO	1 мкМ
di-4-ANNEPS	Потенциал-чувствительный флуоресцентный краситель	Sigma Aldrich	DMSO	5 мкМ
MQAE	Флуоресцентный хлорный зонд	Sigma Aldrich	H ₂ O	1 мМ
MONNA	Блокатор хлорных каналов	Sigma Aldrich	DMSO	1 мкМ
NPPB	Блокатор хлорных каналов	Sigma Aldrich	DMSO	1 мкМ
Атенолол	Антагонист β -АР	Sigma Aldrich	H ₂ O	2 мг/кг
Атропин	Антагонист М-холинорецепторов	Sigma Aldrich	H ₂ O	1 мг/кг
АТФ	Агонист пуриновых (Р) рецепторов	Sigma Aldrich	H ₂ O	8 мг/кг
АДФ	Агонист P2Y-рецепторов	Sigma Aldrich	H ₂ O	8 мг/кг
УДФ	Агонист P2Y-рецепторов	Sigma Aldrich	H ₂ O	8 мг/кг
УМФ	Агонист P2Y-рецепторов	Sigma Aldrich	H ₂ O	8 мг/кг
Гепарин	Антикоагулянт	-	физ. р-р	1000 ед./кг
ДМСО (диметилсульфоксид)	Растворитель органических молекул	Helicon	-	50 мкл 10.5 мМ / 100 мл р-ра
Фенилэфрин	Агонист α_1 -АР	Sigma Aldrich	H ₂ O	10 мкМ
Пробенецид	Блокатор анионной проводимости	Sigma Aldrich	NaOH	1-100 мкМ
Козья сыворотка	Блокировка неспецифичных сайтов связывания антител	ПраймБиомед	Фосфатно-солевой буфер	10%
DAPI	Ядерный краситель	Sigma Aldrich	Фосфатно-солевой буфер	1:2000

Aqua-Poly/Mount	Среда для фиксации препаратов	Polysciences Inc.	-	-
ExtractRNA	Реагент для выделения суммарной РНК	Евроген	-	Согласно инструкции производителя
Хлороформ	Экстракция нуклеиновых кислот	Химмед	-	100%
Этанол	Осаждение РНК	Химмед	-	96%
RNase-free DNase I kit	Эндонуклеаза, удаляющая одно- и двухцепочечную ДНК	Thermo Fisher	-	Согласно инструкции производителя
MMLV RT kit	Обратная транскриптаза	Евроген	-	Согласно инструкции производителя
qPCRmix-HS SYBR kit	5X реакционная смесь qPCRmix-HS SYBR предназначена для высокоспецифичной ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем SYBR Green I	Евроген	-	Согласно инструкции производителя

3.14. 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 парного или непарного t-критерия Стьюдента (при нормальном распределении выборки), критерия Mann-Whitney (при распределении выборки не соответствующем нормальному), однофакторной и двухфакторной ANOVA (с последующим применением апостериорных тестов Тьюки и Шидака соответственно) после предварительной проверки нормальности распределения в группах с помощью теста Шапиро-Вилка. Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение, если в подписи к рисунку не указано иное. Количество отдельных измерений (n) указано в разделе Результаты.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1. Экспрессия α_1 -адренорецепторов в структурах проводящей системы сердца

4.1.1. Экспрессия α_1 -адренорецепторов в САУ

В центральной части САУ в зоне бифуркации артерии синусного узла обнаруживаются флуоресцентные сигналы, указывающие на присутствие α_{1A} -АР во всех образцах ($n = 5$) (Рисунок 9). Характер флуоресцентных сигналов демонстрирует, что α_{1A} -АР имеют кластерное распределение в САУ, типичное для рецепторов данного типа. Часть кластеров α_{1A} -АР в САУ окружает области, соответствующие ядрам кардиомиоцитов. Помимо перинуклеарной зоны, специфическая флуоресценция обнаруживается на периферии клеток САУ, что соответствует мембранной локализации рецепторов. Интенсивные флуоресцентные сигналы обнаруживаются также в стенке артерий САУ и в области эндокардиальной поверхности образцов, что типично для указанных участков и является верификацией специфичности окрашивания, соответствующая экспрессии α_{1A} -АР в гладкомышечных и эндотелиальных клетках.

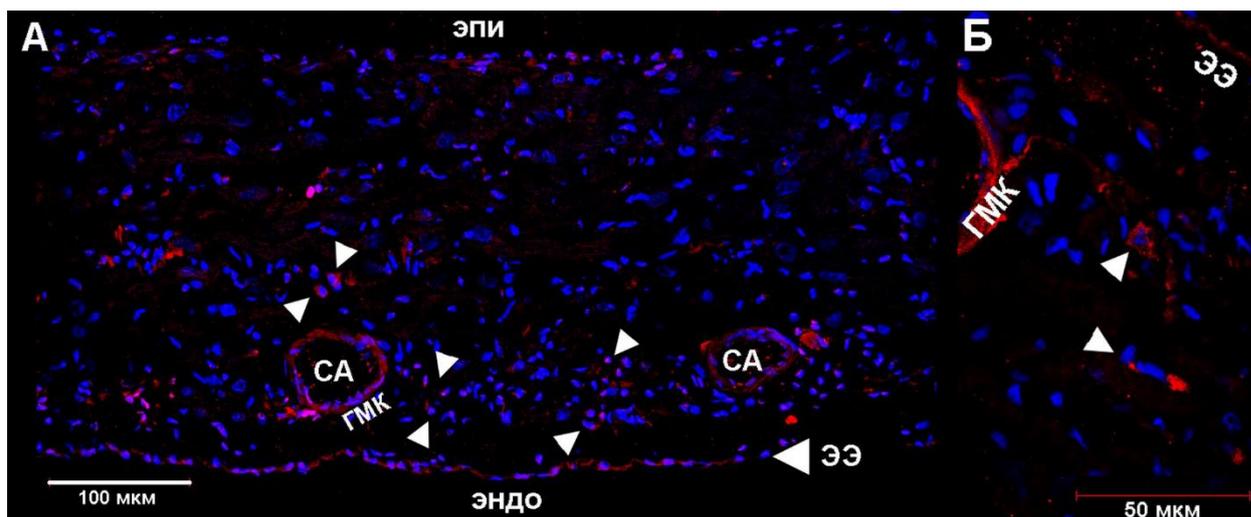


Рисунок 9. Иммуноэкспрессия α_1 -адренорецепторов в миокарде синоатриального узла крысы. А – Репрезентативное конфокальное изображение, демонстрирующее флуоресцентные сигналы (красный псевдоцвет, Су3) антител, специфически связывающих α_{1A} -АР, в области ветвей артерии САУ. Эндо, эпи – эндокардиальная и эпикардиальная поверхность стенки правого предсердия; ЭЭ – эндокардиальный эндотелий; СА – ветви артерии САУ; ГМК – гладкомышечная обкладка артериальной стенки. Белыми стрелками указаны кардиомиоциты в центральной части на периферии САУ, экспрессирующие α_{1A} -АР. Синий псевдоцвет – клеточные ядра (DAPI). Б – То же, что и на А, но при большем увеличении.

Экспрессия α_{1A} -АР в САУ подтверждается на уровне мРНК ($n = 6$). При оценке экспрессии мРНК α_{1A} -АР (*adra1a*) методом РВ-ПЦР установлено, что мРНК α_{1A} -АР у взрослых крыс экспрессируется как в левом предсердии, так и в САУ (Рисунок 10).

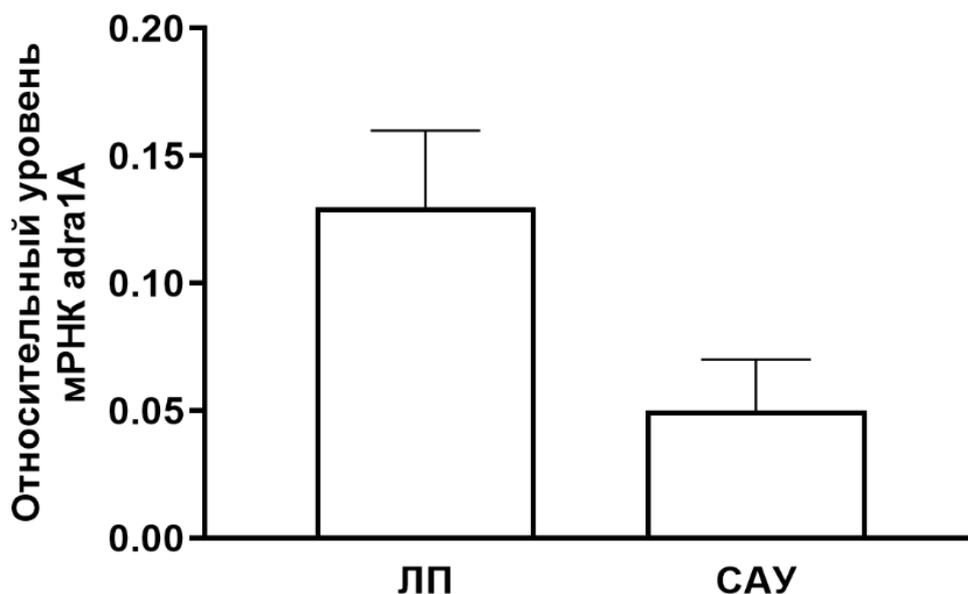


Рисунок 10. Относительный уровень мРНК α_1 -адренорецепторов в миокарде левого предсердия (ЛП) и миокарде САУ крысы.

Анализ данных РНК-секвенирования также выявляет статистически значимый уровень мРНК α_{1A} -АР в ЛП и САУ ($\log_2FC = -0.57$, $p = 0.03$, $n = 3$) (Рисунок 11).

4.1.2. Экспрессия α_1 -адренорецепторов в АВУ

При анализе иммуноэкспрессии α_{1A} -АР во всех тканевых препаратах АВУ ($n = 5$) также обнаруживаются флуоресцентные сигналы, соответствующие кластерам α_{1A} -АР (Рисунок 12). Аналогично САУ в АВУ для α_{1A} -АР характерна локализация как в плазматической, так и в ядерной мембране. Флуоресцентные сигналы также обнаруживаются в гладкомышечной стенке артерий.

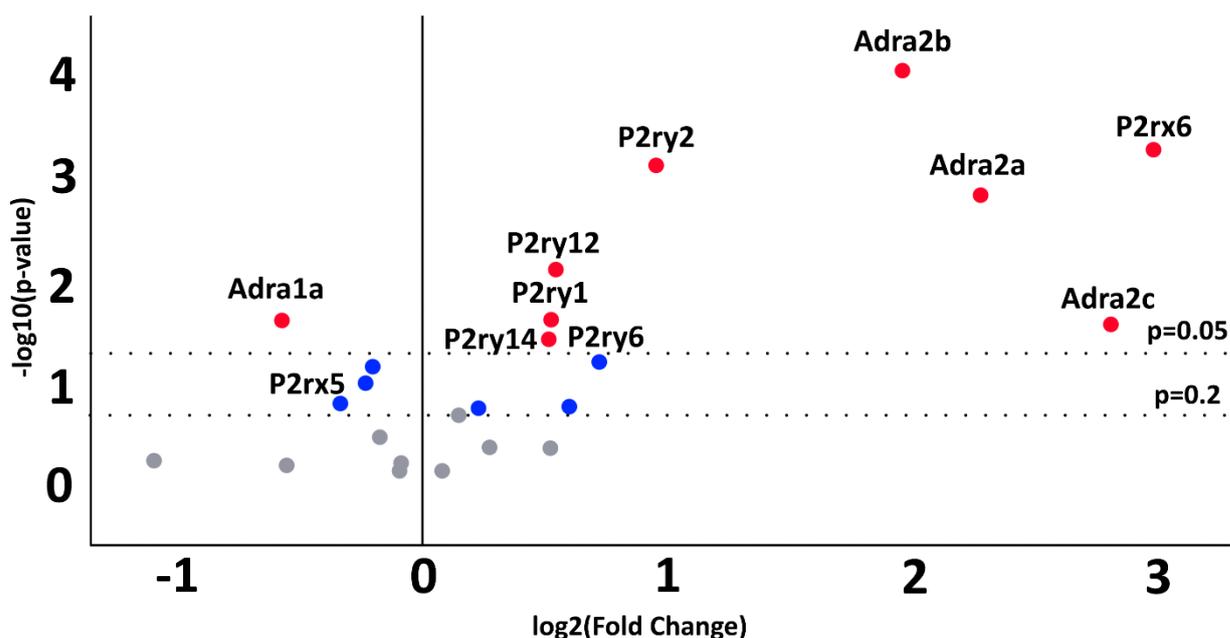


Рисунок 11. Диаграмма дифференциально экспрессированных генов α -адренорецепторов и P2-пуриновых рецепторов (volcano plots) в препаратах САУ по отношению к препаратам левого предсердия. Adra1 – гены, кодирующие различные подтипы α_1 -адренорецепторов, Adra2 – гены, кодирующие различные подтипы α_2 -адренорецепторов, P2rx– гены, кодирующие различные подтипы P2X-пуринорецепторов, P2ry– гены, кодирующие различные подтипы P2Y-пуринорецепторов. 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, в пучке Гиса, который является необходимым элементом проводящей системы сердца, также выявляется флуоресцентный сигнал, соответствующий α_{1A} -АР (Рисунок 13). Аналогично другим структурам проводящей системы сердца, в пучке Гиса обнаруживается как мембранная, так и ядерная популяция α_{1A} -АР ($n = 5$). Для верификации локализации пучка Гиса препараты окрашивали на структурный белок кавеол кардиомиоцитов – кавеолин 3 (Cav3), который преимущественно экспрессируется в рабочем миокарде и почти не выявляется в элементах проводящей системы сердца (Рисунок 14).

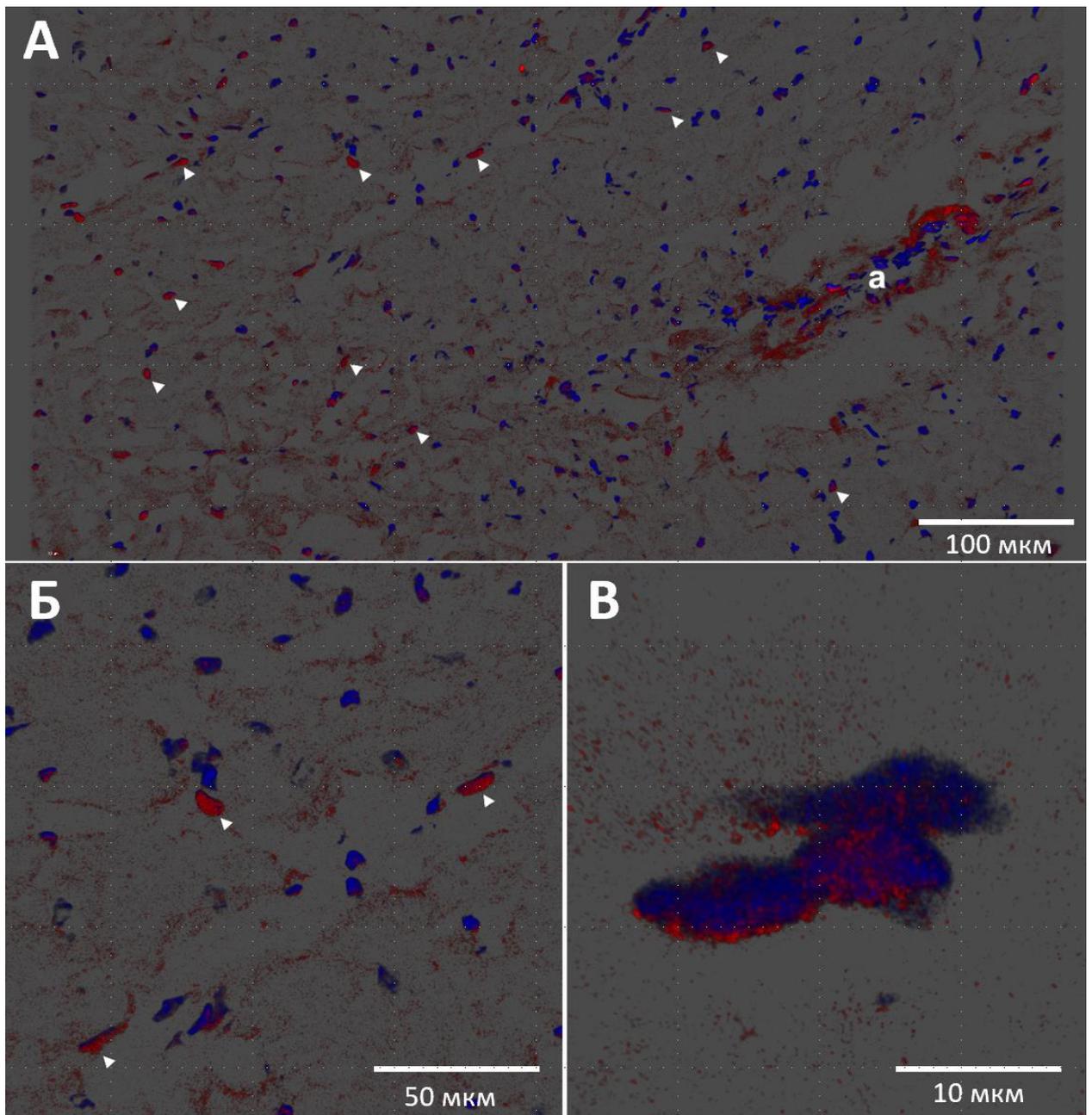


Рисунок 12. А – Репрезентативное конфокальное изображение, демонстрирующее флуоресцентные сигналы (красный псевдоцвет, Су3) антител, специфически связывающих α_{1A} -АР в области атриовентрикулярного узла. Белыми стрелками показаны ядра, окруженные ядерными α_{1A} -АР. Также выявляется интенсивный флуоресцентный сигнал, соответствующий гладкомышечной стенке артерии (а) Б, В – то же, что и на А при большем увеличении. Синий псевдоцвет — клеточные ядра (DAPI).

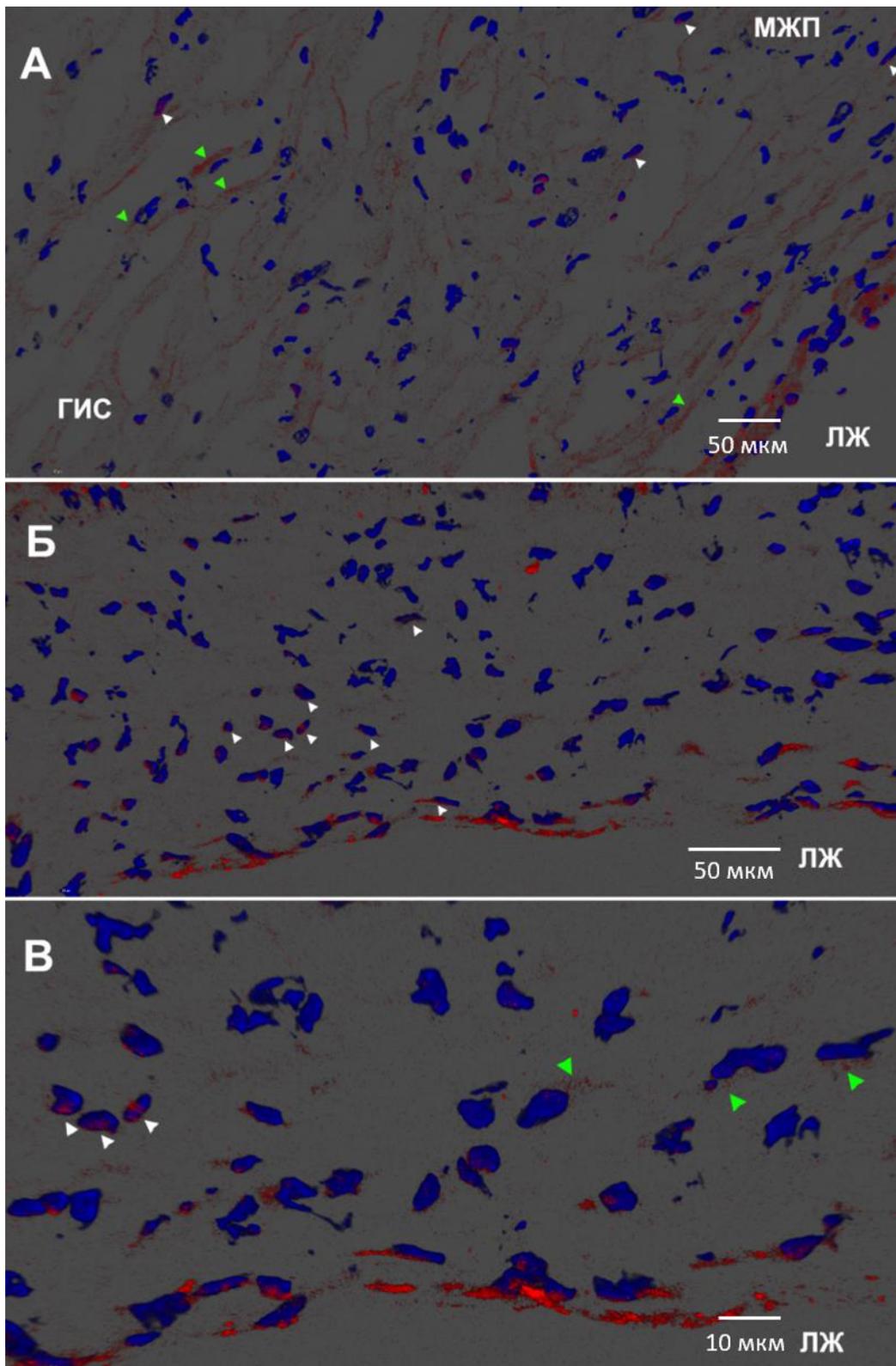


Рисунок 13. А – Репрезентативное конфокальное изображение, демонстрирующее флуоресцентные сигналы (красный псевдоцвет, Су3) антител, специфически связывающих α_{1A} -АР в области пучка Гиса. Б, В – то же при большем увеличении. ГИС – пучок Гиса. ЛЖ – левый желудочек. МЖП – межжелудочковая перегородка. Белыми стрелками показаны ядра, окруженные ядерными α_{1A} -АР. Зелеными стрелками – мембранные α_{1A} -АР. Синий псевдоцвет — клеточные ядра (DAPI).

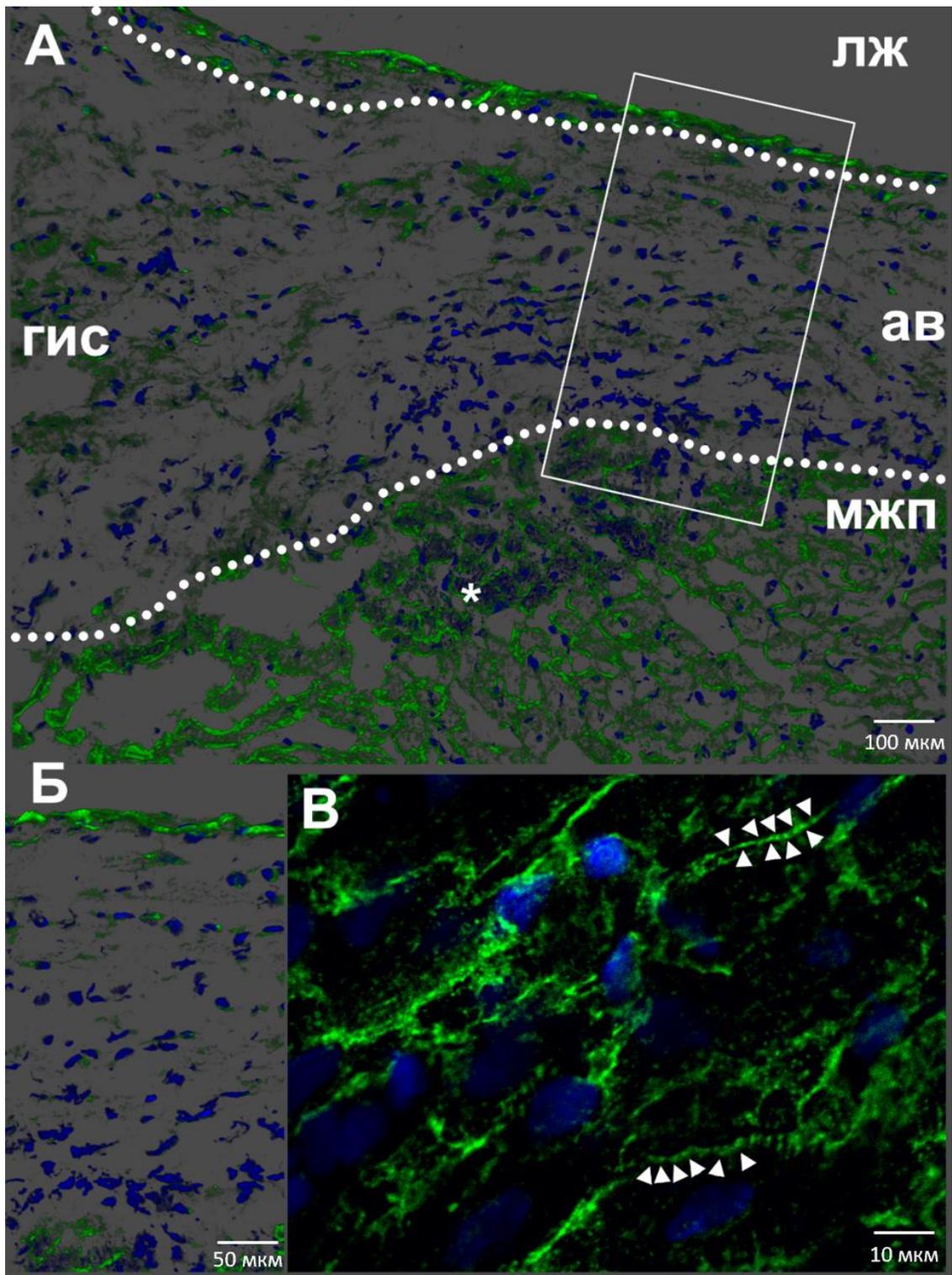


Рисунок 14. А – Репрезентативное конфокальное изображение, демонстрирующее флюоресцентные сигналы (зеленый псевдоцвет) антител, специфически связывающих caveolin 3 (Cav3), являющийся основным маркером рабочего миокарда. Б – участок тканевого препарата, соответствующий локализации пучка Гиса. В – участок рабочего миокарда, для которого характерна экспрессия Cav3. Белыми стрелками показаны caveолы кардиомиоцитов рабочего миокарда. ГИС – пучок Гиса. ав – атриоventрикулярное соединение. ЛЖ – левый желудочек. МЖП – межжелудочковая перегородка. Синий псевдоцвет — клеточные ядра (DAPI).

Согласно данным РНК-секвенирования в АВУ обнаруживаются транскрипты α_{1A} -АР и α_{1B} -АР. Кроме того, уровень мРНК α_{1A} -АР в АВУ выше уровня мРНК α_{1A} -АР в ЛП ($\log_2FC = 0,86$).

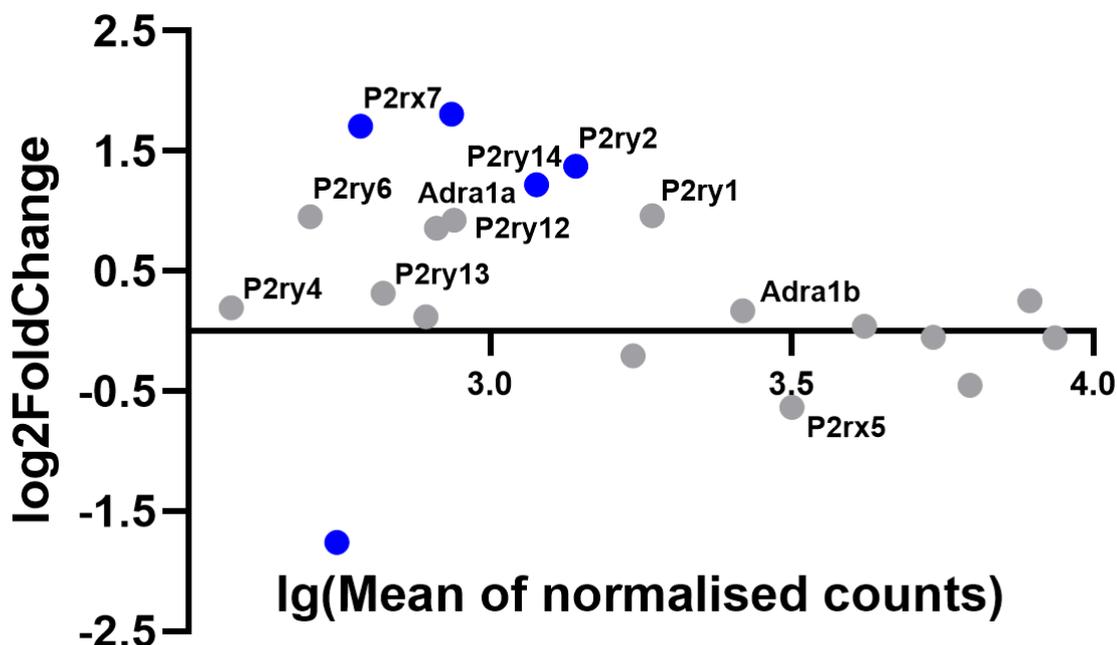


Рисунок 15. Диаграмма дифференциально экспрессированных генов α -адренорецепторов и P2-пуриновых рецепторов (MA plot) в препаратах АВУ по отношению к препаратам левого предсердия в координатах \log_2FC (ось ординат)– $\lg(\text{Mean of normalized counts})$ (ось абсцисс).

4.2. Влияние активации α_1 -адренорецепторов на функционирование САУ и АВУ

4.2.1. Влияние активации α_1 -адренорецепторов на электрофизиологические свойства САУ

Стимуляция α_1 -АР ФЭ приводит к увеличению спонтанной частоты сокращений ИС: при действии ФЭ ЧСС увеличивается ($p < 0.01$) до 5.19 ± 0.85 Гц ($n = 15$) от 4.25 ± 0.52 Гц ($n = 15$) в контроле (Рисунок 16 А, Г).

Повышение частоты стимуляции САУ приводит к увеличению времени восстановления функции синусного узла (ВВФСУ) (Рисунок 7). ФЭ снижает ВВФСУ при межстимульных интервалах 95, 90, 80, 75 и 70 мс (для 90 мс 3.23 ± 0.29 в контроле и 4.33 ± 0.8 при действии ФЭ, $n = 15$, $p < 0.01$, но не при межстимульных интервалах в диапазоне 280–100 мс (Рисунок 16 Б).

При увеличении частоты стимуляции САУ кВВФСУ изменяется сложным образом: в диапазоне межстимульных интервалов от 280 до 200 мс кВВФСУ статистически значимо ($p < 0.01$, $n = 6$) снижается, а в диапазоне межстимульных интервалов от 200 до 80 мс — возрастает ($p < 0.01$, $n = 6$). При межстимульном интервале 150 мс, что соответствует

верхней границе ЧСС у крыс *in vivo*, наблюдается пиковое значение кВВФСУ (110.3 ± 40 мс, $n = 15$). ФЭ вызывает уменьшение кВВФСУ при межстимульных интервалах = 150, 140 и 90 мс ($p < 0.01$, $n = 6$) (Рисунок 16 В).

Величина аккомодации САУ практически линейно уменьшается при снижении межстимульных интервалов: при интервале 280 мс аккомодация составляет $100 \pm 15\%$, а 80 мс — $70 \pm 15\%$ ($n = 15$). В свою очередь, ФЭ снижает зависимость аккомодации САУ от величины межстимульных интервалов, увеличивая аккомодацию до $90 \pm 10\%$ при межстимульном интервале 90 мс ($n = 6$, $p < 0.05$) (Рисунок 16 Д).

Как и в экспериментах с ИС, ФЭ увеличивал частоту СПД в тканевых препаратах САУ (на $26.0 \pm 7.1\%$, $n = 6$, $p < 0.01$) (Рисунок 17 В). При действии ФЭ наблюдается значительное увеличение площади зоны первичной активации в САУ: от 0.15 ± 0.01 мм² в контроле до 0.25 ± 0.01 мм² при действии ФЭ ($p < 0.05$, $n = 6$) (Рисунок 17 Г). Общей тенденцией при действии ФЭ является смещение точки первичной активации из центральной части препаратов САУ в направлении устья верхней полой вены (величина смещения — 2.4 ± 0.1 мм, $n = 6$) (Рисунок 17 А, В, Д). Представленные выше данные изложены в статье [Воронина и др., 2024].

4.2.2. Влияние активации α_1 -адренорецепторов на электрофизиологические свойства АВУ

Длительность антероградной АВЗ сложным образом зависит от межстимульного интервала. В наших экспериментах при спонтанном «синусовом» ритме (210 ± 15 мс), наблюдаемом в ИС, длительность АВЗ составляет 55 ± 8 мс. В условиях навязываемого ритма при межстимульном интервале 180 мс, что эквивалентно ЧСС 330 уд./мин, т.е. ЧСС, наблюдаемой *in vivo* у крыс, лишенных модуляции со стороны вегетативной нервной системы, величина АВЗ составляет 47 ± 8 мс ($n = 20$). При межстимульных интервалах 120 и 110 мс, которые соответствуют максимальной наблюдаемой ЧСС у крыс (500–550 уд./мин), длительность АВЗ увеличивается до 60 ± 7 мс и 65 ± 8 мс соответственно ($n = 20$).

Величина ЭРП АВУ, то есть длительность межстимульного интервала, при котором возбуждение желудочков происходит в ответ лишь на каждый второй внеочередной возбуждающий стимул, в наших экспериментах в контрольных условиях составила 104 ± 11 мс ($n = 20$). Важно отметить, что в контрольных условиях ЭРП и точка Венкебаха совпадают в большей части экспериментов, то есть для АВУ крыс не характерны осцилляции

длительности АВЗ, предшествующие формированию блоков проведения: в контрольных условиях осцилляции длительности АВЗ наблюдаются у 10% препаратов.

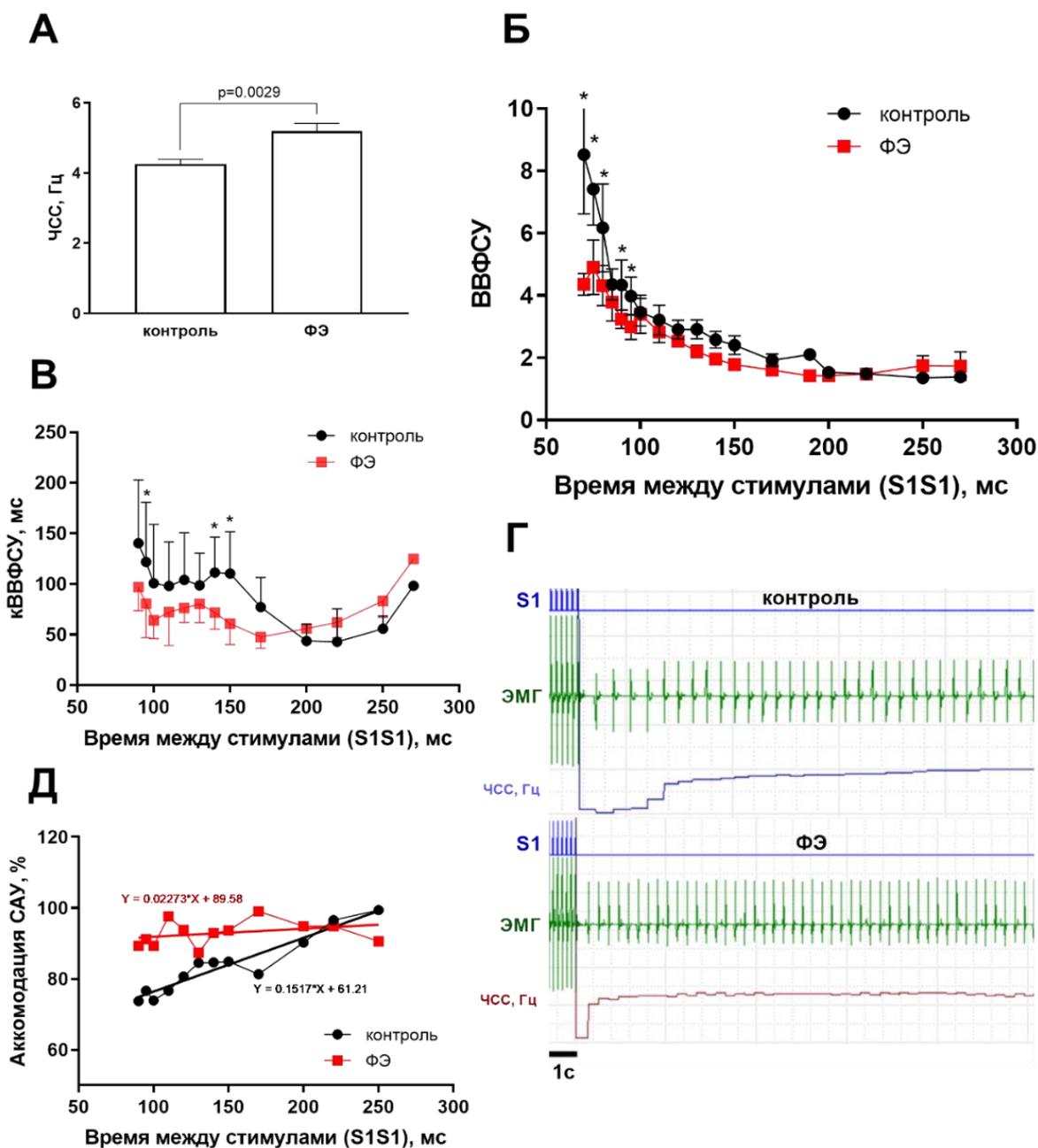


Рисунок 16. Влияние стимуляции α_1 -адренорецепторов на автоматию сердца. А — Увеличение ЧСС ИС крысы при действии фенилэфрина (ФЭ), парный t-критерий Стьюдента. Б — Влияние ФЭ на время восстановления функции синусового узла, двухфакторная ANOVA, апостериорный тест Шидака, * – $p < 0.05$. В — Влияние ФЭ на скорректированное время восстановления функции синусового узла, двухфакторная ANOVA, апостериорный тест Шидака, * – $p < 0.05$. Г — Репрезентативные примеры записей, демонстрирующие восстановление спонтанной активности САУ (после прекращения стимуляции) в контроле и при действии ФЭ. На всех панелях сверху оригинальная запись предсердной электрограммы; снизу — частота спонтанных возбуждений САУ. Д — Влияние ФЭ на скорость аккомодации САУ. Регрессионные уравнения показаны рядом с кривыми.

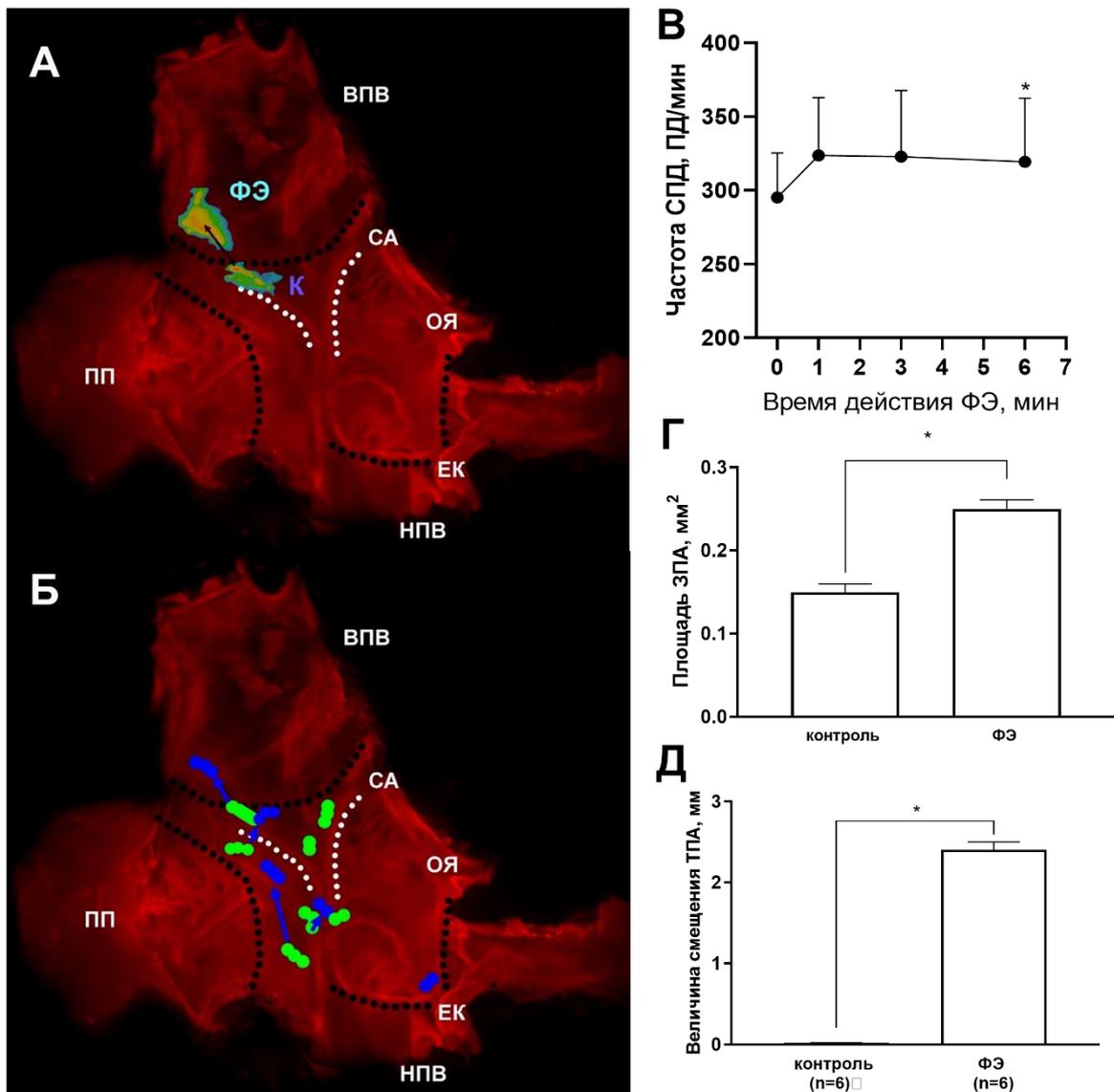


Рисунок 17. Паттерн активации САУ крысы при стимуляции α_1 -адренорецепторов (α_1 -АР). А — Репрезентативные примеры активации САУ в контроле (К) и при действии фенилэфрина (ФЭ). Показана локализация и площадь точки первичной активации (*, ТПА), а также направление смещения ТПА (стрелка) при действии ФЭ. Б — Точки первичной активации САУ в контроле (К, показаны зеленым) и при действии ФЭ (показаны синим). Смещение ТПА в направлении устья верхней полой вены для каждого эксперимента показано стрелкой. В — Увеличение ЧСС в многоклеточном тканевом препарате, включающем область САУ, при действии ФЭ, однофакторная ANOVA, апостериорный тест Тьюки. Г — Увеличение площади зоны первичной активации (ЗПА) в многоклеточном тканевом препарате, включающем область САУ, при действии ФЭ, парный t-критерий Стьюдента. Д — Смещение ТПА 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 – Евстахийев клапан, СА – рудиментарный гребешок синоатриального клапана (показано белым пунктиром); устья полых вен обозначены черным пунктиром. * – $p < 0.05$.

Стимуляция α_1 -АР агонистом ФЭ в диапазоне концентраций 0,1–1 мкМ не приводит к заметным изменениям длительности АВЗ ($p > 0.1$) либо ЭРП АВУ ($p > 0.1$) ($n = 10$). Однако при действии ФЭ в концентрации 10 мкМ наблюдается статистически значимое увеличение длительности АВЗ при всех значениях межстимульных интервалов: при 180 мс увеличение длительности АВЗ составляет $40 \pm 5\%$ (от 47,2 мс до 66,1 мс, $p < 0.001$, $n = 10$) (Рисунок 18 В), при 120 мс увеличение АВЗ, вызванное ФЭ, оказывается более выраженным и составляет $57 \pm 10\%$ (от 51 мс до 79 мс, $p < 0.001$, $n = 10$) (Рисунок 18 Б).

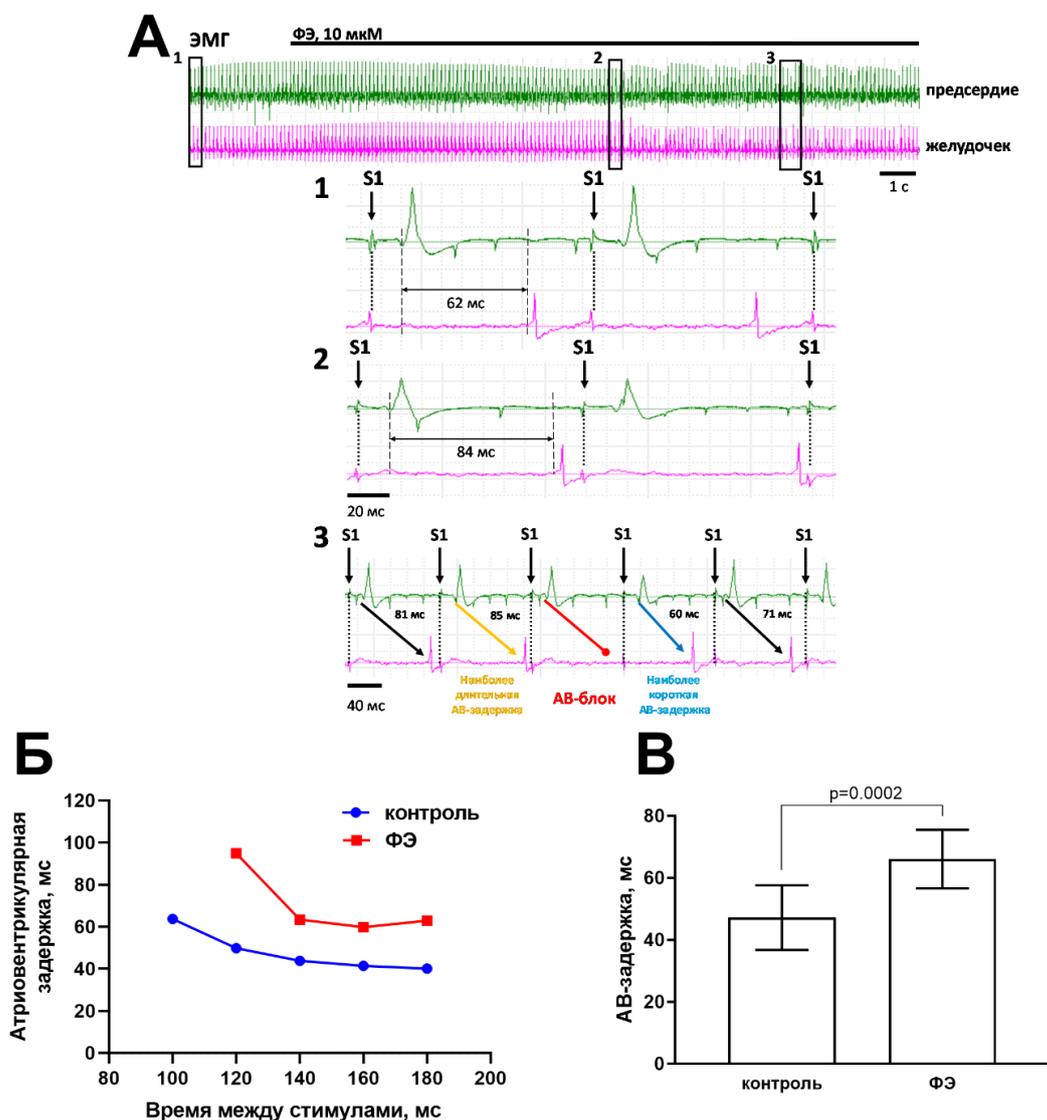


Рисунок 18. Влияние стимуляции α_1 -АР на длительность АВЗ. А – Электрограммы (ЭГ), регистрируемые при действии ФЭ. S1 – моменты нанесения возбуждающих стимулов и артефакты электрической стимуляции. 1 – ЭГ предсердия (П) и желудочка (Ж) в контроле; 2 – ЭГ через 20 с действия ФЭ; 3 – блок в АВУ и альтернации длительности АВЗ. Б – Репрезентативный пример увеличения длительности АВЗ при действии ФЭ при разном межстимульном интервале. В – Увеличение длительности АВЗ при действии ФЭ, парный t-критерий Стьюдента.

ФЭ вызывает увеличение ЭРП на $9,8\% \pm 1,2\%$ ($p < 0.001$, $n = 10$) (Рисунок 19 А, Б). Однако ФЭ не приводит к увеличению значения точки Венкебаха, то есть значения межстимульного интервала, при котором возникает хотя бы единичный блок проведения в АВУ (Рисунок 19 Г). Важно, что при действии ФЭ, в отличие от контрольных экспериментов, во всех случаях наблюдали осцилляции длительности АВЗ при значениях межстимульных интервалов, близких к значению ЭРП в АВУ (Рисунок 18 А). Величина осцилляций АВЗ при действии ФЭ составляла $27 \pm 6\%$ ($n = 10$). Встречаемость блоков проведения в АВУ при действии ФЭ составила $22.5 \pm 7\%$ ($n = 10$). Представленные выше данные изложены в статье [Воронина, Кузьмин, 2023].

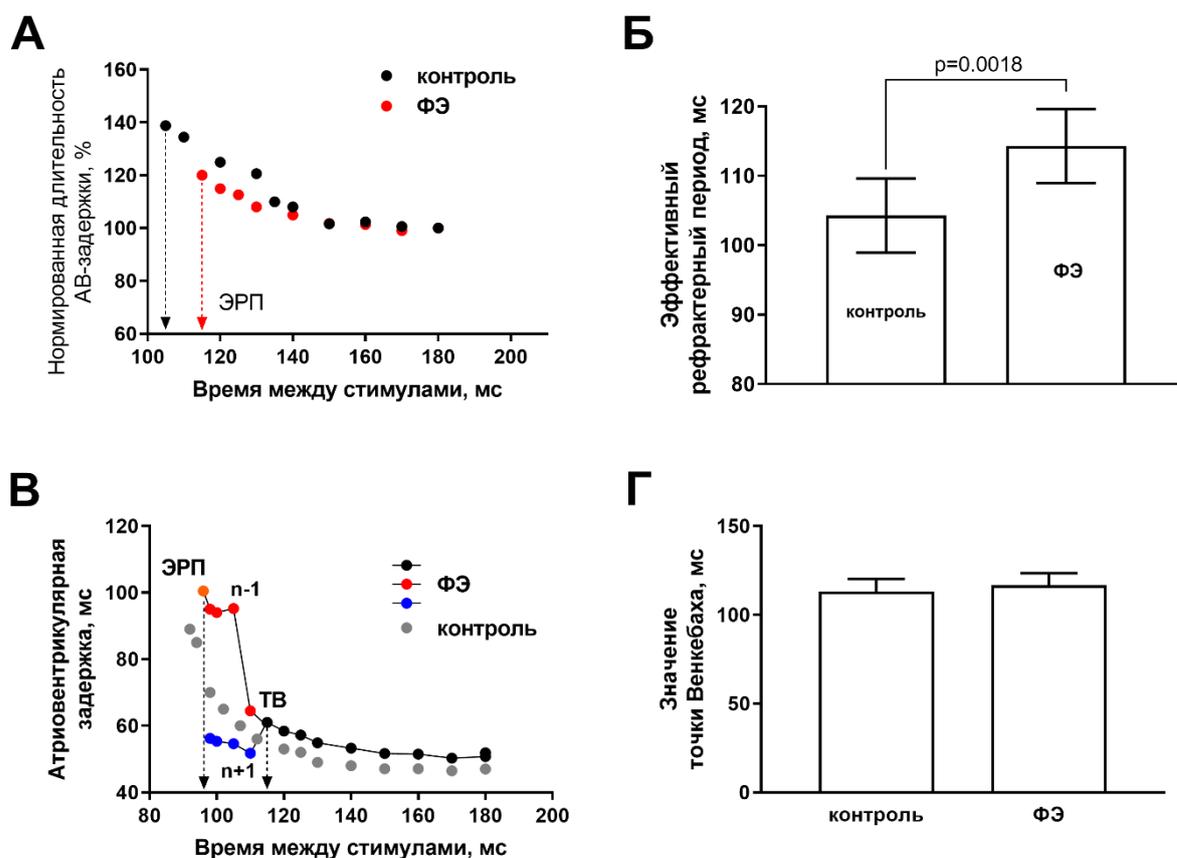


Рисунок 19. Эффекты стимуляции α_1 -АР фенилэфрином (ФЭ) на длительность эффективного рефрактерного периода (ЭРП) и значение точки Венкебаха (ТВ) АВУ при действии ФЭ. А – Репрезентативный пример увеличения длительности ЭРП в контроле и при действии ФЭ. Б – Величина ЭРП АВУ в контроле и при действии ФЭ, парный t-критерий Стьюдента. В – Кривая рефрактерности атриовентрикулярного узла при действии ФЭ. Г – Значение точки Венкебаха в контроле и при действии ФЭ.

4.3. Экспрессия генов, кодирующих пуриновые P2-рецепторов в структурах проводящей системы сердца

4.3.1. Экспрессия генов, кодирующих пуриновые P2-рецепторов в САУ

В САУ широко представлены различные подтипы P2-рецепторов (Рисунок 11). Среди P2X-рецепторов в САУ статистически значимо ($p < 0.05$, $n = 3$) больше транскриптов *P2rx1* ($\log_2FC = 4.1$), *P2rx2* ($\log_2FC = 4.15$), *P2rx6* ($\log_2FC = 2.99$), *P2rx7* ($\log_2FC = 1.82$) по сравнению с ЛП и меньше транскриптов *P2rx5* ($\log_2FC = -0.34$) по сравнению с ЛП ($0.05 < p < 0.2$). Среди P2Y-рецепторов в САУ по сравнению с ЛП преобладает уровень транскриптов ($p < 0.05$) *P2ry1* ($\log_2FC = 0.51$), *P2ry2* ($\log_2FC = 0.95$), *P2ry12* ($\log_2FC = 0.54$), *P2ry14* ($\log_2FC = 0.51$) и *P2ry6* ($\log_2FC = 0.72$, $p = 0.07$).

4.3.2. Экспрессия генов, кодирующих пуриновые P2-рецепторы в АВУ

Большое количество транскриптов P2-рецепторов также обнаруживается и в АВУ (Рисунок 15). В группе P2X-рецепторов в АВУ большое количество транскриптов характерно для рецепторов P2X5 и P2X7, уровень экспрессии генов которых выше в АВУ по сравнению с ЛП ($\log_2FC = 1.71$). Среди P2Y-рецепторов в АВУ значительное количество транскриптов обнаруживается для рецепторов P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y12 и P2Y13. Наибольший уровень экспрессии по сравнению с ЛП наблюдается для гена, кодирующего рецептор P2Y1 ($\log_2FC = 0.96$), P2Y2 ($\log_2FC = 1.37$) и P2Y14 ($\log_2FC = 1.22$).

4.3. Влияние активации пуриновых P2-рецепторов на функционирование САУ и АВУ

4.3.1. Влияние активации пуриновых P2-рецепторов на сердечный ритм *in vivo*

При действии эндогенного агониста P2-рецепторов АТФ у крыс *in vivo* наблюдается статистически значимое снижение ЧСС с 391 ± 29 уд/мин до 97 ± 23 уд/мин ($p < 0.0003$, $n = 6$) (Рисунок 20 А-В). Снижение ЧСС при действии АТФ сохраняется и при индукции ДАБ атропином и атенололом (с 377 ± 41 уд/мин до 136 ± 37 уд/мин, $p < 0.05$, $n = 6$) (Рисунок 20 Г).

Агонист P2Y12 и P2Y13 АДФ и агонист P2Y6-рецепторов УДФ не приводят к статистически значимому изменению ЧСС у крыс *in vivo* ($p < 0.05$, $n = 6$) (Рисунок 20 Б-В).

При действии агониста P2Y2 и P2Y4 рецепторов УМФ происходит небольшое снижение ЧСС: с 391 ± 29 уд/мин до 277 ± 83 уд/мин ($p < 0.02$, $n = 6$) (Рисунок 20 Б-В). 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, $p < 0.0383$, $n = 6$) (Рисунок 20 Б-В).

4.3.2. Влияние активации пуриновых P2-рецепторов на электрофизиологические свойства изолированного сердца

АТФ в ИС также вызывает изменение автоматии САУ. В экспериментах с ИС крысы АТФ приводит к снижению ЧСС (с 298 ± 30 уд/мин до 134 ± 13 уд/мин, $p < 0.05$, $n = 15$) (Рисунок 20 Д).

4.3.3. Влияние активации пуриновых P2-рецепторов на функционирование АВУ у крыс *in vivo*

При действии АТФ у крыс *in vivo* происходит подавление проведения возбуждения в АВУ, что проявляется в возникновении блоков проведения в АВ-соединении (7.2 ± 1.1 блока за 30 с) (Рисунок 21 А, В). Кроме того, АТФ приводит к увеличению длительности PR-интервала как на фоне ДАБ, так и при самостоятельном действии. Введение АТФ приводит к увеличению длительности PR-интервала от 44.6 ± 5.6 мс до 57 ± 5.2 мс при самостоятельном действии ($p = 0.058$, $n = 6$) (Рисунок 21 Б) и от 49.2 ± 5.5 мс до 54.8 ± 6.7 мс при действии на фоне ДАБ ($p = 0.0758$, $n = 6$) (Рисунок 21 Г).

Агонист P2Y1-, P2Y12- и P2Y13-рецепторов АДФ и агонист P2Y6-рецепторов УДФ не приводят к возникновению блоков АВ-проведения (Рисунок 21 А).

УМФ индуцирует АВ-блоки у крыс *in vivo*, однако их количество статистически значительно меньше (2.2 ± 0.3 блока за 30 с) по сравнению с количеством блоков при действии АТФ ($p < 0.05$).

4.3.4. Влияние активации пуриновых P2-рецепторов на функционирование АВУ в изолированном сердце

В экспериментах с изолированным по Лангендорфу сердцем крысы АТФ в концентрациях 10 и 100 мкМ ($n = 6$) не вызывает никаких нарушений атриовентрикулярного проведения ($p < 0.1$). При действии 300 мкМ АТФ индуцирует нестационарное АВ-проведение в виде периодики Венкебаха, но никогда не вызывает полной АВ-блокады (Рисунок 22 В). Этот эффект наблюдали в 7 экспериментах из 11. АТФ в концентрации 300 мкМ вызывает достоверное увеличение времени проведения в АВ-соединении с $41,5 \pm 2,5$ мс до 55 ± 16 мс ($n = 11$) (Рисунок 22 А-Б).

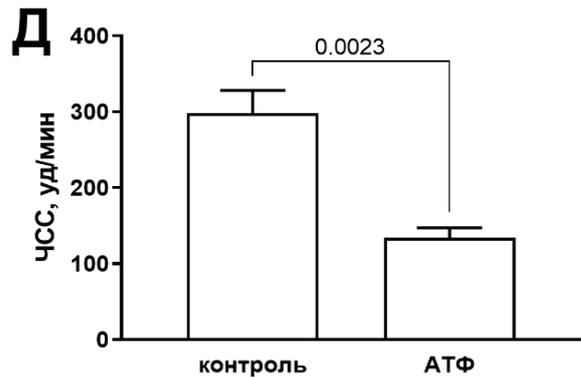
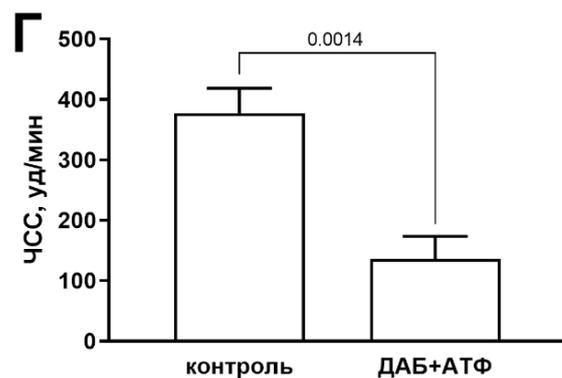
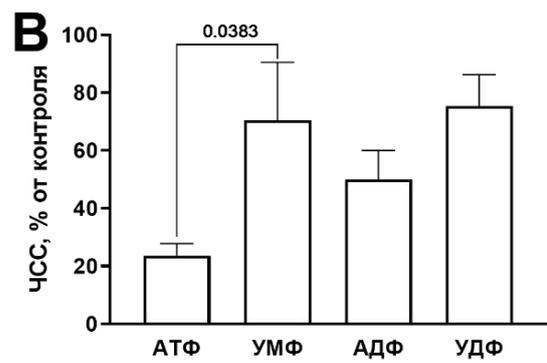
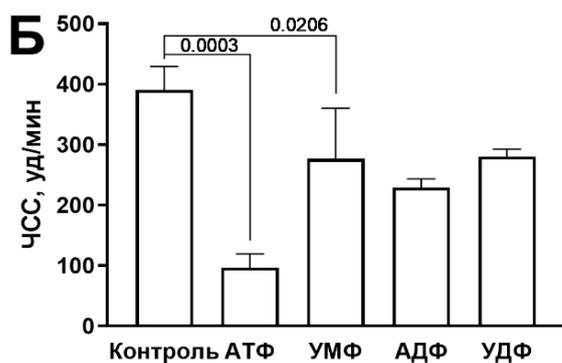
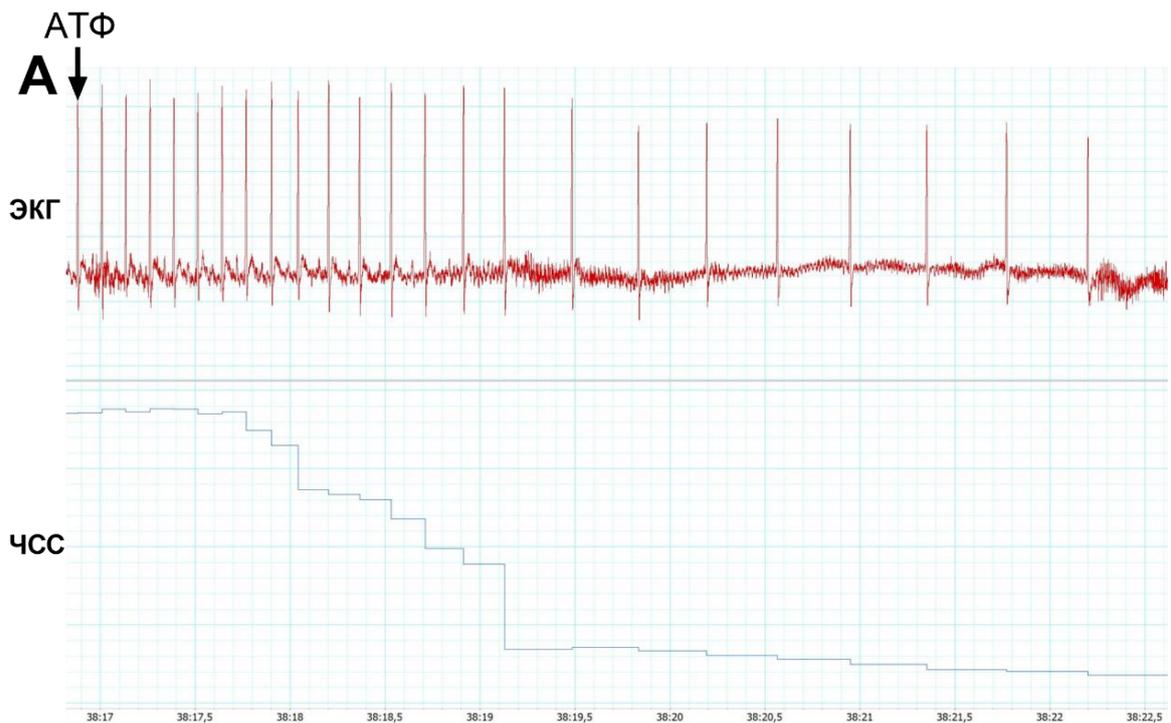


Рисунок 20. Эффект активации пуриновых P2-рецепторов на функции САУ бодрствующей свободноподвижной крысы *in vivo*. А – Репрезентативный пример ЭКГ и изменения ЧСС при действии АТФ. Б – Эффект активации пуриновых рецепторов на ЧСС у крыс *in vivo*. Однофакторная ANOVA, апостериорный тест Тьюки. В – Эффект активации пуриновых рецепторов на ЧСС относительно контроля у крыс *in vivo*. Однофакторная ANOVA, апостериорный тест Тьюки. Г – ЧСС в контроле и при введении АТФ на фоне ДАБ у крыс *in vivo*, парный t-критерий Стьюдента. Д – ЧСС в контроле и при введении АТФ в ИС крыс, парный t-критерий Стьюдента.

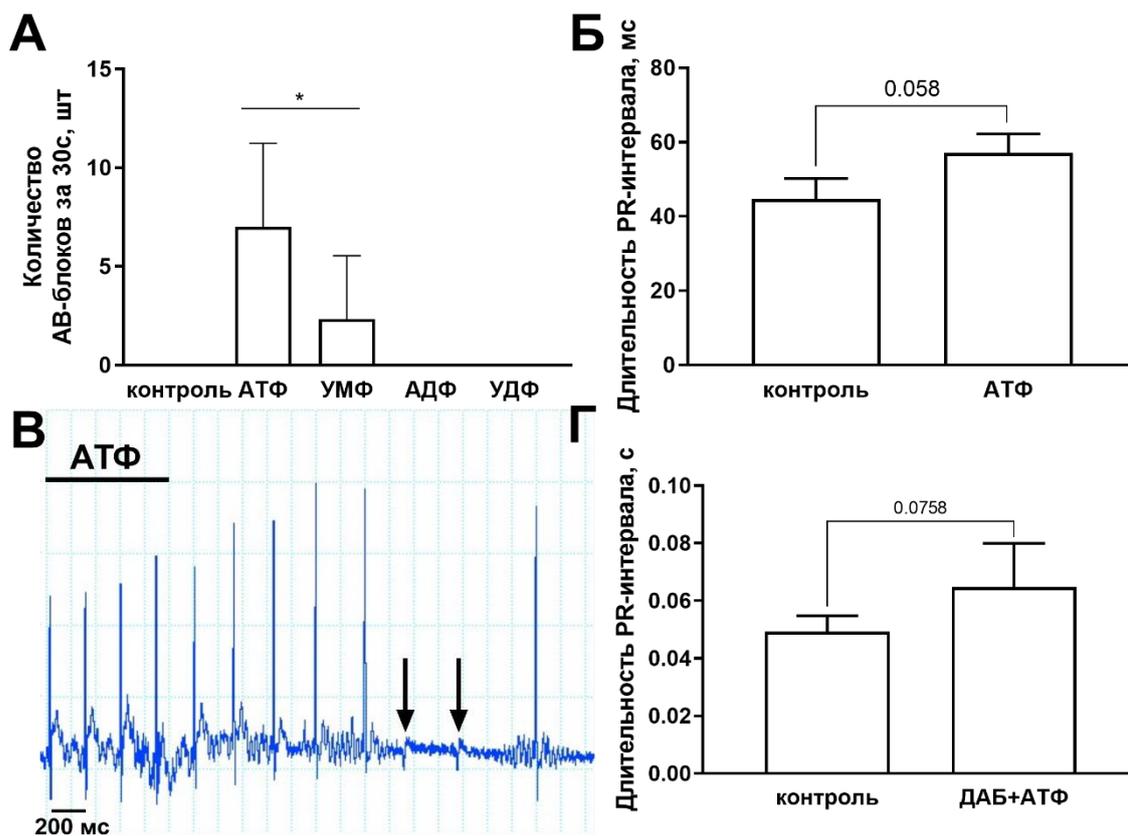


Рисунок 21. Эффекты активации пуриновых рецепторов на функцию АВУ у крыс *in vivo*. А – Количество АВ-блоков за 30 секунд при активации пуриновых рецепторов у крыс *in vivo*, критерий Краскела-Уоллиса, * – отличие от контроля. Б – Длительность PR-интервала в контрольных условиях и при действии АТФ у крыс *in vivo*, парный t-критерий Стьюдента. В – Репрезентативная запись ЭКГ у свободноподвижной бодрствующей крысы *in vivo* при действии АТФ. Черными стрелками показаны Р-зубцы, после которых не возникают QRS-комплексы (АВ-блоки). Г – Длительность PR-интервала в контрольных условиях и при действии АТФ на фоне ДАБ у крыс *in vivo*, парный t-критерий Стьюдента.

4.3.5. Влияние активации пуриновых P2-рецепторов на электрофизиологические свойства АВУ в многоклеточных тканевых препаратах

АТФ подавляет автоматическую активность изолированных тканевых препаратов АВ-соединения крысы. При действии АТФ в концентрациях 100 и 200 мкМ частота СПД, регистрируемых с желудочковой стороны препаратов в участке с наименее негативным ПП, снижается с 2.6 ± 1 Гц в контроле до 1.9 ± 0.4 (на $27 \pm 5\%$) для 100 мкМ ($n = 6$) и от 2.6 ± 0.7 до 1.7 ± 0.3 Гц для 200 мкМ ($n = 6$) (Рисунок 22 Г).

АТФ также вызывает выраженное изменение конфигурации ПД в АВ-соединении (Рисунок 22 Д). При действии АТФ наблюдается сильная гиперполяризация в АВ-соединении (с -50 ± 3 до -70 ± 5 мВ). Кроме того, сильно снижается как ДПД₉₀ (с 122 ± 24 до 46 ± 13 мс), так и ДПД₅₀ (с 80 ± 12 до 21 ± 9 мс).

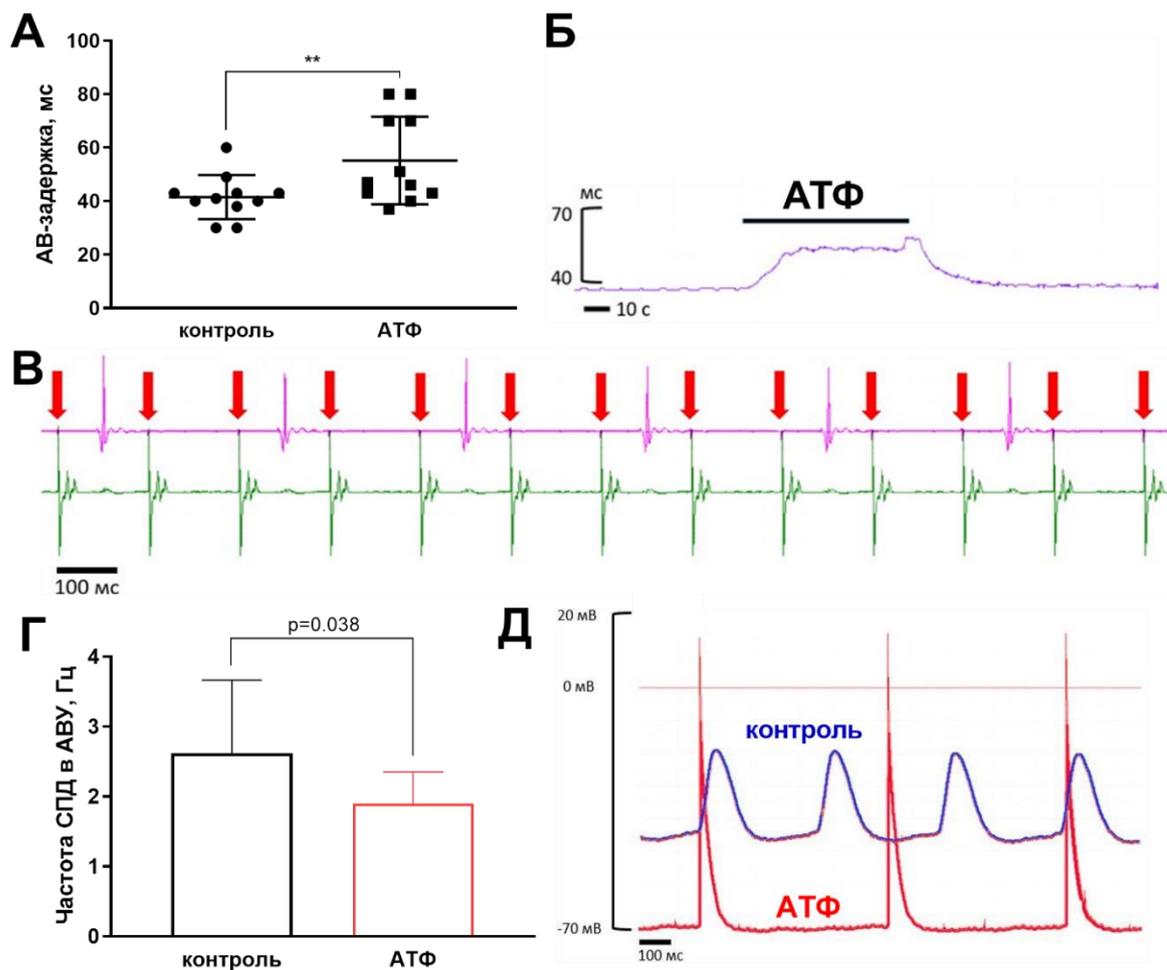


Рисунок 22. А - Эффект АТФ на длительность времени проведения в АВ-соединении в ИС крысы, парный t-критерий Стьюдента. Б – Репрезентативный пример записи, отражающий изменение длительности проведения в АВ-соединении при действии 300 мкМ АТФ, В – Репрезентативная запись электрической активности предсердия (зеленый цвет) и желудочка (розовый цвет). На каждое возбуждение желудочков приходится два возбуждения предсердий (красная стрелка), что говорит о блоке АВ-проведения. Г – Эффект АТФ на частоту генерации импульсов в многоклеточном препарате АВ-соединения в контроле, парный t-критерий Стьюдента. Д – Репрезентативные примеры ПД в АВ-соединении крысы в контроле (синий цвет) и при действии АТФ (красный цвет). * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

4.4. Механизмы, обуславливающие наблюдаемые эффекты активации α_1 -адренорецепторов в проводящей системе сердца

4.4.1. Влияние блокады протеинкиназы С на эффекты активации α_1 -адренорецепторов САУ в изолированном сердце

Блокатор протеинкиназы С ВІМ не оказывает статистически значимого влияния на увеличение ЧСС ИС, вызванное ФЭ: ЧСС при действии ФЭ, а также ФЭ на фоне ВІМ составляла 5.19 ± 0.85 и 4.86 ± 0.21 Гц, соответственно ($p > 0.05$, $n = 6$) (Рисунок 23 А).

Блокада РКС не приводит к восстановлению сниженных ФЭ значений ВВФСУ и кВВФСУ в диапазоне межстимульных интервалов 280-80 мс (Рисунок 23 Б). Кроме того, ВІМ не оказывает влияния на аккомодацию САУ. При восстановлении спонтанной активности после стимуляции с интервалами 90 мс аккомодация при действии ФЭ составляет $90 \pm 8\%$ ($n = 6$), а при действии ФЭ на фоне ВІМ – $90 \pm 8\%$ ($n = 6$, $p > 0.1$).

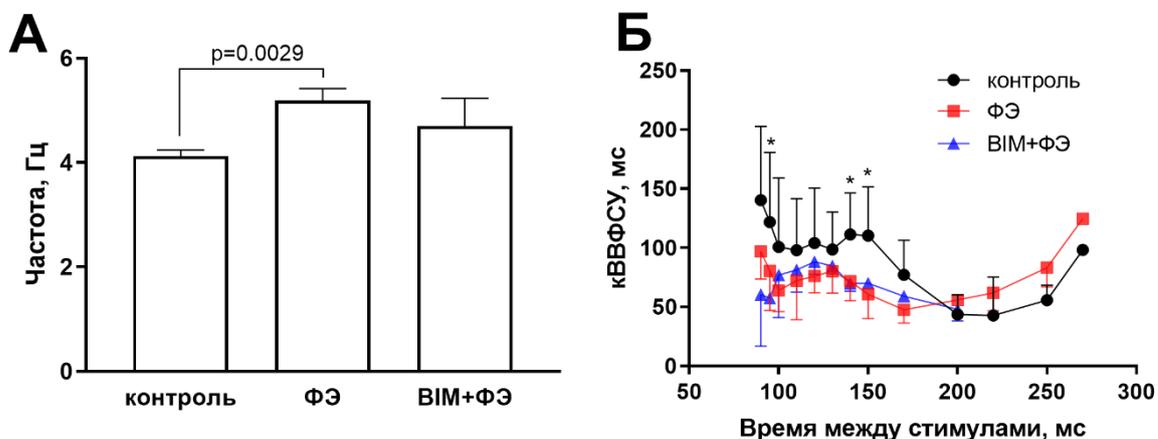


Рисунок 23. Влияние блокатора протеинкиназы С на эффекты ФЭ в САУ ИС крысы. А – Эффект ФЭ на фоне блокады РКС в сравнении с контролем и действием ФЭ на ЧСС в ИС крысы. Однофакторная ANOVA, апостериорный тест Тьюки. Б – Эффект ФЭ на фоне блокады РКС в сравнении с контролем и действием ФЭ на скорректированное время восстановления функции синусового узла (кВВФСУ) у крыс *in vivo*, двухфакторная ANOVA, апостериорный тест Шидака, * – $p < 0.05$, отличие от контроля.

4.4.2. Влияние блокады протеинкиназы С на эффекты активации α_1 -адренорецепторов в тканевых препаратах САУ

При действии ВІМ на фоне ФЭ в многоклеточных тканевых препаратах САУ наблюдается такое же увеличение частоты СПД (на $27.2 \pm 8.1\%$, $p > 0.1$, $n = 5$) как и при самостоятельном действии ФЭ. ФЭ на фоне ВІМ приводит к миграции первичной точки активации в ту же область, что и при самостоятельном действии ФЭ. Общей тенденцией при действии ФЭ на фоне ВІМ, как и при самостоятельном действии ФЭ, является смещение ТПА из центральной части препаратов САУ в направлении устья верхней полой вены (величина смещения — от $0.02 \pm 0.001 \text{ мм}^2$ в контроле до $2.1 \pm 0.1 \text{ мм}^2$ ($p < 0.05$, $n = 6$) (Рисунок 24 А-Б). ВІМ при самостоятельном действии не приводит к снижению площади зоны первичной активации, однако при действии ФЭ на фоне ВІМ наблюдается статистически значимое снижение площади зоны первичной активации по сравнению с самостоятельным действием ФЭ: от $0.25 \pm 0.01 \text{ мм}^2$ при действии ФЭ до $0.08 \pm 0.03 \text{ мм}^2$ при действии ФЭ на фоне ВІМ ($p < 0.05$, $n = 6$) (Рисунок 24 В).

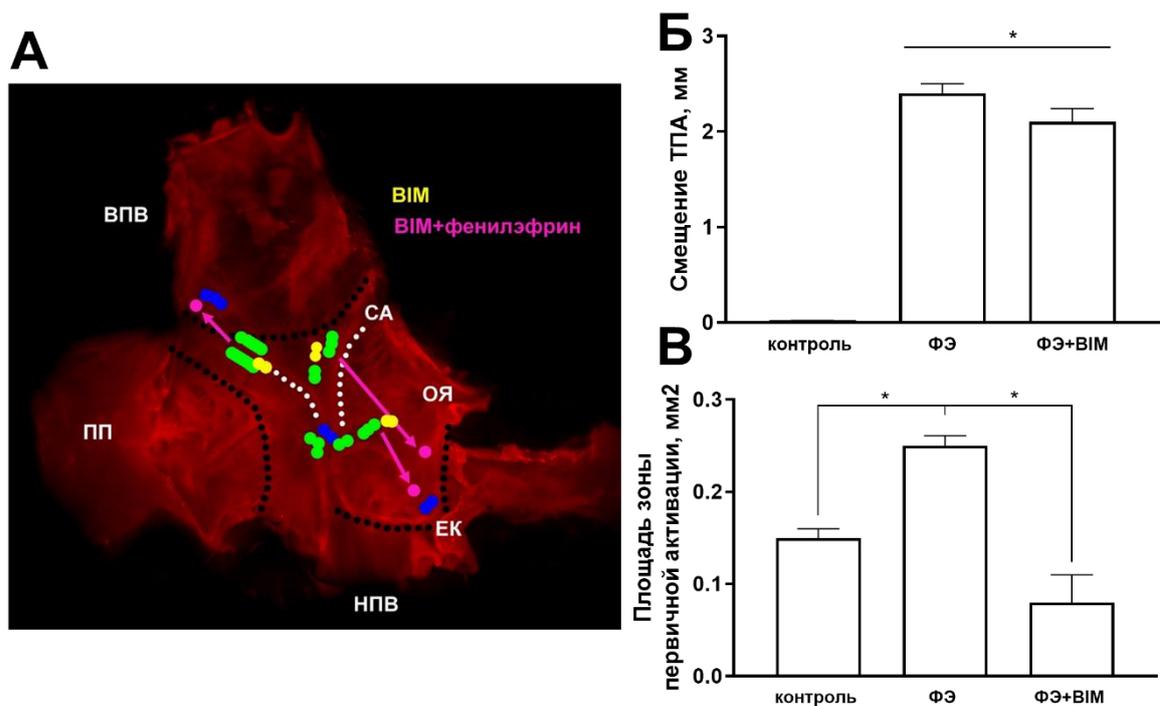


Рисунок 24. Влияние ингибитора протеинкиназы С на эффекты ФЭ на паттерн активации САУ крысы. А – Точки первичной активации САУ в контроле (при действии ингибитора РКС ВМ, показаны желтым) и при действии ФЭ на фоне действия ингибитора РКС ВМ (показаны фиолетовым). Зеленым цветом показаны точки первичной активации в контроле, синим цветом точки первичной активации при действии ФЭ. Смещение ТПА для каждого эксперимента показано стрелкой. Б – Увеличение смещения ТПА при действии ФЭ и при действии ФЭ на фоне ВМ в отличие от контроля. В – Уменьшение площади зоны первичной активации при действии ФЭ на фоне ВМ по сравнению с самостоятельным эффектом ФЭ. Однофакторная ANOVA, апостериорный тест Тьюки, * – $p < 0.05$. ВПВ – верхняя полая вена, ПП – ушко правого предсердия и пограничный гребешок (отграничено черным пунктиром), НПВ – нижняя полая вена, ОЯ – овальная ямка, ЕК – Евстахийев клапан, СА – рудиментарный гребешок синоатриального клапана (показано белым пунктиром).

4.4.3. Эффекты блокады хлорной проводимости различных типов на автоматию САУ в изолированном сердце

Блокада хлорных каналов ингибитором DCPiB (преимущественно блокирует хлорные каналы, чувствительные к изменению клеточного объема – LRRC8A) приводит к снижению спонтанного ритма ИС с 5.4 ± 0.52 до 3.6 ± 0.85 Гц ($n = 6$), эффект наиболее выражен при длительности межстимульного интервала 100 мс ($p < 0.05$) (Рисунок 25 В). Увеличение частоты стимуляции САУ приводит к росту времени возникновения первого спонтанного возбуждения в САУ, то есть ВВФСУ (Рисунок 25 А). DCPiB статистически значимо увеличивает ВВФСУ в диапазоне межстимульных интервалов от 100 до 80 мс (для 80 мс 2.81 ± 0.3 в контроле и 5.89 ± 0.6 при действии DCPiB, $p < 0.05$, $n = 6$). Кроме того, в диапазоне межстимульных интервалов от 100 до 85 мс также происходит увеличение и

кВВФСУ (для интервала 100 мс 137.6 ± 12 мс в контроле и 252.2 ± 141 при действии ДСРІВ, $n = 6$) (Рисунок 25 В). Величина аккомодации САУ при действии ДСРІВ не отличается от таковой, наблюдаемой в контрольных условиях ($p > 0.05$, $n = 6$) (Рисунок 25 Г).

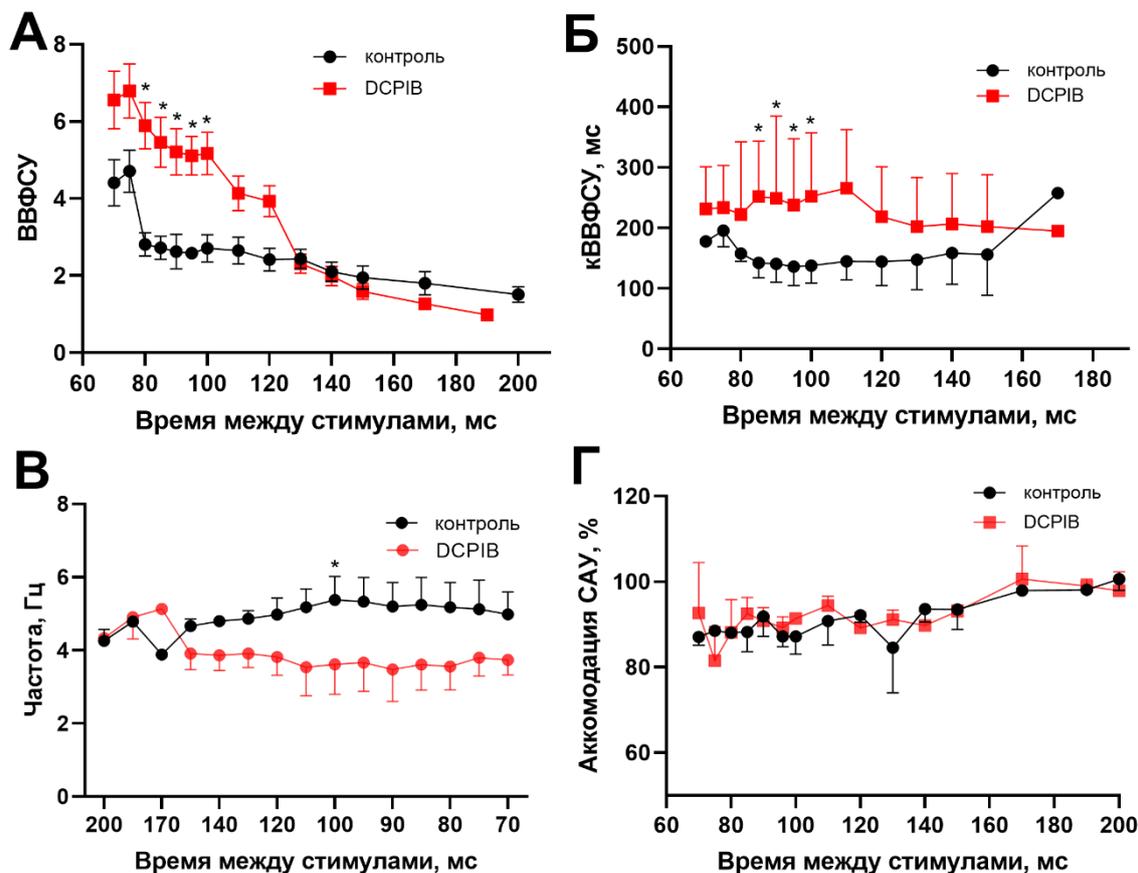


Рисунок 25. Влияние блокатора хлорных каналов ДСРІВ на автоматию сердца. А – Влияние ДСРІВ на время восстановления функции синусного узла (ВВФСУ) ИС крысы. Б – Влияние ДСРІВ на скорректированное ВВФСУ ИС крысы. В – Снижение частоты сокращений изолированного сердца крысы при действии ДСРІВ. Г – Влияние ДСРІВ на аккомодацию САУ. Двухфакторная ANOVA, апостериорный тест Шидака, * – $p < 0.05$.

При действии хлорного блокатора NPPB (преимущественно блокирует кальций-чувствительных хлорные каналы TMEM16A) также наблюдается снижение частоты работы ИС. Эффект наиболее выражен при межстимульных интервалах 85-70 мс: ЧСС ИС в контроле 5.9 ± 0.3 Гц при межстимульном интервале 70 мс, а при действии NPPB – 3.05 ± 0.9 Гц ($p < 0.05$, $n = 6$) (Рисунок 26 В). Кроме того, NPPB также вызывает увеличение ВВФСУ, статистически значимое при межстимульном интервале 150 мс с 1.9 ± 0.15 до 7.3 ± 3.5 ($p < 0.05$, $n = 6$) (Рисунок 26 А, Д). Также наблюдается увеличение кВВФСУ (при межстимульных интервалах 140, 130 и 95 мс, $n = 6$, $p < 0.05$) с 174 ± 70 мс, 176 ± 65 мс и 246 ± 30 мс до 346 ± 50 мс, 514 ± 77 мс и 721 ± 80 мс соответственно (Рисунок 26 Б).

Величина аккомодации САУ при действии DCPiB не отличается от контроля ($p > 0.05$, $n = 6$) (Рисунок 26 Г).

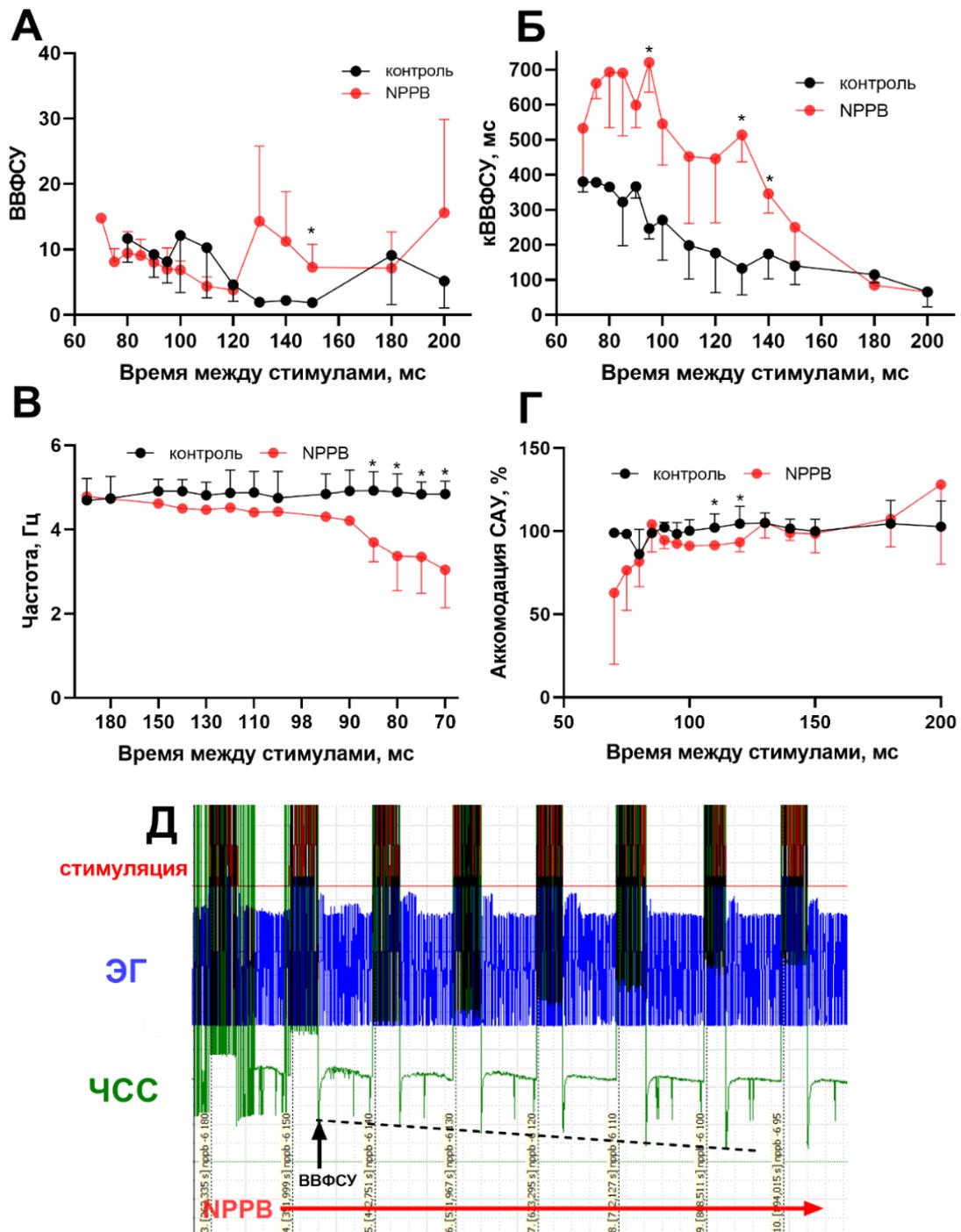


Рисунок 26. Влияние блокатора хлорных каналов NPPB на автоматию сердца. А – Влияние NPPB на время восстановления функции синусового узла (ВВФСУ) ИС крысы. Б – Влияние NPPB на скорректированное ВВФСУ (кВВФСУ) ИС крысы. В – Снижение частоты сокращений ИС крысы при действии NPPB. Г – Влияние NPPB на аккомодацию САУ. Двухфакторная ANOVA, апостериорный тест Шидака, * – $p < 0.05$. Д – Репрезентативный пример записи электрограммы (ЭГ) предсердия и изменения частоты сокращений ИС крысы при действии NPPB.

Блокатор хлорной проводимости 9-АС приводит к снижению частоты сокращений ИС. Эффект наиболее выражен в диапазоне межстимульных интервалов 95-70 мс (Рисунок 27 В). При межстимульном интервале 85 мс наблюдается уменьшение частоты работы ИС с 5.05 ± 0.3 Гц до 4.04 ± 0.4 Гц ($n = 6$, $p < 0.05$). В этом же диапазоне межстимульных интервалов происходит увеличение кВВФСУ, при межстимульном интервале 85 мс кВВФСУ увеличивается с 49.6 ± 19 мс до 562.53 ± 168 мс ($n = 6$, $p < 0.05$) (Рисунок 25 Б). 9-АС не оказывает значимого влияния на ВВФСУ ($n = 6$). Величина аккомодации САУ при действии 9-АС также не отличается от контроля ($p > 0.05$, $n = 6$) (Рисунок 25 Г).

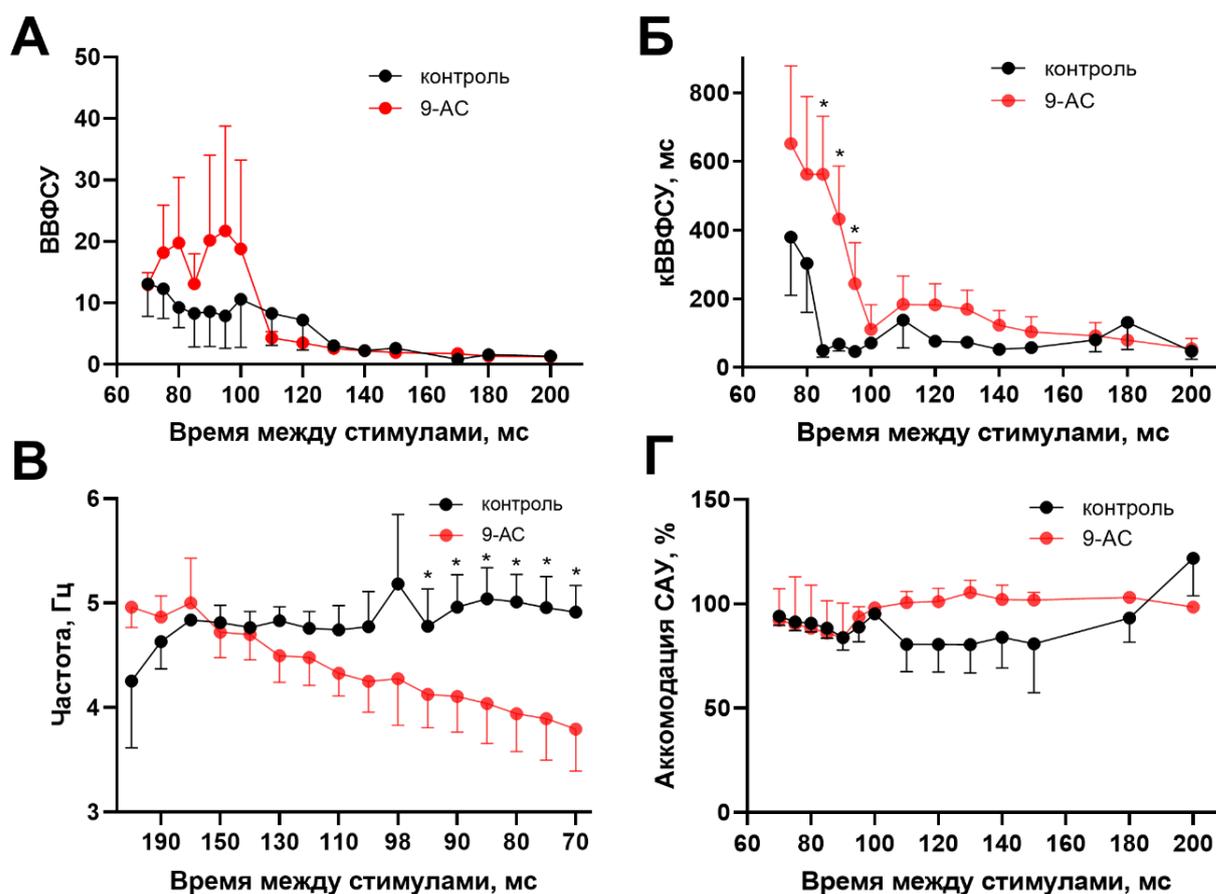


Рисунок 27. Влияние блокатора хлорных каналов 9-АС на автоматию сердца. А – Влияние 9-АС на время восстановления функции синусного узла (ВВФСУ) ИС крысы. Б – Влияние 9-АС на скорректированное ВВФСУ (кВВФСУ) ИС крысы. В – Снижение частоты сокращений ИС крысы при действии 9-АС. Г – Влияние 9-АС на аккомодацию САУ. Двухфакторная ANOVA, апостериорный тест Шидака, * – $p < 0.05$.

Селективный блокатор кальций-чувствительных хлорных каналов MONNA также вызывает значимое снижение частоты сокращений ИС: с 5.17 ± 0.5 Гц до 4.05 ± 0.1 Гц ($n = 3$, $p < 0.01$) (Рисунок 28 Б). Кроме того происходит значительное увеличение ВВФСУ при

межстимульных интервалах 95-70 мс (Рисунок 28 А). При межстимульном интервале 90 мс ВВФСУ увеличивается с 3.58 ± 0.5 до 14.7 ± 1.1 ($n = 3$, $p > 0.05$).

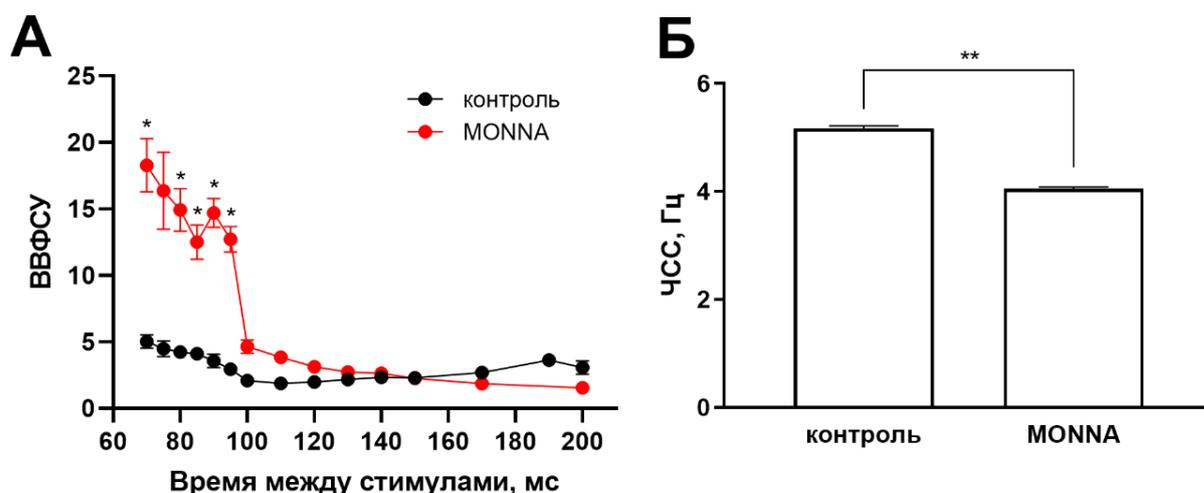


Рисунок 28. Влияние блокатора хлорных каналов MONNA на автоматию сердца. А – Влияние MONNA на время восстановления функции синусного узла (ВВФСУ) ИС крысы. Двухфакторная ANOVA, апостериорный тест Шидака, * – $p < 0.05$. Б – Снижение частоты сокращений ИС при действии MONNA. Парный t-критерий Стьюдента, ** – $p < 0.01$.

4.4.4. Эффекты блокады хлорной проводимости различных типов на паттерн активации САУ в многоклеточных тканевых препаратах

Блокатор хлорных каналов NPPB приводит к снижению частоты СПД в многоклеточных тканевых препаратах САУ (на $11 \pm 1\%$, $p < 0.05$, $n = 5$) (Рисунок 29 Б). При действии NPPB наблюдается значительное снижение площади зоны первичной активации (Рисунок 29 В): от $0.15 \pm 0.01 \text{ мм}^2$ в контроле до $0.04 \pm 0.001 \text{ мм}^2$ 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 (величина смещения – $0.8 \pm 0.1 \text{ мм}$, $p < 0.001$, $n = 5$) в сторону пограничного гребешка (Рисунок 29 Г) и формирование зоны невозбудимости в той области, где в контрольных условиях располагается точка первичной активации (Рисунок 29 А).

При действии других блокаторов хлорной проводимости (DCPIВ, 9-АС, MONNA) в экспериментах с многоклеточными тканевыми препаратами, включающими область САУ ($n = 3$), также наблюдается изменение паттерна активации САУ, происходит снижение частоты СПД, смещение точки первичной активации и уменьшение площади зоны первичной активации (Рисунок 30 А-Г).

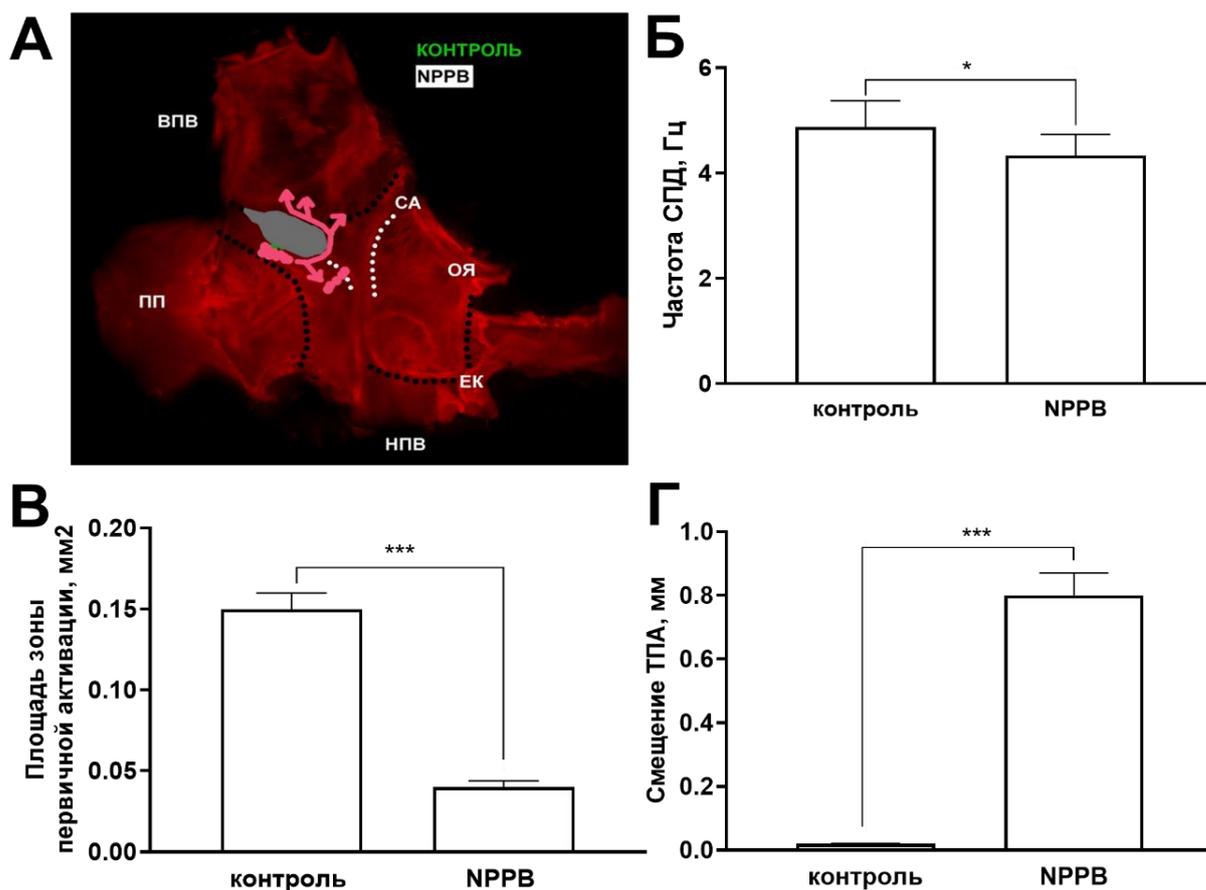


Рисунок 29. Паттерн активации САУ крысы при действии блокатора хлорных каналов NPPB. А – Репрезентативные примеры активации САУ при действии NPPB. Серым цветом показана электрически невозбудимая зона, формируемая при действии NPPB. Розовым цветом показано смещение точек первичной активации САУ и формирование циркуляции возбуждения по типу re-entry при действии NPPB. Б – Увеличение частоты спонтанных потенциалов действия (СПД) в многоклеточном тканевом препарате, включающем область САУ, при действии NPPB. В – Уменьшение площади зоны первичной активации в многоклеточном тканевом препарате, включающем область САУ, при действии NPPB. Г – Смещение ТПА в многоклеточном тканевом препарате, включающем область САУ, при действии NPPB. Парный t-критерий Стьюдента, * – $p < 0.05$, *** – $p < 0.01$.

4.4.4. Эффекты блокады хлорной проводимости различных типов на функционирование АВУ в изолированном сердце

При действии блокатора хлорной проводимости DCPiB в ИС крысы наблюдается увеличение ЭРП в АВУ. Статистически значимых отличий в длительности АВЗ при разных межстимульных интервалах выявлено не было ($n = 6$, $p > 0.05$) (Рисунок 31 А). Однако при действии DCPiB и значениях межстимульного интервала 150 и 140 мс происходит статистически значимое 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, $p < 0.05$) (Рисунок 31 Б). Кроме того, DCPiB приводит к

статистически значимому увеличению ΔAV с $17 \pm 6.13\%$ до $36.7 \pm 14.7\%$, ($n = 6$, $p < 0.01$) (Рисунок 31 Г). В то же время, DCPiB не оказывает статистически значимого влияния на значение точки Венкебаха ($n = 6$, $p > 0.05$) (Рисунок 31 В).

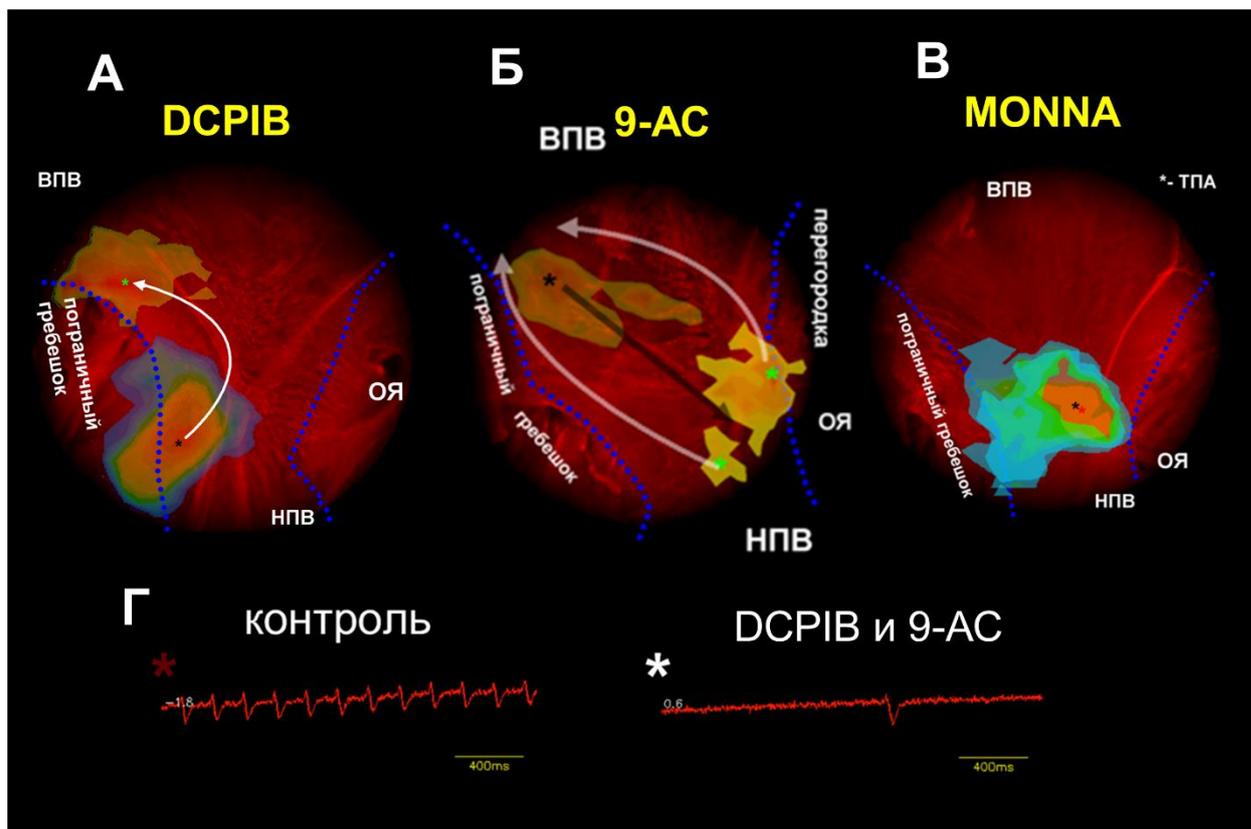


Рисунок 30. Паттерн активации САУ крысы при действии различных блокаторов хлорных каналов. А – Репрезентативный пример смещения точки первичной активации и уменьшения зоны первичной активации при действии блокатора DCPiB. Б – Репрезентативный пример смещения точки первичной активации при действии блокатора DCPiB. В – Репрезентативный пример смещения точки первичной активации и уменьшения зоны первичной активации при действии блокатора MONNA. Г – Репрезентативный пример снижения частоты спонтанных ПД при действии хлорных блокаторов.

При действии блокатора хлорной проводимости NPPВ в ИЗ крысы также наблюдается увеличение ЭРП АВУ и отсутствие статистически значимых отличий в длительности АВЗ ($n = 3$) при разных межстимульных интервалах (Рисунок 32 А). Кроме того, NPPВ не оказывает влияния на долю кардиоциклов с блоками проведения в АВ-соединении от общего количества кардиоциклов и значение точки Венкебаха ($n = 3$, $p > 0.05$) (Рисунок 32 Б-В).

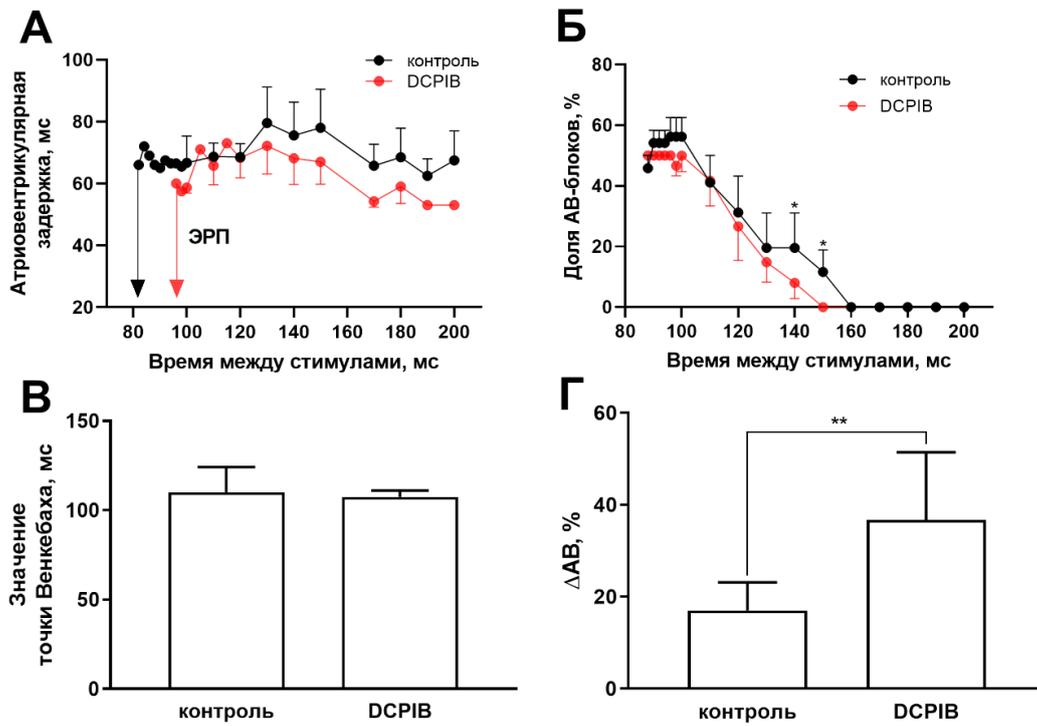


Рисунок 31. Влияние хлорного блокатора DCPiB на функцию АВУ в ИС крысы. А – Эффект DCPiB на длительность атриовентрикулярной задержки, стрелкой показано значение ЭРП в контроле (черный) и при действии DCPiB (красный). Б – Снижение доли АВ-блоков от суммарного числа кардиоциклов при действии DCPiB. В – Значение точки Венкебаха в контроле и при действии DCPiB. Г – Влияние DCPiB на ΔAV (величина осцилляций АВЗ). Парный t-критерий Стьюдента, ** – $p < 0.01$.

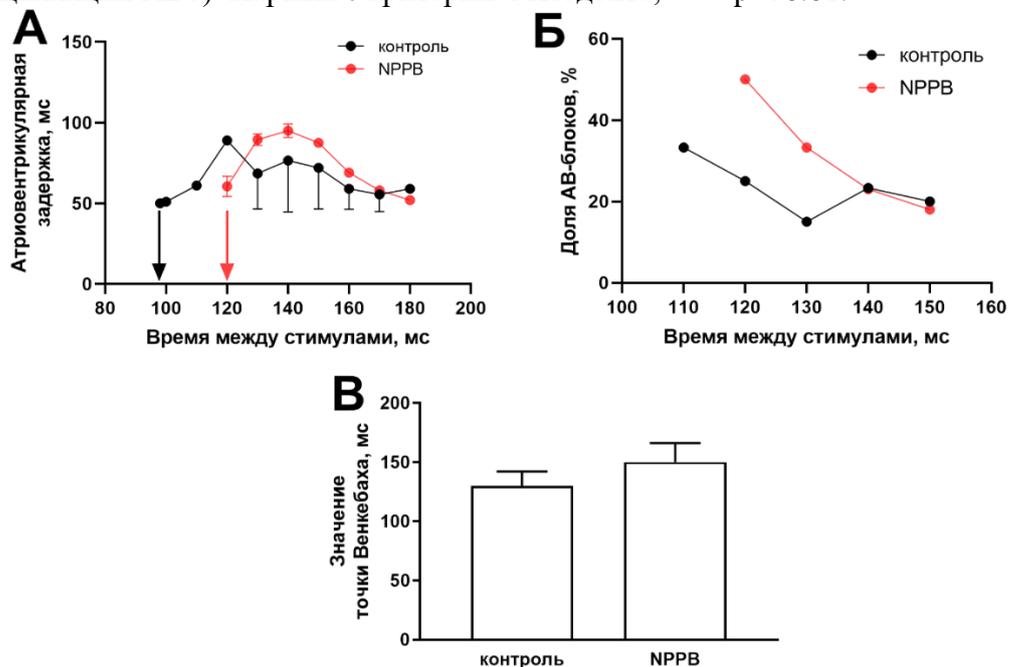


Рисунок 32. Влияние хлорного блокатора NPPV на функцию АВУ в ИС крысы. А – Эффект NPPV на длительность атриовентрикулярной задержки. Стрелками показано значение ЭРП для контроля (черный цвет) и при действии NPPV (красный цвет). Б – Изменение доли АВ-блоков от суммарного числа кардиоциклов при действии NPPV. В – Значение точки Венкебаха в контроле и при действии NPPV.

Блокатор хлорной проводимости 9-АС приводит к увеличению ЭРП АВУ и снижению задержки проведения возбуждения в АВ-соединении (Рисунок 33 А) при длительности межстимульного интервала 160 мс (с 51.8 ± 11.2 мс до 44.67 ± 13.6 мс, $n = 6$, $p < 0.05$). Кроме того, 9-АС приводит к статистически значимому снижению доли блоков АВ-проведения (Рисунок 33 Б) от общего количества кардиоциклов по сравнению с контролем при длительности межстимульных интервалов в диапазоне от 150 до 120 мс (с $11.1 \pm 18\%$, $11.1 \pm 18\%$, $16.6 \pm 27\%$ и $16.6 \pm 27\%$ соответственно до 0% , $n = 6$, $p < 0.05$). 9-АС также приводит к статистически значимому увеличению значения точки Венкебаха (с 105.5 ± 12.1 мс до 125.5 ± 30 мс) и осцилляций в АВУ (с $16 \pm 5\%$ до $20 \pm 6\%$) (Рисунок 33 В-Г).

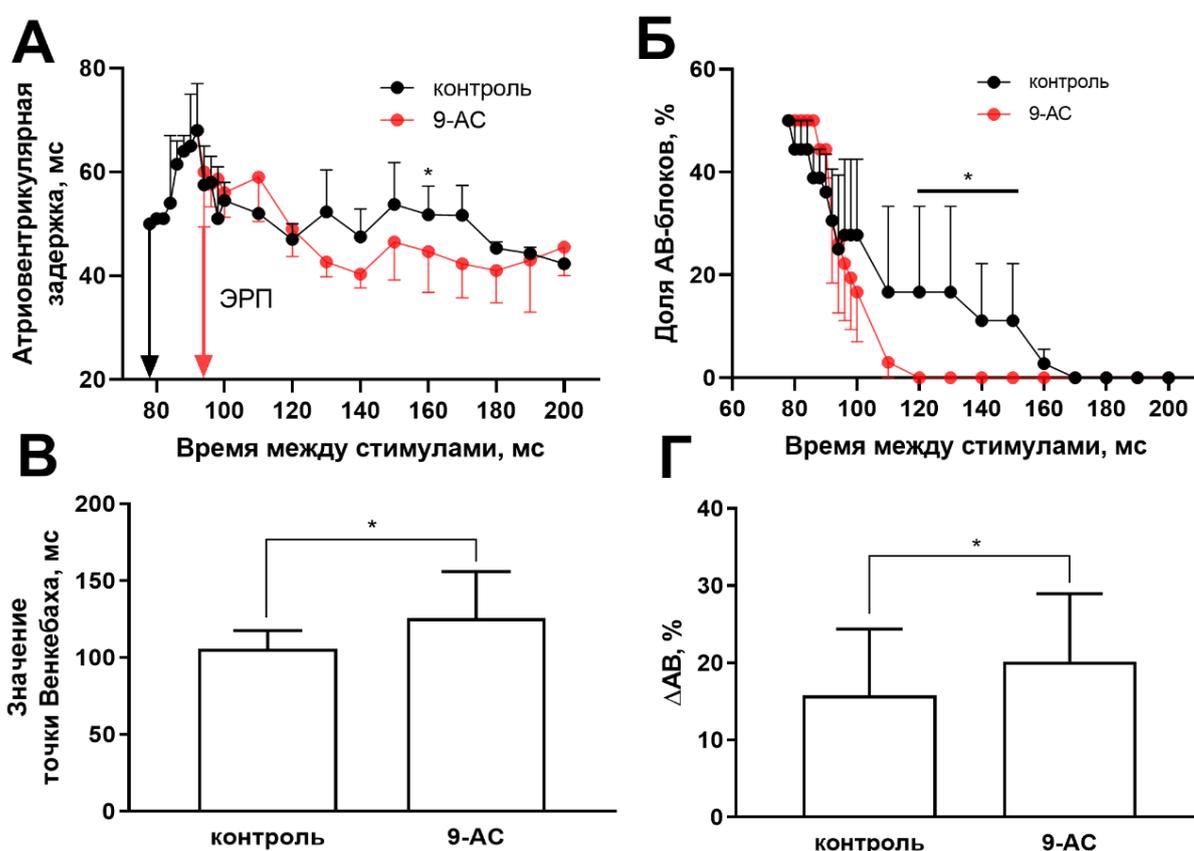


Рисунок 33. Влияние хлорного блокатора 9-АС на функцию АВУ в ИС крысы. А – Эффект 9-АС на длительность атриовентрикулярной задержки. Стрелками показано значение ЭРП для контроля (черный цвет) и при действии 9-АС (красный цвет). Двухфакторная ANOVA, апостериорный тест Шидака. Б – Изменение доли АВ-блоков от суммарного числа кардиоциклов при действии 9-АС. Двухфакторная ANOVA, апостериорный тест Шидака. В – Увеличение значения точки Венкебаха в контроле и при действии 9-АС. Парный t-критерий Стьюдента. Г – Увеличение Δ АВ (величины осцилляций АВЗ) при действии 9-АС. Парный t-критерий Стьюдента. * – $p < 0.05$

4.4.5. Влияние блокады хлорной проводимости на эффекты активации α_1 -адренорецепторов САУ в изолированном сердце

Блокатор анионных каналов NPPB подавляет вызванные ФЭ изменения ВВФСУ, кВВФСУ 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 ± 190.7 и 98.7 ± 31.6 мс в контроле или $2804 \pm 91\%$ от контрольного значения, $p < 0.01$, $n = 5$) (Рисунок 34 Б). Важно, что в присутствии ФЭ увеличение кВВФСУ, вызванное NPPB, сопровождается ступенчатым восстановлением автоматии САУ (Рисунок 34 А), а также уменьшением аккомодации. При межстимульном интервале 120 мс вышеуказанный параметр составляет $55 \pm 10\%$ ($p < 0.05$, $n = 5$) по сравнению с $90 \pm 10\%$ при действии только ФЭ или $70 \pm 10\%$ в контроле (Рисунок 34 В).

4.4.6. Влияние блокады хлорной проводимости на эффекты активации α_1 -адренорецепторов в тканевых препаратах САУ

При действии ФЭ на фоне блокатора хлорных каналов 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 ± 0.01 мм²) и частоты СПД, которая составляет $89.7 \pm 7.0\%$ от контрольного значения ($p < 0.05$, $n = 5$) (Рисунок 35 Б-В), однако вызывает небольшое смещение ТПА (1.2 ± 0.2 мм, $n = 5$) (Рисунок 35 Г), которое наблюдается как при формировании невозбудимой зоны ($n = 2$) (Рисунок 35 А), так и без нее ($n = 3$). При действии ФЭ на фоне NPPB небольшое смещение ТПА не имеет выраженной поляризации и направлено в сторону устья верхней полой вены.

4.4.7. Влияние блокады хлорной проводимости на эффекты активации α_1 -адренорецепторов АВУ в изолированном сердце

В экспериментах, направленных на выявление вклада хлорной проводимости в эффекты активации α_1 -АР в качестве блокатора хлорной проводимости, применяли DCPiB, блокатор хлорных каналов LRRC. Именно для этого хлорного канала характерен наиболее высокий уровень мРНК в АВУ. При действии ФЭ на фоне DCPiB наблюдается увеличение длительности задержки проведения в АВ-соединении (Рисунок 36 А), а также увеличение значения точки Венкебаха (Рисунок 36 Б) и ЭРП (с 84 ± 15 мс до 170 ± 20 мс, $p < 0.05$) (Рисунок 36 В).

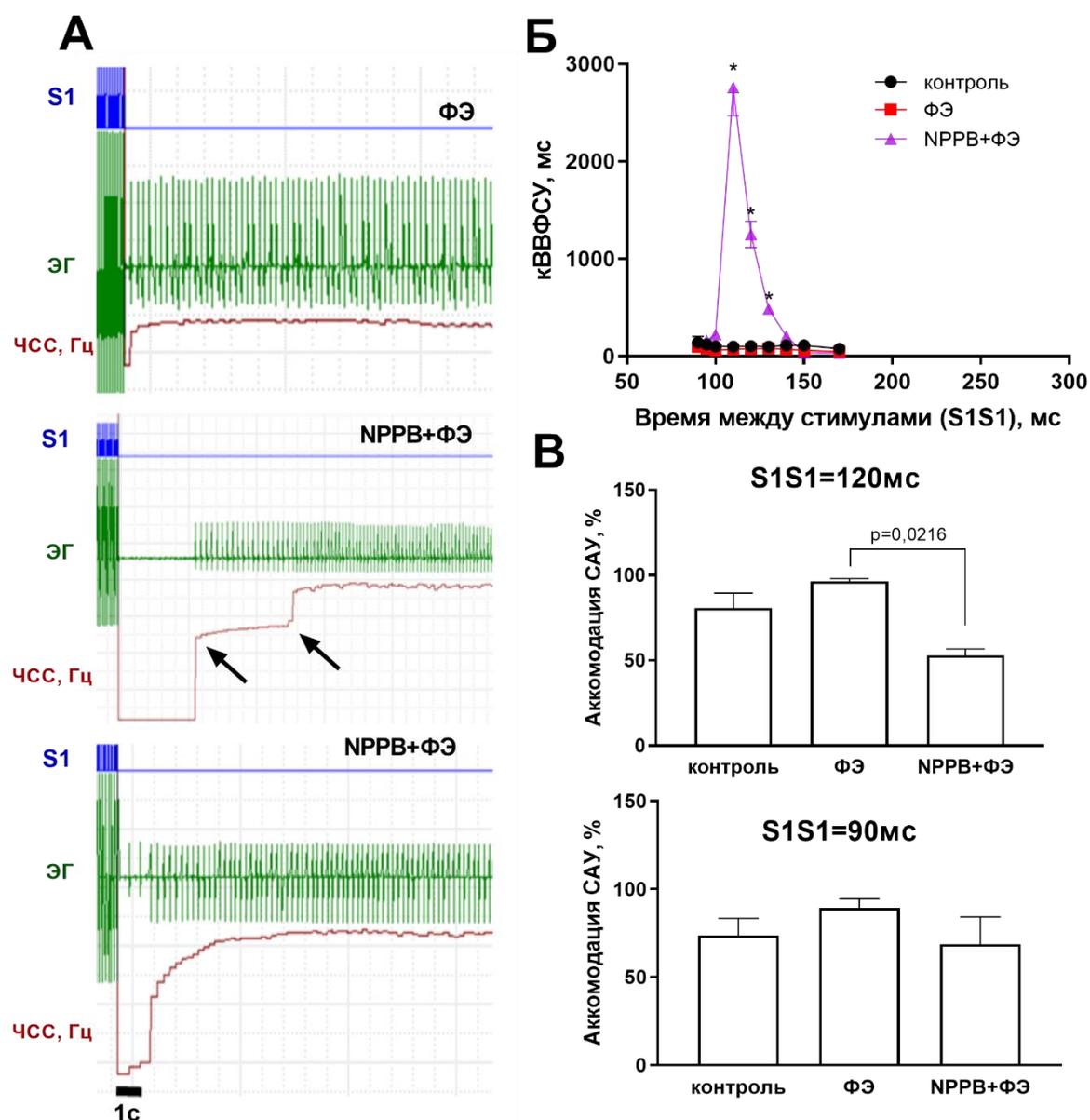


Рисунок 34. Влияние блокады хлорных каналов на α_1 -адренергические эффекты в САУ. А – Репрезентативные примеры записей, демонстрирующие восстановление спонтанной активности САУ (после прекращения стимуляции) при действии NPPB на фоне фенилэфрина (ФЭ). При действии ФЭ на фоне NPPB наблюдается ступенчатый характер (средняя панель) возобновления ритма ИС (автоматии САУ). Б – Влияние NPPB на снижение ВВФСУ, кВВФСУ, вызываемое ФЭ, двухфакторная ANOVA, апостериорный тест Шидака, * – $p < 0.05$. В – Влияние NPPB на увеличение аккомодации САУ, вызываемое ФЭ, однофакторная ANOVA, апостериорный тест Тьюки.

Блокатор анионного транспорта пробенецид не оказывает влияния на длительность АВЗ в контрольных условиях и не изменяет увеличение АВЗ, вызываемое ФЭ (Рисунок 37 Б). Однако пробенецид подавляет увеличение ЭРП в АВУ, вызванное стимуляцией α_1 -АР ($n = 6$, $p > 0.05$) (Рисунок 37 В). При действии ФЭ на фоне пробенецида длительность ЭРП составляет 107 ± 4 мс, что статистически значимо меньше ($n = 6$,

$p < 0,05$), чем при самостоятельном действии ФЭ и близко к длительности ЭРП в контрольных условиях (Рисунок 37 А).

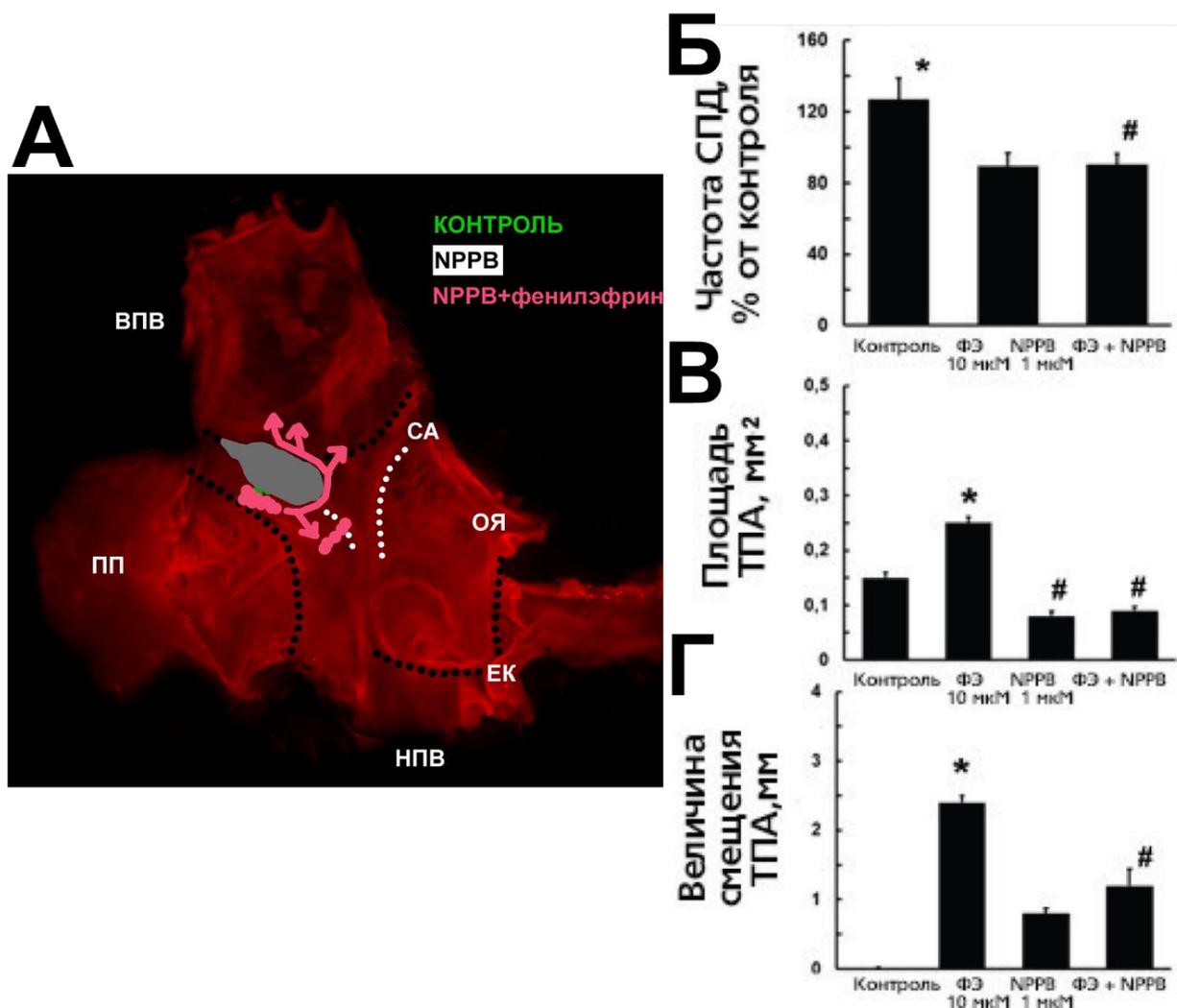


Рисунок 35. Паттерн активации САУ крысы при стимуляции α_1 -адренорецепторов (α_1 -АР) при действии блокатора хлорной проводимости NPPB. А – Репрезентативный пример паттерна активации САУ при действии NPPB, а также действия ФЭ на фоне NPPB. NPPB вызывает формирование в САУ невозбудимой зоны (показано штриховкой) и смещение ТПА за пределы невозбудимой зоны. На фоне NPPB не происходит увеличения площади ТПА при действии ФЭ. Б – Частота спонтанных ПД (сверху), площадь ТПА (в центре), а также величина смещения ТПА (снизу) в тканевых препаратах САУ при действии ФЭ и NPPB, * – статистически значимое ($p < 0.05$) отличие от контроля, # – статистически значимое ($p < 0.05$) отличие от ФЭ, однофакторная ANOVA, апостериорный тест Тьюки. ВПВ – верхняя полая вена, ПП – ушко правого предсердия и пограничный гребешок (отграничен черным пунктиром), НПВ – нижняя полая вена, ОЯ – овальная ямка, ЕК – Евстахийев клапан, СА – рудиментарный гребешок синоатриального клапана (показано белым пунктиром).

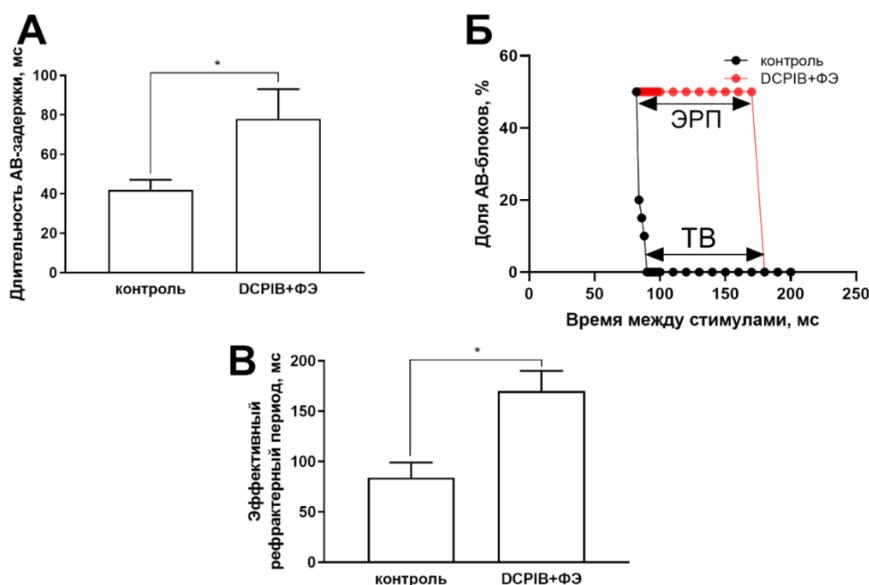


Рисунок 36. Влияние блокады хлорных каналов на α_1 -адренергические эффекты в АВУ. А – Репрезентативный пример увеличения длительности АВЗ при действии ФЭ на фоне DSRIB при разных межстимульных интервалах. Б – Увеличение доли АВ-блоков от суммарного числа кардиоциклов при действии ФЭ на фоне DSRIB. В – Увеличение длительности эффективного рефрактерного периода (ЭРП) АВУ при действии ФЭ на фоне DSRIB. Парный t-критерий Стьюдента, * – $p < 0.05$.

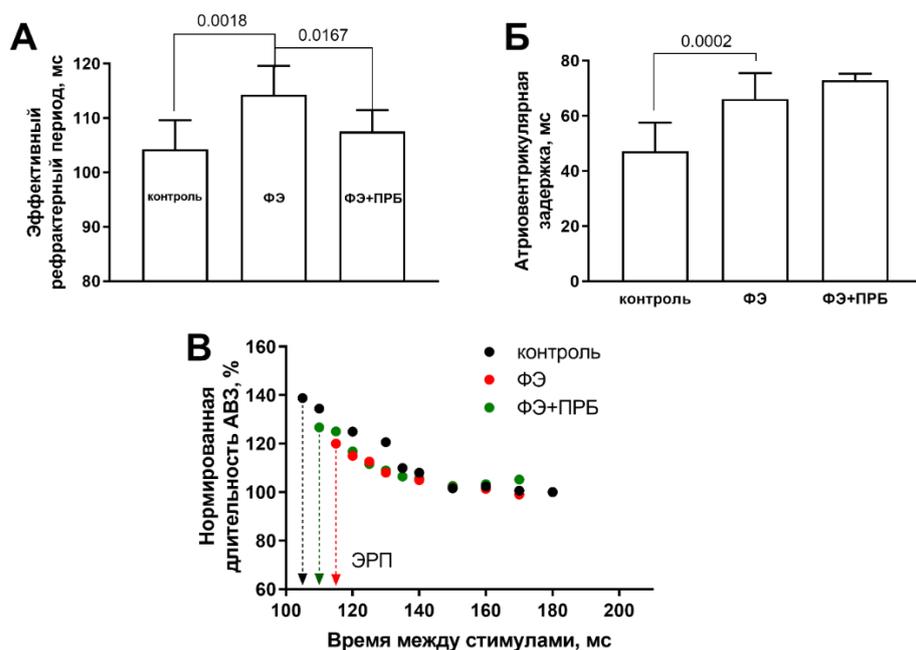


Рисунок 37. Эффекты стимуляции α_1 -АР фенилэфрином (ФЭ) при действии пропранолола (ПРБ) в АВУ. А – Величина ЭРП АВУ в контроле, при действии ФЭ и при действии ФЭ на фоне пропранолола. Б – Изменение длительности атриовентрикулярной задержки в контрольных условиях, при действии ФЭ и при действии ФЭ на фоне пропранолола. Однофакторная ANOVA, апостериорный тест Тьюки. В – Репрезентативный пример увеличения длительности ЭРП в контроле, при действии ФЭ и при действии ФЭ на фоне пропранолола.

Пробенецид не вызывает изменения ТВ, а также не приводит к изменению ТВ на фоне действия ФЭ ($n = 6, p > 0.05$) (Рисунок 38 В). Пробенецид не оказывает влияния на встречаемость блоков проведения в АВУ, вызванных ФЭ ($n = 6, p > 0.5$). Пробенецид значительно уменьшает амплитуду осцилляций длительности АВЗ, вызванных ФЭ (от 26 ± 3 до $17 \pm 2\%$, в тех экспериментах, где они сохраняются) (Рисунок 38 А-Б).

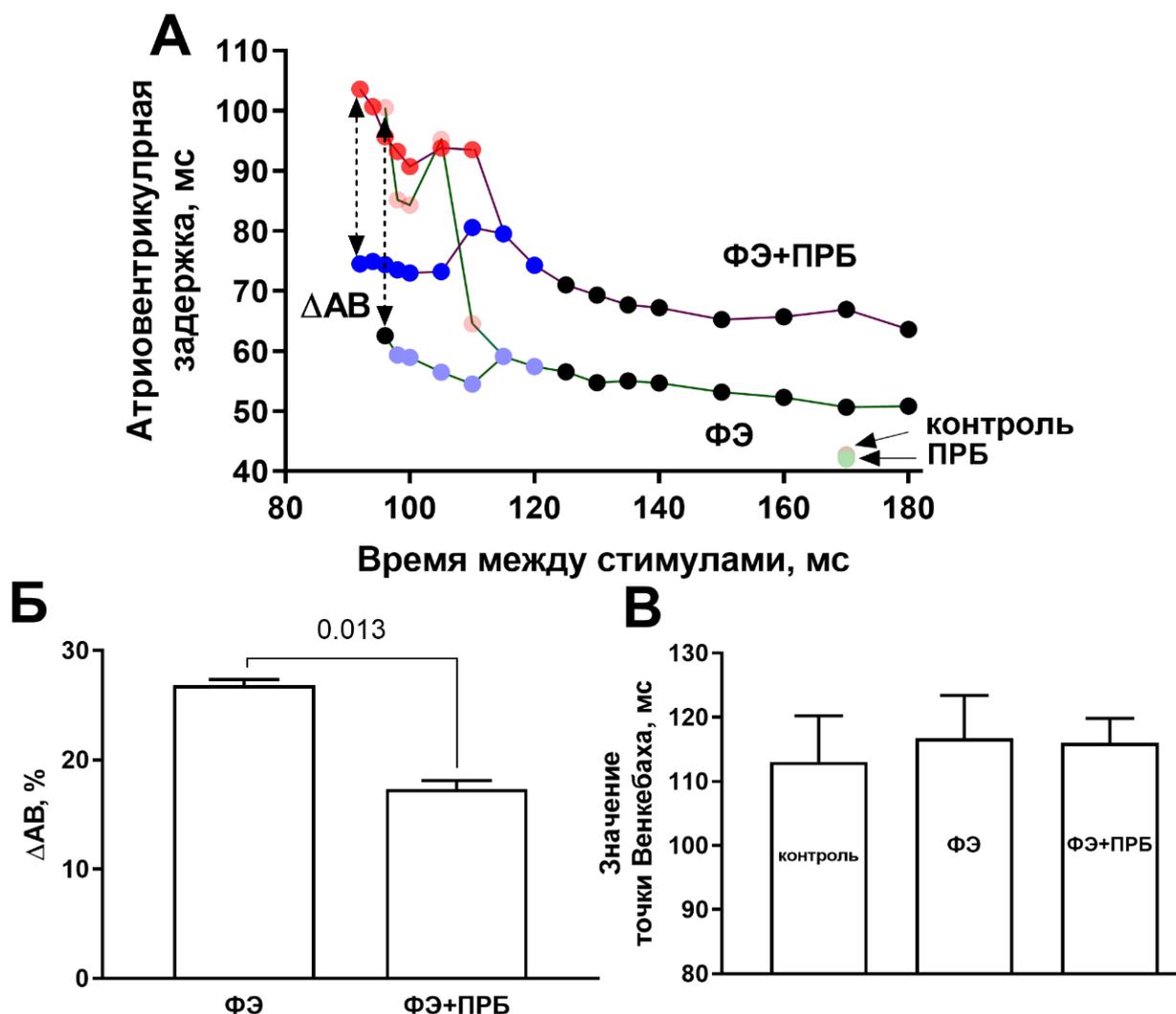


Рисунок 38. Влияние пробенецида (ПРБ) на периодику Венкебаха и осцилляции длительности атриовентрикулярной задержки, вызванные стимуляцией α_1 -АР фенилэфрином (ФЭ). А – Кривая рефрактерности атриовентрикулярного узла при действии ФЭ и ФЭ на фоне ПРБ. Б – Влияние ПРБ на увеличение ΔAB (величина осцилляций АВЗ), вызванное ФЭ. Непарный t-критерий Стьюдента. В – Влияние ПРБ на увеличение значения ТВ, вызванное ФЭ.

4.4.8. Экспрессия генов, кодирующих хлорные каналы в рабочем миокарде и в проводящей системе сердца

Экспрессия генов всех типов исследуемых хлорных каналов в САУ подтверждается на уровне мРНК. При оценке экспрессии *Clcn2* методом РВ-ПЦР установлено, что мРНК

Clcn2 у взрослых крыс обнаруживается как в рабочем миокарде (левом предсердии), так и в проводящей системе сердца (САУ и АВУ). Однако относительный уровень мРНК *Clcn2* статистически значимо больший ($n = 6$, $p = 0.0013$) в САУ по сравнению с другими исследуемыми отделами сердца (Рисунок 39 А). При оценке количества мРНК другого подтипа каналов семейства *Clc*, *Clcn3*, мРНК также обнаруживается во всех исследуемых отделах рабочего миокарда и проводящей системы (Рисунок 39 Б), однако статистически значимого различия между отделами выявлено не было ($n = 6$). Транскрипт кальций-зависимого хлорного канала *tmem16a* в небольшом количестве также обнаруживается во всех исследуемых отделах рабочего миокарда и проводящей системы (Рисунок 39 В), однако экспрессия *Ano1* статистически значимо ниже в САУ по сравнению с рабочим миокардом ($n = 6$, $p < 0.01$). Хлорный канал *Lrrc8a*, регулируемый изменением внутриклеточного объема, также обнаруживается в сердце на уровне мРНК как в левом предсердии, так и в САУ и АВУ ($n = 6$) (Рисунок 39 Г).

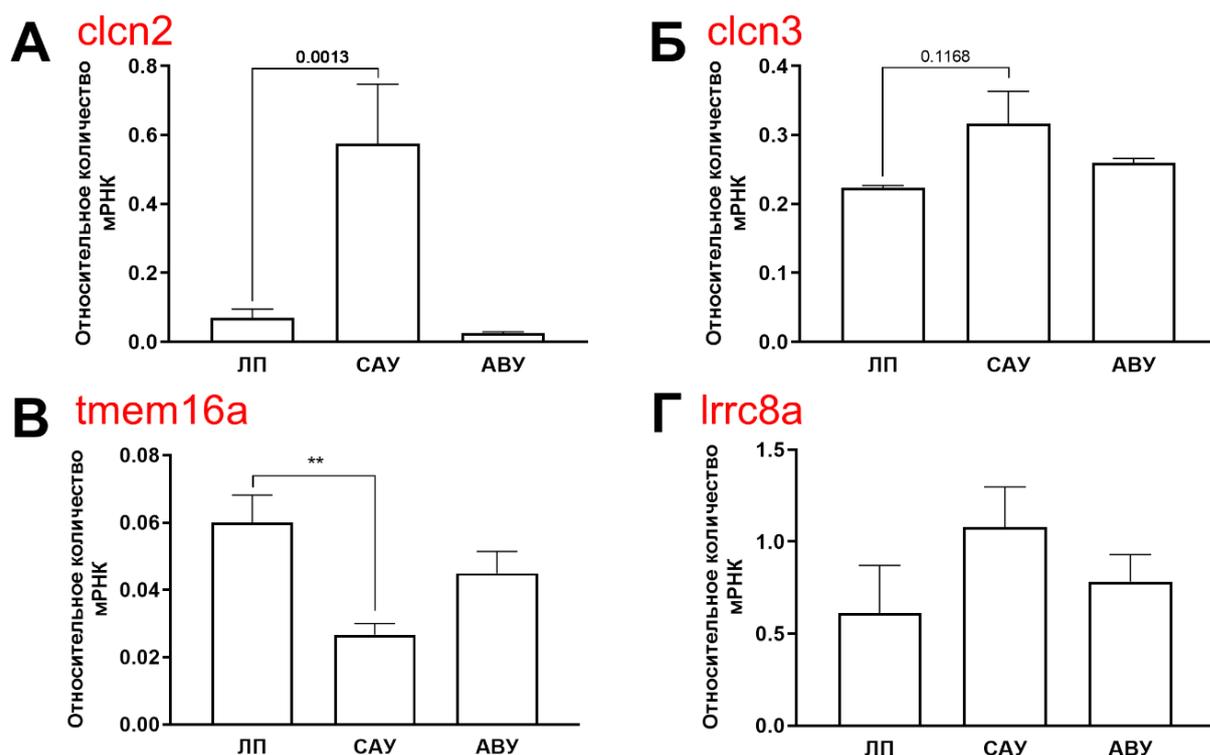


Рисунок 39. Экспрессия генов, кодирующих хлорные каналы в рабочем миокарде и миокарде проводящей системы крысы: *Clcn2* (А), *Clcn3* (Б), *Tmem16a* (В) и *Lrrc8a* (Г). Mann-Whitney test, данные представлены в виде медианы \pm интерквартильный размах.

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 *Clcn2*

($\log_2FC = 0.63$) по сравнению с ЛП (Рисунок 40). Наоборот, количество транскриптов *Lrrc8a* ($\log_2FC = -0.19$, $p = 0.08$) и *Clcn3* ($\log_2FC = -0.23$, $p = 0.11$) в САУ меньше чем в ЛП.

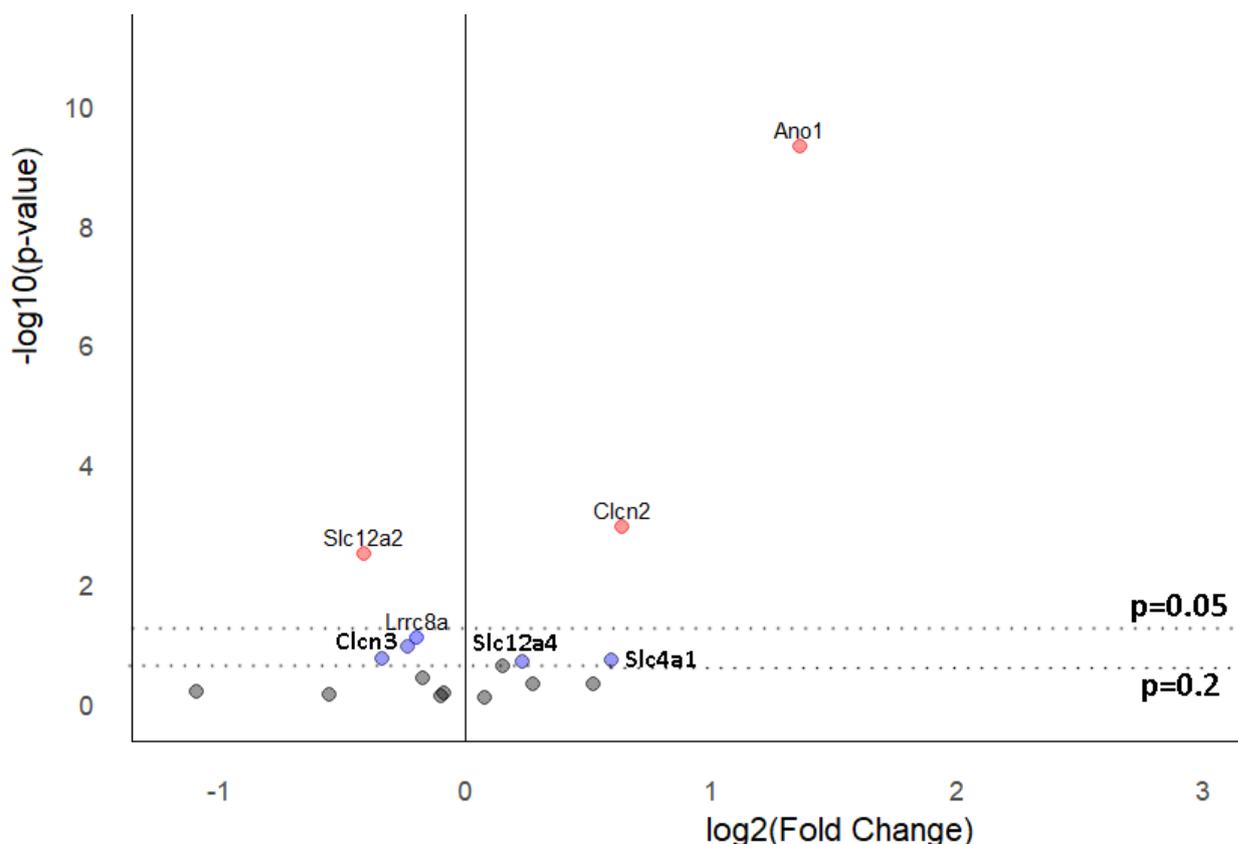


Рисунок 40. Диаграмма дифференциально экспрессированных генов хлорных каналов, котранспортеров и обменников (volcano plot) в препаратах САУ по отношению к препаратам левого предсердия. Красным цветом представлены гены, для которых различия достоверны ($p < 0.05$). Синим цветом представлены гены, для которых $0.05 < p < 0.2$. Wald test.

В АБУ обнаруживается значительное количество транскриптов хлорных каналов *Ano1* (Tmem16A), *Clcn2*, *Clcn3* и *Lrrc8a* (Рисунок 41). Наибольший уровень экспрессии по сравнению с ЛП в АБУ выявляется для гена, кодирующего кальций-чувствительные хлорные каналы Tmem16A (*Ano1*).

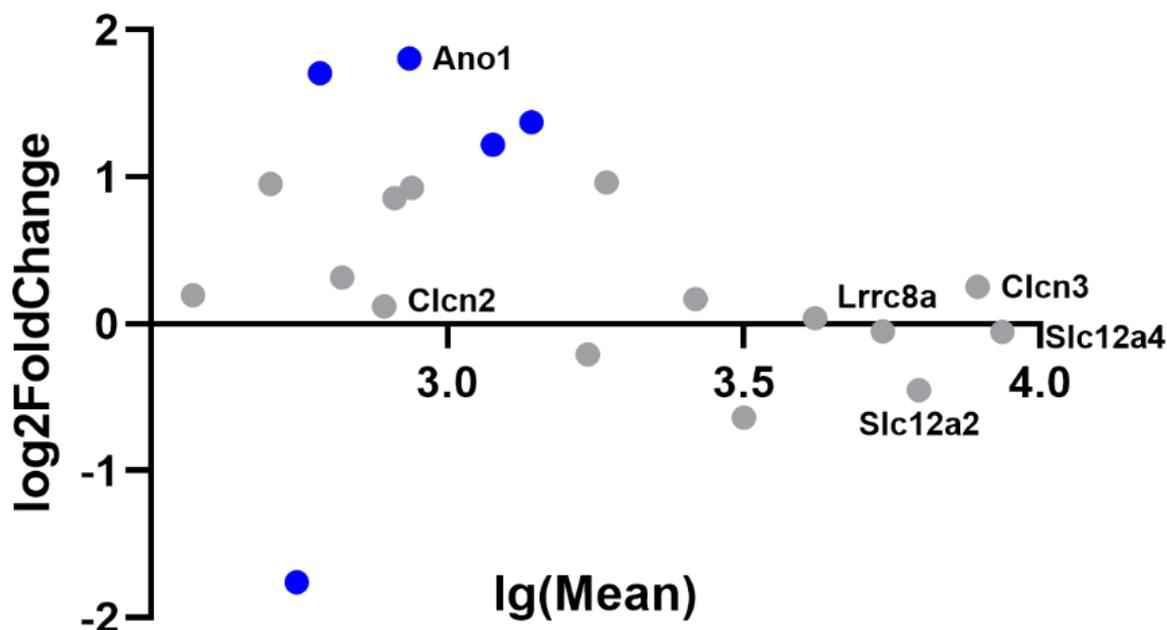


Рисунок 41. Диаграмма дифференциально экспрессированных генов хлорных каналов, котранспортеров и обменников (MA plot) в препаратах АВУ по отношению к препаратам левого предсердия в координатах \log_2FC (ось ординат) – $\lg(\text{Mean of normalised count})$ (ось абсцисс). Красным цветом представлены гены, для которых различия достоверны ($p < 0.05$).

4.4.9. Экспрессия генов, кодирующих катион-хлорные котранспортеры в рабочем миокарде и проводящей системе сердца

Транскрипт гена *slc12a4*, кодирующего катион-хлоридный котранспортер КСС1, переносящий ион калия и хлора из клетки во внеклеточное пространство, обнаруживается в левом предсердии и в САУ, и в АВУ (Рисунок 42 А). Однако относительный уровень экспрессии гена, кодирующего *slc12a4* в САУ статистически значимо больше по сравнению с другими исследуемыми отделами сердца ($n = 6$, для ЛП $p = 0.0897$, для АВУ $p = 0.0366$). Транскрипт гена *slc12a2*, кодирующего другой катион-хлоридный котранспортер, НКСС1, переносящий ионы натрия, калия и хлора внутрь клетки из внеклеточного пространства, также обнаруживается как в левом предсердии, так и в элементах проводящей системы сердца ($n = 6$) (Рисунок 42 Б).

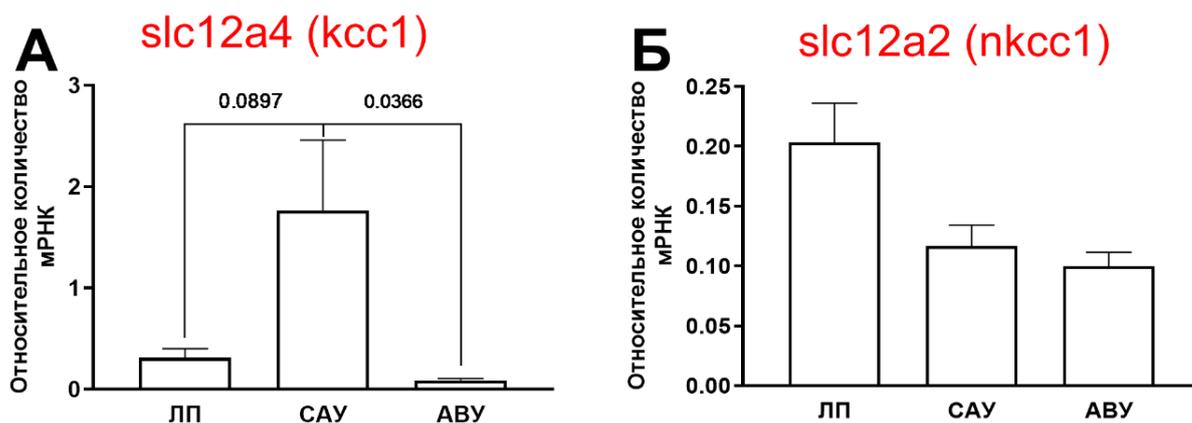


Рисунок 42. Экспрессия генов, кодирующих катион-хлорные котранспортеры в рабочем миокарде и миокарде проводящей системы крысы: *Slc12a4* (KCC1) (А) и *Slc12a2* (NKCC1) (Б). Mann-Whitney test, данные представлены в виде медианы ± интерквартильный размах.

Данные РНК-секвенирования подтверждают результаты РВ-ПЦР (Рисунок 40): в САУ обнаруживаются транскрипты как *Slc12a2*, так и *Slc12a4* (n=3). Причем уровень *Slc12a4* также выше в САУ по сравнению с ЛП ($\log_2FC = 0.39$, $p < 0.05$), а уровень *Slc12a2* ниже в САУ по сравнению с ЛП ($\log_2FC = -0.3$, $p = 0.2$).

В АВУ по данным РНК-секвенирования обнаруживается большое количество транскриптов как *Slc12a2*, так и *Slc12a4* (Рисунок 41). Как и при ПЦР-анализе, уровень транскриптов этих генов в АВУ статистически не отличается от уровня в ЛП.

4.5. Внутриклеточная концентрация ионов хлора в тканевых препаратах ЛП и САУ

Согласно данным оценки внутриклеточной концентрации ионов хлора с помощью меркуриметрического метода для препаратов САУ характерная большая внутриклеточная концентрация хлора по сравнению с препаратами ЛП (12,4 мМ и 4,7 мМ соответственно, $n = 4$, $p < 0.05$). Исходя из этих данных и уравнения Нернста, E_{Cl} в САУ будет более положительным (> -56 мВ в зависимости от $[Cl^-]_o$) по сравнению с E_{Cl} в ЛП (> -82 мВ в зависимости от $[Cl^-]_o$).

4.6. Влияние изменения осмолярности внеклеточной среды на автоматию САУ

При замещении изотонического раствора гипотоническим к 6-ой минуте перфузии происходит статистически значимое уменьшение частоты СПД в многоклеточных тканевых препаратах, включающих область САУ, по сравнению с изотоническим раствором (с 288 ± 19 СПД/мин до 231 ± 21 СПД/мин, $n = 6$, $p < 0.05$) (Рисунок 44 Б).

При возвращении тканевого препарата из гипотонического раствора в изотонический на 3-ю минуту перфузии происходит статистически значимое увеличение

частоты СПД по сравнению с контролем (с 239 ± 21 СПД/мин до 279 ± 36 СПД/мин, $n = 6$, $p < 0.05$) (Рисунок 44 Б).

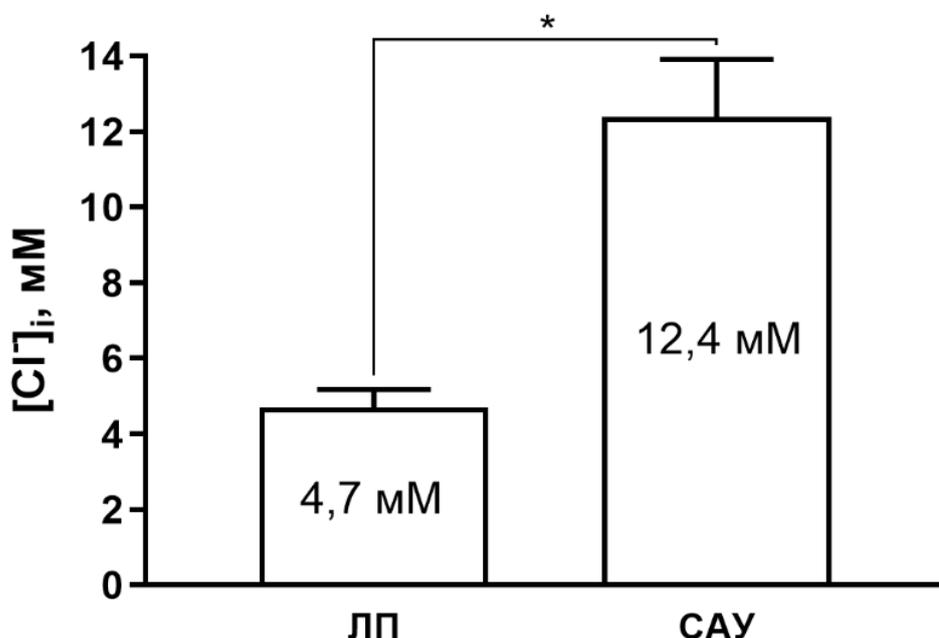


Рисунок 43. Цитоплазматическая концентрация ионов хлора ($[Cl^-]_i$) в многоклеточных тканевых препаратах левого предсердия (ЛП) и препаратах, включающих область синоатриального узла (САУ). Непарный t-критерий Стьюдента, * – $p < 0.05$.

4.7. Влияние изменения осмолярности внеклеточной среды на внутриклеточное содержание хлора в тканевых препаратах САУ

При окрашивании многоклеточного тканевого препарата, включающего область САУ, чувствительным к ионам хлора флуоресцентным красителем MQAE наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции по сравнению с неокрашенным препаратом (Рисунок 44 А). При замещении изотонического раствора гипотоническим не наблюдается увеличения средней интенсивности флуоресценции в межвенной области (Рисунок 44 В-Г). Увеличение интенсивности флуоресценции соответствует снижению внутриклеточной концентрации хлора ($[Cl^-]_i$).

Однако при возвращении многоклеточного тканевого препарата в изотонический раствор на 9-ую минуту перфузии наблюдается статистически значимое снижение средней интенсивности флуоресценции по сравнению с 1-ой минутой перфузии (с 59 ± 20 до 75 ± 41 , $n = 6$, $p < 0.05$), следовательно при возвращении из гипотонического раствора тканевого препарата в изотонический раствор, происходит увеличение $[Cl^-]_i$ (Рисунок 44 В).

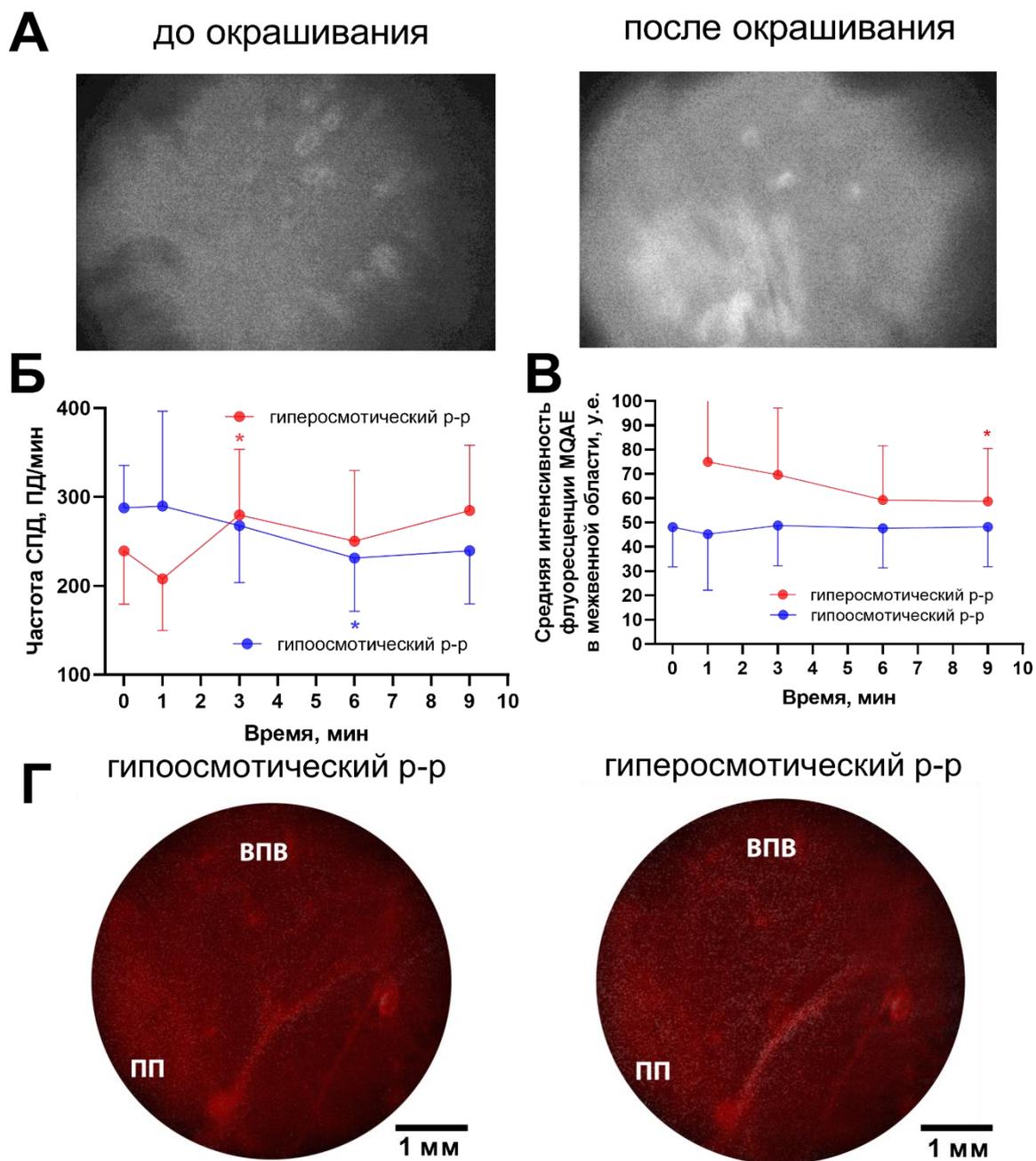


Рисунок 44. Влияние осмолярности раствора на внутриклеточное содержание ионов хлора в многоклеточном тканевом препарате, включающем область САУ. А – Репрезентативные примеры изображений, полученных до и после окрашивания хлорным зондом области САУ. Б – Изменение частоты спонтанных потенциалов действия (СПД) в многоклеточном тканевом препарате в гипо- и гиперосмотическом растворах. В – Изменение средней интенсивности флуоресценции в многоклеточном тканевом препарате в гипо- и гиперосмотическом растворах. Однофакторная ANOVA, апостериорный тест Тьюки. * – отличие от контроля (0 мин), $p < 0.05$. Г – Дифференциальное изображение, иллюстрирующее разницу внутриклеточной концентрации хлора между контрольным тканевым препаратом САУ и препаратом в гипо- или гиперосмотическом растворе. Белый цвет – уменьшение интенсивности флуоресценции по сравнению с контролем.

Следует отметить, что в различных участках межвенной области изменение интенсивности флуоресценции сильно различается. Этот пространственный разброс ослабляет изменение интенсивности флуоресценции, рассчитанной как среднее значение по всей площади тканевого препарата. Наибольшие изменения наблюдались в зоне, окружающей ветви артерии САУ.

4.8. Изменение внутриклеточного содержания хлора в многоклеточном тканевом препарате, включающем область САУ, при активации α_1 -адренорецепторов

При действии ФЭ к 6-ой минуте перфузии происходит увеличение частоты СПД в тканевом препарате (с 295 ± 17 СПД/мин до 319 ± 21 СПД/мин, $n = 6$, $p < 0.05$) (Рисунок 45 А). При окрашивании многоклеточного препарата, включающего область САУ, чувствительным к ионам хлора флуоресцентным красителем MQAE, наблюдается статистически значимое снижение средней интенсивности флуоресценции к 6-ой минуте действия ФЭ (с 48 ± 11 до 45 ± 11 , $p < 0.05$), что говорит о повышении $[Cl^-]_i$ в тканевом препарате при действии ФЭ (Рисунок 45 Б-Г).

4.9. Влияние стимуляции α_1 -адренорецепторов на паттерн активации САУ при изменении осмолярности внеклеточной среды

При одновременном действии ФЭ и гипоосмотического раствора изменение частоты оказывается значительно больше (к 9-ой минуте 333 ± 38 ПД/мин, $p < 0.05$, $n = 6$) чем при действии каждого из этих факторов по отдельности (Рисунок 46 А-Б). Увеличение частоты при этом сопровождается увеличением площади зоны первичной активации, а также смещением точки первичной активации в область устья верхней поллой вены (Рисунок 46 В). При изоосмотической реверсии (возвращении препарата в изотонический раствор) на фоне действия ФЭ не происходит изменение частоты СПД, однако наблюдается дополнительное смещение точки первичной активации к устью нижней поллой вены.

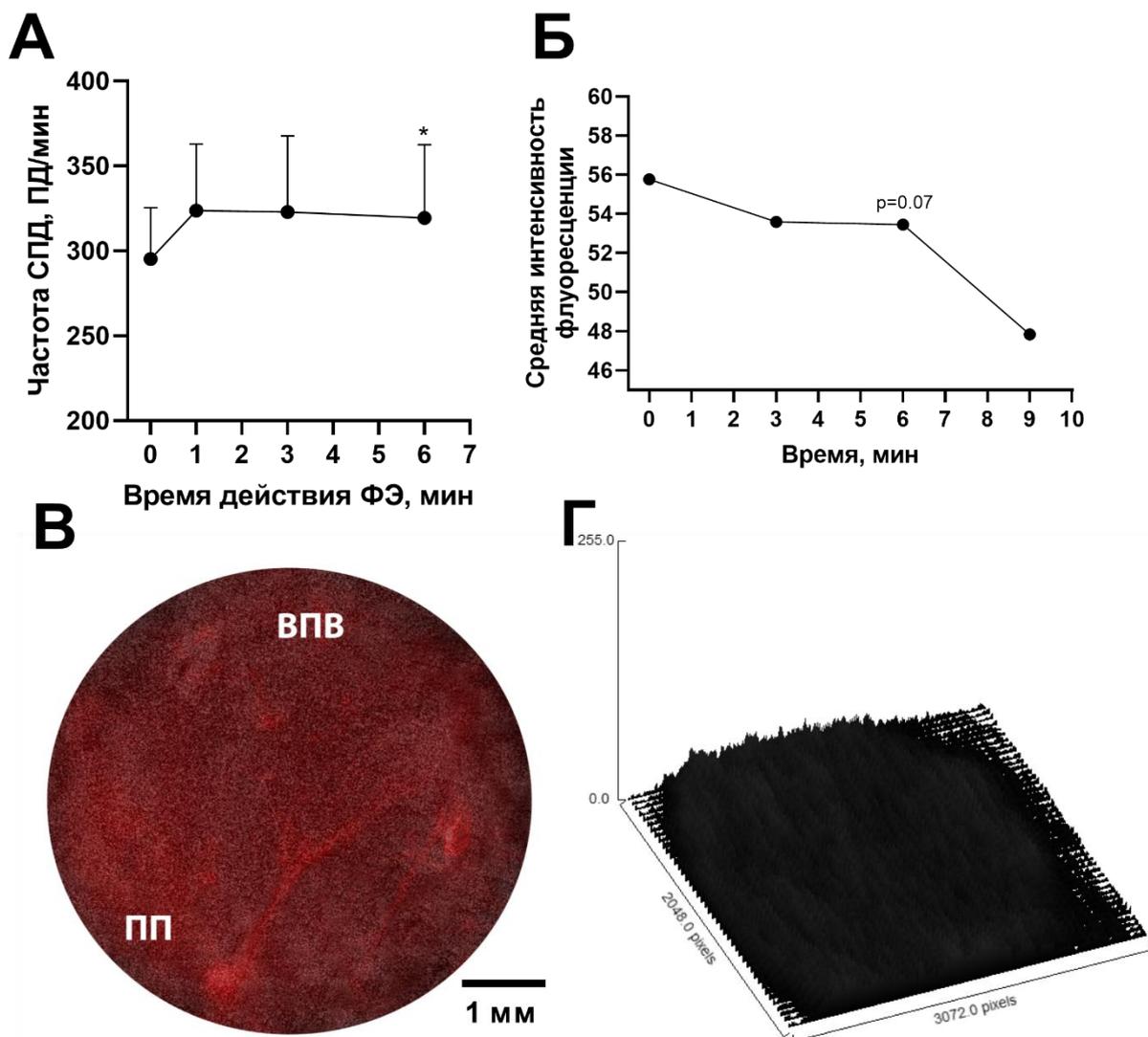


Рисунок 45. Влияние фенилэфрина (ФЭ) на внутриклеточную концентрацию хлора в многоклеточных тканевых препаратах, включающих область САУ. А – Увеличение частоты спонтанных потенциалов действия (СПД) в многоклеточных тканевых препаратах при действии ФЭ. Б – Изменение средней интенсивности флуоресценции в многоклеточном тканевом препарате при действии ФЭ. Однофакторная ANOVA, апостериорный тест Тьюки. * – отличие от контроля (0 мин), $p < 0.05$. В – Дифференциальное изображение, показывающее разницу внутриклеточной концентрации хлора между контрольным тканевым препаратом САУ и препаратом к 6-ой минуте действия ФЭ. Белый цвет – уменьшение интенсивности флуоресценции по сравнению с контролем. Г – Дифференциальное изображение, показывающее зоны тканевого препарата с максимальным изменением интенсивности флуоресценции при действии ФЭ.

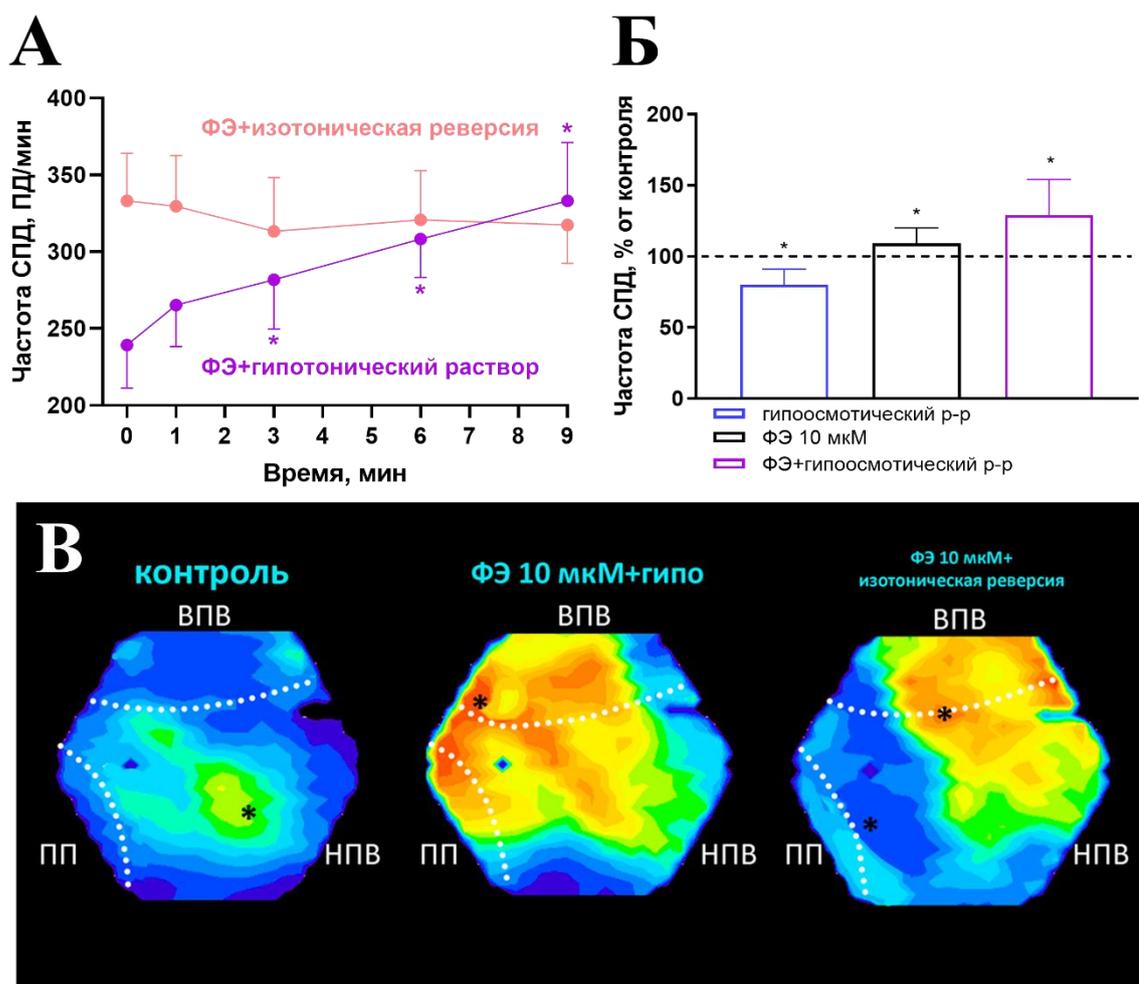


Рисунок 46. Паттерн активации САУ при одновременном действии фенилэфрина (ФЭ) и гипоосмотического раствора. А – Изменение частоты спонтанных потенциалов действия (СПД) при одновременном действии ФЭ и гипоосмотического раствора (фиолетовый цвет) и при изотонической реверсии (возвращении препарата в изотонический раствор) на фоне действия ФЭ (розовый цвет). Однофакторная ANOVA, апостериорный тест Тьюки. * – отличие от контроля (0 мин), $p < 0.05$. Б – Изменение частоты СПД при действии гипоосмотического раствора (синий цвет), ФЭ (черный цвет) и гипоосмотического раствора на фоне ФЭ (фиолетовый цвет) относительно частоты СПД в контроле. Однофакторная ANOVA, апостериорный тест Тьюки. * – отличие от контроля, $p < 0.05$. В – Репрезентативные примеры изменения паттерна активации в контроле (слева), при одновременном действии ФЭ и гипотонического раствора (посередине) и при изотонической реверсии на фоне ФЭ (справа). ВПВ – верхняя полая вена, НПВ – нижняя полая вена, ПП – правое предсердие, * – точка первичной активации.

4.10. Влияние блокады анионного транспорта на эффекты активации P2-рецепторов в проводящей системе сердца

Блокатор анионной проводимости пробенецид не вызывает изменения частоты СПД в тканевых препаратах САУ (296 ± 41 СПД/мин в контроле и 311 ± 50 СПД/мин при действии пробенецида, $n = 17$, $p > 0,1$). Более того, пробенецид не оказывает заметного

влияния на скорость медленной диастолической деполяризации в САУ кролика. Также, пробенецид не вызывает изменения частоты СПД при одновременном действии с агонистами P2-рецепторов – АТФ (n = 8) или α , β -метАТФ (n = 6). При действии АТФ и α , β -метАТФ на фоне пробенецида частота СПД составляет 303.4 ± 60 и 286 ± 30 ПД/мин, соответственно (Рисунок 47).

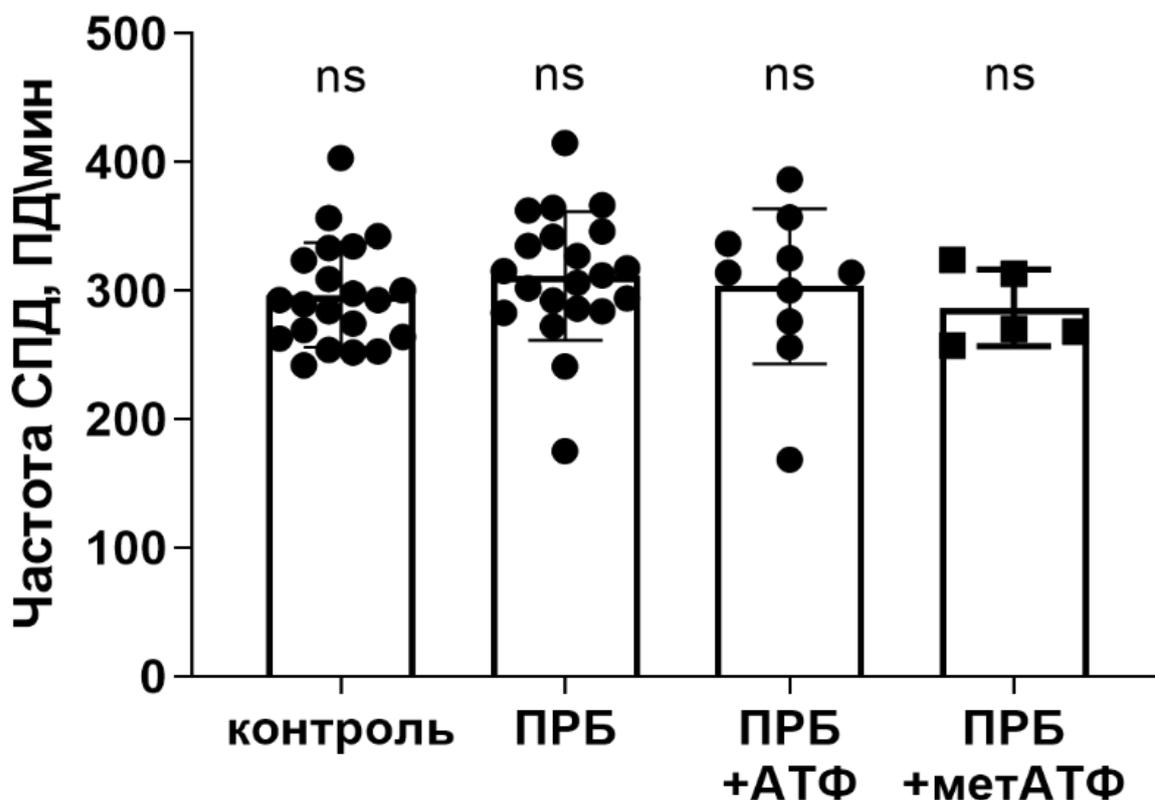


Рисунок 47. Влияние пробенецида на эффекты АТФ и α , β -метАТФ на частоту генерации спонтанных потенциалов действия (СПД) в САУ кролика, Однофакторная ANOVA, апостериорный тест Тьюки, ns – статистически не значимо.

Пробенецид подавляет способность АТФ вызывать блоки проведения в АВ-соединении. На фоне двойной автономной блокады и пробенецида АВ-блоки при действии АТФ возникают всего в 13% всех экспериментов по сравнению с 80% при действии АТФ на фоне ДАБ (Рисунок 48 А).

В экспериментах с ИС крысы пробенецид не оказывает заметного влияния на длительность АВ-проведения (41 ± 9 мс в контроле, 41 ± 10 мс, n = 6), кроме того, пробенецид не приводит к возникновению АВ-блоков или других нарушений проведения в ИС крысы. Также, пробенецид не подавляет увеличение времени АВ-проведения, вызываемого АТФ ($p > 0.1$). Время АВ-проведения при действии АТФ на фоне пробенецида увеличивается с 41 ± 10 до 73.5 ± 11 мс (Рисунок 48 Б). Максимальное увеличение

длительности АВЗ при действии АТФ в контроле составляет $132 \pm 25\%$, а на фоне пробенецида – $156 \pm 28\%$.

Пробенецид также не оказывает эффекта на частоту генерации ПД в АВУ (2.6 ± 0.7 Гц в контроле и 2.4 ± 0.9 Гц при действии пробенецида, $n = 6$, $p > 0.1$) (Рисунок 48 В). На фоне пробенецида АТФ также приводит к достоверному снижению частоты СПД, генерируемых АВУ – от 2.9 ± 0.5 Гц в контроле до 1.8 ± 0.2 Гц ($n = 6$). Таким образом, пробенецид не подавляет эффекта АТФ в изолированных препаратах АВ-соединения крысы, генерирующих СПД.

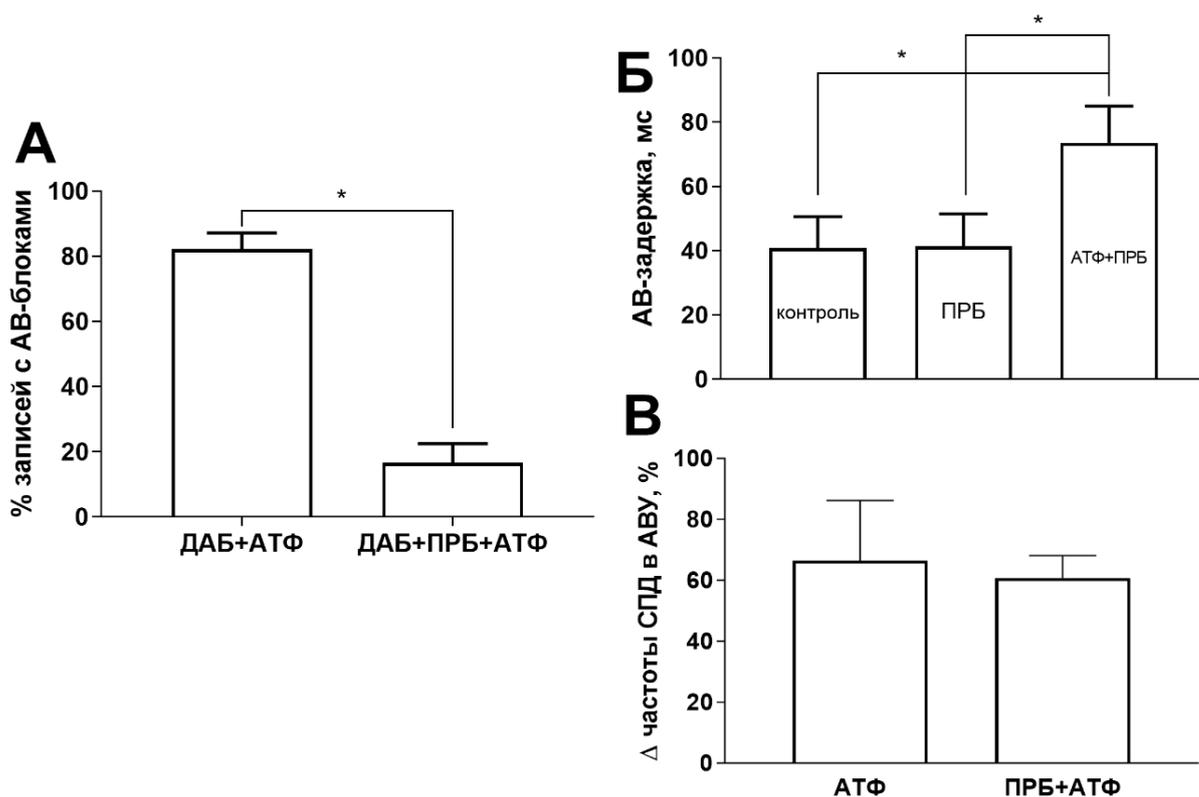


Рисунок 48. Влияние блокатора анионной проводимости пробенецид на эффекты АТФ в АВУ. А – Процент экспериментов, в которых при действии АТФ возникали АВ-блоки, от общего количества экспериментов с введением АТФ на фоне ДАБ и на фоне ДАБ и пробенецида. Точный тест Фишера, * – $p < 0.05$. Б – Самостоятельный эффект пробенецида и эффект пробенецида на длительность проведения в АВ-соединении при введении АТФ. Однофакторная ANOVA, апостериорный тест Тьюки, * – $p < 0.05$. В – Изменение частоты генерации импульсов в многоклеточном препарате АВ-соединения при действии АТФ в контроле и на фоне пробенецида, непарный t-критерий Стьюдента.

5. ОБСУЖДЕНИЕ

5.1. Локализация α_{1A} -адренорецепторов в структурах проводящей системы сердца

В представленной работе была продемонстрирована экспрессия α_{1A} -АР как на уровне мРНК, так и на уровне белка в различных отделах проводящей системы сердца – САУ, АВУ и пучке Гиса. Уровень транскриптов α_{1A} -АР в ткани САУ ниже, чем в предсердном миокарде. Большой относительный уровень мРНК α_{1A} -АР в левом предсердии по сравнению с САУ связан с клеточной гетерогенностью САУ. Известно, что кардиомиоциты составляют 45% от общего количества клеток и соединительных волокон в САУ. Поэтому при пересчете количества мРНК на 1 кардиомиоцит уровень экспрессии α_{1A} -АР в САУ оказывается значимым. Также стоит отметить, что кардиомиоциты САУ меньше по размеру, чем кардиомиоциты рабочего предсердного и желудочкового миокарда. Кроме того, пейсмекерные кардиомиоциты представляют собой довольно гетерогенную популяцию и включают клетки, которые, возможно, не экспрессируют α_{1A} -АР.

Иммунофлуоресцентное исследование экспрессии α_{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 α_1 -АР области ядра клеток САУ и АВУ соответствуют кластерам так называемых ядерных α_1 -АР. Характер флуоресцентных сигналов указывает на локализацию α_{1A} -АР именно в пейсмекерных кардиомиоцитах.

5.2. Эффекты активации α_{1A} -адренорецепторов в САУ и их физиологическая роль в функционировании сердечно-сосудистой системы

Подтвердив экспрессию α_{1A} -АР в САУ, мы установили, что активация α_1 -АР приводит к увеличению ритма ИС крысы, а также к увеличению частоты СПД в тканевых препаратах САУ. Таким образом, по меньшей мере у крыс, активация α_1 -АР приводит к положительному хронотропному эффекту (Рисунок 49). Следует отметить, что в наших экспериментах этот эффект сопровождается смещением (или «миграцией») точки первичной активации в САУ в направлении устья верхней полой вены. Миграция точки первичной активации в САУ является одним из механизмов регуляции ритма сердца. Увеличение ЧСС при активации симпатических нервов связывают со смещением ТПА в межвенной области правого предсердия, преимущественно в направлении верхней полой вены [Abramochkin и др., 2009; Glukhov и др., 2010; Lang и др., 2011].

Известно, что положительный хронотропный эффект при повышении уровня циркулирующего адреналина, увеличении активности симпатического отдела вегетативной нервной системы и высвобождении НА реализуется посредством активации β -АР [Chakraborti, Chakraborti, Shaw, 2000]. Увеличение ЧСС, обусловленное α_1 -адренергической компонентой, вероятно, будет маскировано или будет незначимым *in vivo* при одновременной активации α_1 - и β -АР. Ранее показано, что эффекты в миокарде крысы, обусловленные активацией пула ядерных адренорецепторов, отставлены во времени от момента высвобождения НА на несколько (1-5) минут [Ivanova и др., 2021], поскольку происходят только после трансмембранного переноса НА из внеклеточной среды в цитоплазму кардиомиоцитов и транслокации в примембранную область протеинкиназ семейства PKC и src [Wu, O'Connell, 2015]. Таким образом, роль α_{1A} -АР в САУ может заключаться в поддержании высокого уровня ЧСС в период времени, соответствующий началу десенситизации β -АР [Mahmood, Ahmed, Zhang, 2022; Roth и др., 1991]. Однако функциональные эксперименты, выполненные в данной работе, позволяют предположить, что роль α_1 -АР в САУ может заключаться не столько в отставленном «дублировании» эффектов β -АР, сколько в «подстройке» электрофизиологических свойств САУ, облегчающих активацию рабочего миокарда при высокой частоте сердечных сокращений.

В наших экспериментах также установлено, что ФЭ приводит к уменьшению времени восстановления функции САУ и скорректированного времени восстановления САУ, а также способствует «ускорению» аккомодации САУ: при активации α_1 -АР быстрее достигается стационарная частота СПД в САУ после того, как прекращается подавление его автоматической активности. Однако эти эффекты наблюдаются только в том случае, когда для подавления автоматии САУ использовали электрическую стимуляцию с высокой частотой (интервалы между импульсами <150 мс). Уменьшение ВВФСУ и ускорение аккомодации не является значимым в том случае, когда автоматию САУ подавляли электрическими стимулами, следующими с низкой частотой. Транслируя результаты этих экспериментов на системный уровень, можно предположить, что при активации α_1 -АР способность САУ к автоматии «облегчается»; уменьшается время, необходимое для установления стационарной спонтанной автоматической активности САУ при высокой ЧСС.

В наших экспериментах при активации α_1 -АР наблюдается увеличение площади зоны первичной активации (т.е. возбуждения) в ткани межвенной области правого предсердия. Увеличение площади ЗПА приводит к уменьшению времени, необходимого для

поведения волны возбуждения из центральной части ритмоводителя сердца, обычно обозначаемой как «истинный» пейсмекер, к рабочему миокарду предсердий, окружающему пейсмекерный миокард. Такой эффект приводит к более ранней активации рабочего миокарда, небольшому уменьшению длительности кардиоцикла и, вероятно, к повышению ЧСС *in vivo*. Увеличение площади ЗПА можно интерпретировать как повышение массы одновременно возбужденного пейсмекерного миокарда. Помимо влияния на ЧСС такое повышение способствует увеличению надежности генерации ритма и передачи возбуждения из центральной части САУ в рабочий миокард.

Известно, что профиль экспрессии ионных каналов в «истинном» пейсмекере или центральной части САУ и на его периферии различается. Например, мелкие кардиомиоциты центральной части САУ лишены натриевых ионных каналов $Nav_{1.5}$ и ионного тока I_{Na} , тогда как в периферических пейсмекерных кардиомиоцитах эти каналы и ток обнаруживаются. Одной из причин возрастания времени восстановления функции при увеличении частоты электрической стимуляции САУ является повышение цитоплазматической концентрации ионов Na^+ ($[Na^+]_i$) в кардиомиоцитах периферии в результате индукции в них электрически вызванных ПД. Повышение $[Na^+]_i$ тем больше, чем выше частота стимуляции и частота электрически вызванных ПД, поскольку каждый ПД сопровождается поступлением Na^+ в цитоплазму. Увеличение $[Na^+]_i$ приводит к стимуляции Na/K-АТФазы, гиперполяризации мембраны, снижению скорости медленной диастолической деполяризации и торможению спонтанной активности в электрически сопряженных пейсмекерных кардиомиоцитах центральной части САУ. Гиперполяризующее действие периферических кардиомиоцитов сопровождается снижением скорости проведения возбуждения из центральной части САУ к его периферии и может приводить к подавлению спонтанной активности на период времени, соответствующий длительности нескольких спонтанных кардиоциклов. Особенно сильно этот эффект может быть выражен в тех случаях, когда патология приводит к электрическому ремоделированию ткани предсердия и САУ. Известно, что увеличение количества соединительной ткани при фиброзе сопровождается так называемым тахи-бради синдромом – формой дисфункции, при которой САУ на несколько кардиоциклов теряет способность к активации и возбуждению рабочего миокарда. Причиной тахи-бради синдрома может быть гиперполяризация и подавление проведения возбуждения по отдельным проводящим «коридорам» в соединительной ткани между САУ и рабочим миокардом. Роль α_1 -АР в САУ может заключаться в уменьшении

гиперполяризирующего влияния периферии на пейсмекерные кардиомиоциты центральной части САУ и в поддержании проведения возбуждения в переходной зоне между тканью, генерирующей ритм, и рабочим миокардом предсердий при высокой ЧСС.

5.3. Эффекты активации α_1 -адренорецепторов в АВУ и их физиологическая роль в функционировании сердечно-сосудистой системы

В работе также впервые детально изучены эффекты стимуляции α_1 -АР в атриовентрикулярном узле и показано, что эти эффекты, вероятно, являются аритмогенными (Рисунок 49). В настоящее время известно, что АВУ, или иначе АВ-соединение, млекопитающих животных, включая человека, является крайне сложно организованной тканевой и клеточной структурой, в которой выделяют отделы, образованные кардиомиоцитами с разным электрофизиологическим фенотипом. Отдельные клеточные группы в пределах АВУ имеют разную степень электрической сопряженности по причине разного уровня и набора экспрессируемых коннексинов. Известно, что центральная часть АВУ имеет наименьшую электрическую сопряженность кардиомиоцитов, наименьшую плотность деполяризирующих токов, что является одной из причин низкой скорости проведения волны возбуждения, пассивного (электротонического) способа передачи возбуждения и является механизмом формирования «нормальной» (физиологической) атриовентрикулярной задержки.

Вследствие высокой тканевой (структурной) и электрофизиологической (функциональной) гетерогенности, АВУ является крайне уязвимым участком проводящей системы сердца. Небольшие или разнонаправленные изменения мембранного потенциала в отдельных участках АВУ могут приводить к нарушению проведения в атриовентрикулярном соединении [Markowitz, Lerman, 2018], невозбудимости в центральной части или невозможности передачи возбуждения на границе ткани АВУ и ткани желудочковой проводящей системы. Так, избыточная гиперполяризация будет приводить к функциональной «невозбудимости» и блоку проведения возбуждения, в первую очередь, в центральной части атриовентрикулярного соединения, так как в ней нет натриевых каналов Nav1.5, и, в целом, плотность деполяризирующих токов низка [Abramochkin и др., 2022]. Напротив, избыточная деполяризация будет приводить к невозбудимости и невозможности проведения возбуждения на периферии атриовентрикулярного соединения за счет инактивации натриевых каналов Nav1.5.

В наших экспериментах активация α_1 -АР в АВУ вызывает негативный дромотропный эффект: увеличивает длительность АВЗ и ЭРП АВУ, способствует

возникновению нестационарных режимов проведения и блоков проведения возбуждения вероятно за счет усиления функциональной гетерогенности ткани. При стимуляции α_1 -АР также уменьшается диапазон ЧСС, в котором АВУ способен передавать возбуждение к желудочковой проводящей системе. То есть, при действии активации α_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 β -АР при увеличении симпатического тонуса способствует уменьшению длительности АВЗ, что адаптирует работу АВУ к высокой частоте. Следовательно, в АВУ α_1 -АР и β -АР функционируют антагонистично β -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. В свою очередь, при чрезмерной экспрессии α_1 -АР их активация будет способствовать возникновению блоков атриовентрикулярного проведения и атриовентрикулярных аритмий, особенно после длительных периоды высокой ЧСС, когда развивается десенситизация β -АР.

Таким образом, смещение баланса адренергического «сигналинга» от преимущественно β -адренергического к преимущественно α_1 -адренергическому, которое, например, может происходить при гипертрофических изменениях в сердце, способствует повышению аритмогенности АВУ.

5.4. 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. Среди P2X-рецепторов в САУ по сравнению с рабочим предсердным миокардом (левое предсердие) 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. Исходя из сведений об отсутствии гена рецептора P2Y11 у крыс Wistar следует, что в атриовентрикулярном соединении экспрессируются все возможные (7 из 8 известных) подтипы P2Y-рецепторов. Таким образом, многообразие P2Y-рецепторов больше в атриовентрикулярном, чем в синоатриальном узле. Это наблюдение соответствует

представлениям о большей тканевой и электрофизиологической гетерогенности АВУ, чем САУ. Исходя из наших результатов, пуринергическая регуляция функционирования структур для АВУ является более сложной, чем для САУ.

Активация симпатических постганглионарных окончаний помимо выделения НА сопровождается высвобождением различных комедиаторов, в первую очередь – пуриновых нуклеотидов. В данной работе были изучены мишени и возможные молекулярные механизмы, обуславливающие влияние пуриновых комедиаторов, в частности АТФ, на проводящую систему сердца.

Известно, что внеклеточный АТФ является эндогенным агонистом пуриновых P2-рецепторов. В наших экспериментах АТФ приводил к снижению ритма сердца как у крыс *in vivo*, так и в изолированном сердце и тканевых препаратах. Эффекты АТФ как в САУ, так и в рабочем миокарде предсердий и желудочков, могут быть опосредованы активацией окончаний внутрисердечных сенсорных афферентов, а не кардиомиоцитов, с последующей центральной активацией симпатических или парасимпатических постганглионаров. Например, вызванное АТФ снижение ЧСС, наблюдаемое *in vivo*, может быть обусловлено повышением активности блуждающего нерва и М-холинорецепторов ритмоводителя. Однако вызванное АТФ снижение ЧСС или частоты СПД сохраняется при действии атропина, антагониста М-холинорецепторов. Эффект АТФ сохраняется и в присутствии атенолола, антагониста β -АР. Снижение ЧСС не может быть также обусловлено α_1 -АР, так как их активация приводит к увеличению частоты СПД в САУ. Таким образом, 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.

Как указано выше, P2X-рецепторы представляют собой рецепторы-ионные каналы, активация которых приводит к формированию входящего деполяризующего катионного тока. Следовательно, активация P2X-рецепторов будет способствовать ускорению МДД, сдвигу ПП в сторону менее электронегативных значений, усилению автоматии САУ и увеличению ЧСС *in vivo*. Тем не менее, при действии АТФ как у крыс *in vivo*, так и в экспериментах с изолированным сердцем мы видим подавление пейсмекерной функции как в САУ, так и в АВУ. Наши результаты позволяют заключить, что преобладающий негативный хронотропный эффект АТФ не связан с активацией P2X-типа, но опосредуется рецепторами P2Y-типа, которые являются G-белок сопряженными рецепторами.

Как указано выше, в САУ обнаруживается значимое количество транскриптов пяти P2Y-рецепторов (P2Y1, P2Y2, P2Y6, P2Y12 и P2Y14). Среди вышеперечисленных рецепторов P2Y1, P2Y2 и P2Y6 являются рецепторами, сопряженными с G_q-белком, а P2Y12 и P2Y14 – рецепторами, сопряженными с G_s-белком. Все P2Y-рецепторы могут быть активированы АТФ, однако для некоторых из них АТФ имеет очень низкую аффинность, а преимущественными эндогенными агонистами, демонстрирующими высокое сродство, являются другие пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды. Так, для рецепторов P2Y1 эндогенными агонистами являются АДФ и АТФ, для P2Y2 – УТФ и АТФ, для P2Y6 – УДФ, для P2Y12 – АДФ, для P2Y14 – УДФ-глюкоза и УМФ.

Агонист P2Y12- и P2Y1-рецепторов АДФ не оказывает сколь либо заметного влияния на ритм сердца у крыс *in vivo*. Также агонист P2Y6-рецепторов УДФ не приводит к изменению ЧСС. Как указано выше, P2Y6- и P2Y14-рецепторы сопряжены с G_s-белком, и их активация способствует накоплению цАМФ, что не может приводить к подавлению автоматии САУ и снижению ЧСС. Небольшое снижение ЧСС при действии УМФ может быть обусловлено стимуляцией этим агонистом незначительно экспрессируемых в сердце крысы рецепторов А1-типа («аденозиновые» рецепторы). Таким образом, маловероятно, что P2Y1, P2Y6, как и P2Y12 с P2Y14 являются участниками АТФ-зависимых механизмов контроля автоматии САУ. Следует отметить, что на основе данных секвенирования тканевых образцов нельзя утверждать, что все типы P2Y-рецепторов экспрессируются непосредственно кардиомиоцитами. Часть из них, например «АДФ-чувствительные» P2Y1, P2Y12, могут являться рецепторами либо нервных окончаний либо других немиокардиальных клеток. По совокупности данных об экспрессии P2Y-рецепторов в САУ 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 являются P2Y2-рецепторы.

Следует отметить также, что эффекты активации пуриновых рецепторов в САУ антагонистичны эффектам активации α₁-АР. Однако, в АВУ при действии АТФ наблюдаются эффекты, схожие с эффектами активации α₁-АР (Рисунок 49). АТФ приводит к увеличению длительности АВЗ, что в конечном итоге вызывает подавление проведения возбуждения в АВУ вплоть до возникновения блоков проведения. Кроме того, АТФ вызывает выраженную гиперполяризацию АВ-соединения, что также сопровождается изменением конфигурации ПД и уменьшением их длительности. Таким образом, в

синавтриальном узле АТФ подавляет автоматию, а в атриовентрикулярном узле – его способность к проведению возбуждения.

Эффекты АТФ в АВУ, наблюдаемые *in vivo*, сохраняются и при двойной автономной блокаде. Таким образом, по меньшей мере у крысы, нарушение проведения возбуждения в АВУ при действии АТФ связано не только с активацией сенсорных окончаний и центрально опосредованной активацией холинорецепторов или β -адренорецепторов АВ-узловых кардиомиоцитов.

В связи с многообразием экспрессируемых в АВУ P2Y-рецепторов, сложно установить, какой из них является основным посредником негативного дромотропного действия АТФ. Проблема с идентификацией основного «игрока» осложняется тем, что к блокам проведения возбуждения в атриовентрикулярном соединении может приводить к накоплению внутриклеточного Ca^{2+} , цАМФ, а также к усилению цАМФ-регулируемой проводимости в результате активации рецепторов, сопряженных с G_s -белками (P2Y12 и P2Y14).

Тем не менее, аналогично САУ, агонист P2Y1-, P2Y12- и P2Y13-рецепторов АДФ и агонист P2Y6-рецепторов УДФ не вызывают заметных эффектов и не индуцируют блоков проведения возбуждения в АВУ. Выраженность нарушений атриовентрикулярного проведения при действии УМФ значительно ниже по сравнению с эффектами АТФ, что делает вовлеченность P2Y14-рецепторов маловероятной. Так как АТФ блокирует P2Y4-рецептор, то наиболее вероятным посредником АТФ в АВУ, как и в САУ, является рецептор P2Y2.

Поскольку α_1 -АР и P2Y2-рецепторы являются рецепторами, сопряженными с G_q -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 α_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.

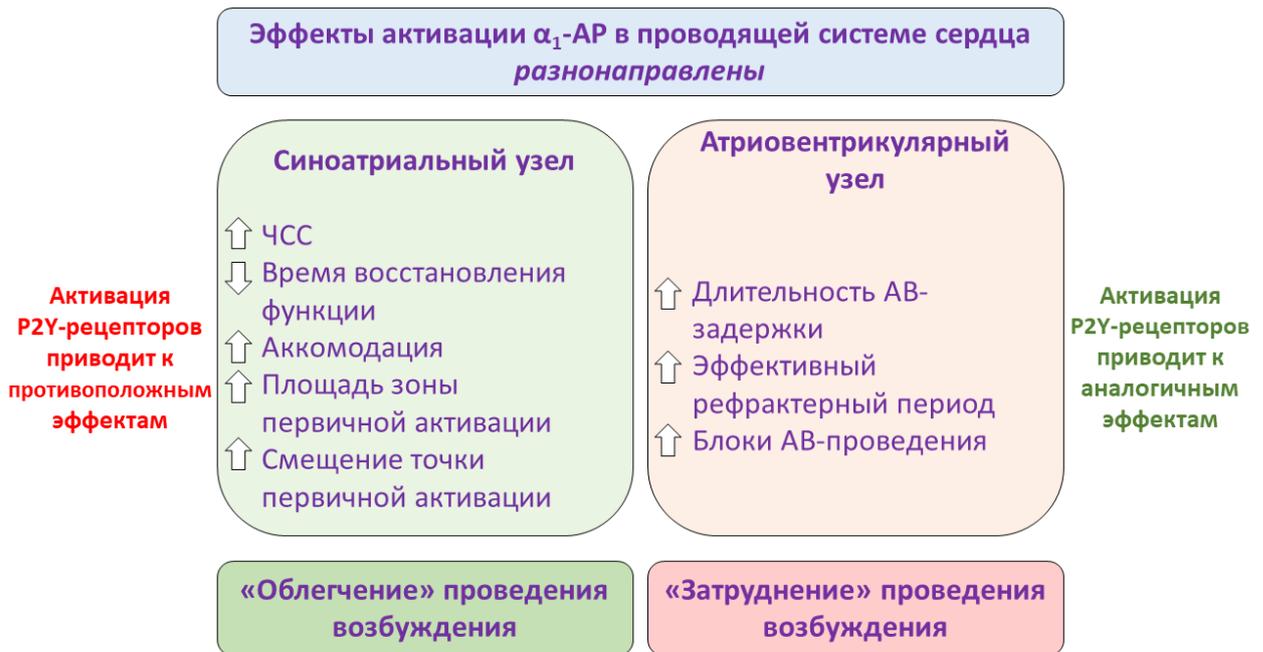


Рисунок 49. Схема, обобщающая эффекты активации α_1 -АР и пуриновых P2-рецепторов в проводящей системе сердца.

5.5. Вероятные механизмы, опосредующие эффекты активации α_{1A} -адренорецепторов в проводящей системе сердца

Известно, что α_1 -АР посредством внутриклеточного сигнального каскада $G_q/PLC/IP_3$ приводят к увеличению $[Ca^{2+}]_i$ и активации протеинкиназ семейства «С» [Motiejunaite, Amar, Vidal-Petiot, 2021]. В наших экспериментах установлено, что блокада протеинкиназы С не приводит к подавлению эффектов α_1 -АР в САУ, то есть не отменяет увеличение ЧСС, а также снижения времени восстановления функции синусного узла, вызванного активацией α_1 -АР. Вероятно, РКС не вовлечена в α_1 -адренергическую регуляцию функциональной активности САУ, либо вклад активация РКС является незначительным на фоне других механизмов.

Следует отметить, что внутриклеточные сигнальные каскады и ионные механизмы, лежащие в основе феноменов, наблюдаемых при активации α_1 -АР в гладкой мускулатуре стенки сосудов, исследованы в значительной степени. Известно, что деполяризация и увеличение тонуса гладкомышечных клеток, приводящие к вазоконстрикции, при активации α_1 -АР обусловлены увеличением $[Ca^{2+}]_i$, активацией хлорных каналов разного типа и увеличением хлорной проводимости [Gould, Hill, 1996; Lamb, Kooy, Lewis, 2000].

Следует, однако, отметить, что усиление «хлорной» (т.е. хлорид-анионной) проводимости может приводить как к гиперполяризации, так и к деполяризации.

Направление смещения мембранного потенциала при усилении хлорной проводимости обусловлено соотношением текущего значения мембранного потенциала и равновесного потенциала для анионов хлора. Таким образом, усиление хлорной проводимости может приводить к противоположным физиологическим эффектам, например, к усилению или подавлению возбудимости нейронов, к увеличению или снижению тонуса ГМК. Данное предположение может быть справедливо для кардиомиоцитов, лишенных выраженной стабилизации потенциала покоя, таких как кардиомиоциты синоатриального узла, атриовентрикулярного узла или волокон Пуркинье. В частности, в кардиомиоцитах САУ увеличение хлорной проводимости может как облегчать пейсмекерную функцию, так и подавлять ее.

Согласно достаточно разнящимся литературным данным, $[Cl^-]_i$ для кардиомиоцитов может лежать в диапазоне от 5-15 ммоль/л. Известно, что в кардиомиоцитах центральной части САУ человека и других млекопитающих МДП лежит в диапазоне от -68 до -55 мВ. В таком случае, исходя из $[Cl^-]_{out} = 110$ mM, согласно уравнению Нернста, E_{Cl} может быть равным или негативным относительно максимального (т.е. наибольшего по модулю) диастолического потенциала (МДП), наблюдаемого в САУ. Таким образом, в пейсмекерных кардиомиоцитах I_{Cl} должен являться выходящим и реполяризирующим при всех значениях мембранного потенциала. Основываясь на литературных данных следует заключить, что I_{Cl} пейсмекерных кардиомиоцитов должен способствовать снижению скорости медленной диастолической деполяризации (МДД), но ускорению реполяризации ПД.

Следует также отметить, что $[Cl^-]_i$ в «рабочих» кардиомиоцитах и кардиомиоцитах САУ может существенно различаться. 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 mM), чем в рабочем предсердном миокарде (4,7 mM). Следовательно, E_{Cl} для САУ будет существенно менее электроотрицательным, чем для предсердного миокарда.

Ранее показано, что концентрация анионов хлора в плазме крови животных различных видов может существенно варьировать. Кроме того, $[Cl^-]_o$ может колебаться для различных тканей. Для самцов взрослых крыс $[Cl^-]_o$ в плазме крови ниже, чем у человека и составляет 98 mM [Chapp et al., 2018]. Исходя из этих данных 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 кардиомиоцитов АВУ $[Cl^-]_i$ остается неизвестным. Как указано выше, кардиомиоциты АВУ являются крайне гетерогенными и, возможно, МДП и ПП этих клеток колеблется в большом диапазоне. Таким образом, сложно предсказать, будет ли увеличение хлорной проводимости приводить к деполяризации или гиперполяризации в АВУ. Важно то, что оба этих сдвига МП, как указано выше, могут подавлять проведение возбуждения в атриовентрикулярном соединении.

5.6. 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 α_1 -адренергических эффектов в ГМК и кардиомиоцитах имеет структурное обоснование [Duan, 2013] и делает логичным оценку экспрессии генов хлорных каналов в ритмоводителе и проводящей системе сердца. Данные этого раздела изложены в статье [Воронина, Кархов, Кузьмин, 2024].

Роль хлорных каналов ClC-2 в кардиомиоцитах проводящей системы сердца

В представленной работе впервые был установлен уровень экспрессии генов, кодирующих трансмембранные хлорные ионные каналы в проводящей системе сердца. В САУ относительный уровень мРНК канала ClC-2, который является молекулярным субстратом активируемого гиперполяризацией хлорного тока входящего выпрямления $I_{Cl,ir}$, значительно превышает этот уровень в АВУ и рабочем миокарде.

Установлено, что ионный ток, опосредуемый каналами ClC-2, играет важную роль в поддержании пейсмекерной активности САУ морской свинки наряду с «классическими» пейсмекерными токами (I_f , I_{NCX}) [Huang и др., 2009]. При значениях МП более отрицательных, чем E_{Cl} , открытие каналов ClC-2 приводит к формированию деполяризующего (иначе «входящего», исходя из направления переноса заряда) тока (Рисунок 50 Б), ускорению МДД и деполяризации. Однако в результате аномального выпрямления, характерного для каналов ClC-2, выходящая реполяризующая компонента $I_{Cl,ir}$ при значениях МП положительнее E_{Cl} оказывается мала и практически не влияет на

конфигурацию пейсмекерных ПД. Таким образом, $I_{Cl,ir}$ способствует только деполяризации (Рисунок 51 В-Г). В том случае когда в пейсмекерных кардиомиоцитах происходит увеличение $[Cl^-]_i$, E_{Cl} для этих клеток оказывается существенно позитивнее максимального диастолического потенциала и может быть позитивнее порога ПД (-45 мВ) [Huang и др., 2009]. Поэтому деполяризирующая (входящая) компонента $I_{Cl,ir}$ может увеличивать не только скорость МДД, приводя к более быстрому достижению порогового потенциала, но и скорость фронта ПД.

У мышей, нокаутных по *Cln2*, повышается вероятность возникновения блоков проведения в АВУ по сравнению с мышами дикого типа. Возможно, что стимуляция каналов *ClC-2* при активации сигнального каскада β -АР/АЦ/РКА является одним из механизмов увеличения ЧСС, контроля длительности АВ-задержки и предотвращения АВ-блоков проведения [Cuppoletti и др., 2004; Fritsch, Edelman, 1996; Hansen и др., 2020; Sherry и др., 1997].

Возможно, что *ClC-2*/ $I_{Cl,ir}$ вносят существенный вклад в автоматию САУ не только мышей, но и других млекопитающих, включая человека. Однако, значительной проблемой в исследовании свойств и роли *ClC-2*, в том числе в проводящей системе сердца, является отсутствие их низкомолекулярных лигандов с высоким сродством и избирательностью [Jentsch, Pusch, 2018].

Роль хлорных каналов LRRC8 в кардиомиоцитах проводящей системы сердца

В САУ обнаруживается больший по сравнению с левым предсердием и АВУ уровень мРНК объем-чувствительных хлорных каналов и переносчиков *ClC-3* и *LRRC8A*. К настоящему времени известно, что канал *LRRC8* является основным молекулярным субстратом тока $I_{Cl,vol}$, а его необходимой субъединицей является *LRRC8A*. $I_{Cl,vol}$ демонстрирует свойства тока выходящего выпрямления, близкого к Гольдмановскому (Рисунок 50 Г). Повышение $[Ca^{2+}]_i$ способствует увеличению проводимости *VRAC* при всех значениях МП. Проводимость *VRAC*/*LRRC8* также может модулироваться пуриновыми P2-рецепторами [Fisher и др., 2008].

Имеющиеся данные об эффектах тока $I_{Cl,vol}$, формируемого каналами *LRRC8*, весьма противоречивы и неполны. С одной стороны, предполагается, что в нормальных условиях ток $I_{Cl,vol}$ невелик или отсутствует вовсе, однако сильно возрастает при растяжении клеточной мембраны или при помещении клеток в гипоосмотический раствор [Duan, 2013]. В некоторых работах утверждается что $I_{Cl,vol}$ критически важен для стабилизации ПП [Seiyama, 1979]. Кроме того показано, что в рабочем миокарде кролика и собаки активация

$I_{Cl, vol}$ приводит к деполяризации, уменьшению длительности ПД [Duan, 2009] и, соответственно, укорочению периодов рефрактерности, что может способствовать возникновению контуров циркуляции возбуждения (re-entry), а также индукции фибрилляции предсердий или желудочков (Рисунок 51 А). Имеются данные, что $I_{Cl, vol}$ предотвращает увеличение длительности фазы плато ПД, обусловленное усилением кальциевого тока $I_{Ca,L}$ при стимуляции β -АР [Duan et al., 2005].

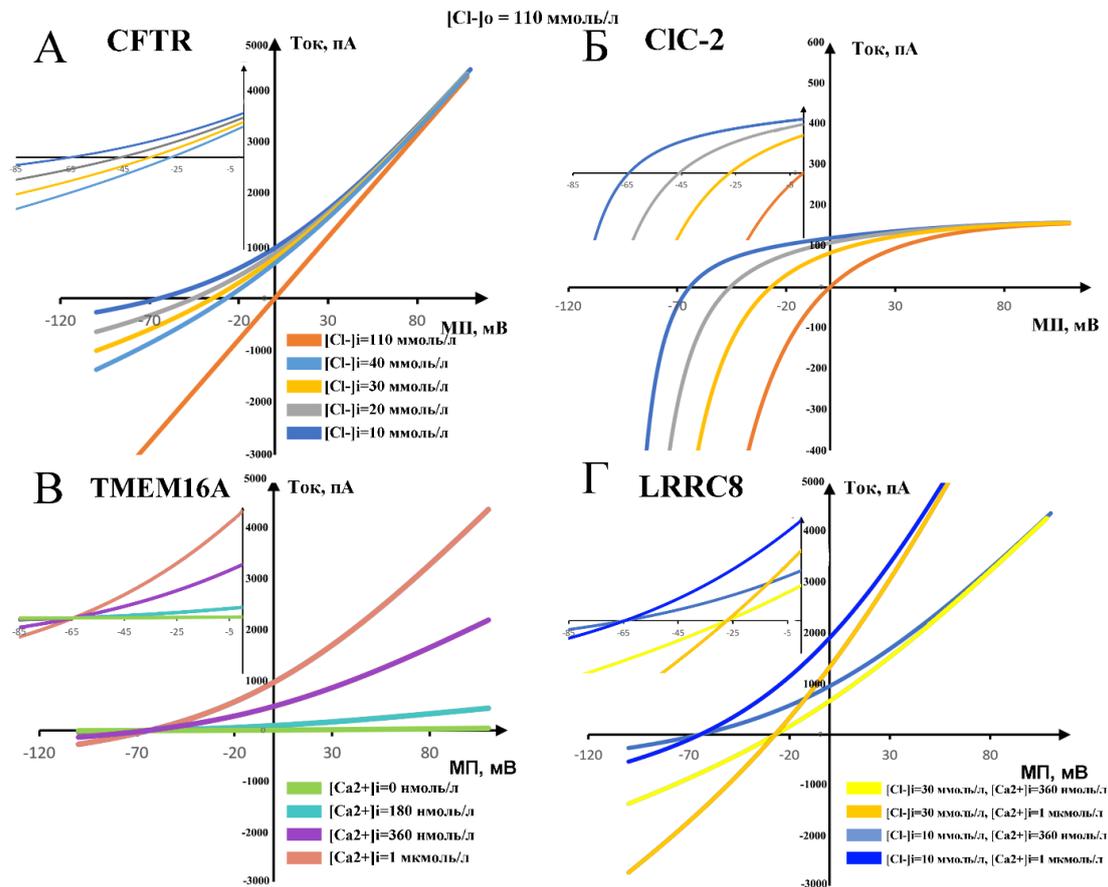


Рисунок 50. Вольт-амперные характеристики основных хлорных (анионных) токов клеток миокарда при различных концентрациях внутриклеточного Cl^- ($[Cl^-]_i$) и внутриклеточного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$). На вставках представлен увеличенный участок вольт-амперных характеристик с точками пересечения кривых с осью X, что соответствует равновесному хлорному потенциалу. А – РКА-зависимый хлорный ток, формируемый каналом CFTR. Б – Хлорный ток аномального выпрямления, формируемый каналом ClC-2. В – Ca^{2+} -зависимый хлорный ток, формируемый каналом TMEM16A. Г – Объем-регулируемый хлорный ток, формируемый каналом LRRC8. Внеклеточная концентрация Cl^- ($[Cl^-]_o$) составляет 110 ммоль/л. Модельные кривые построены с использованием уравнения Гольдмана-Ходжкина-Катца (ГХК) для трансмембранного ионного тока (Hille 2001, Ion channels of excitable membranes p. 445). Модельные кривые для ионных токов демонстрирующие потенциал-зависимость и/или кальций-зависимость получены перемножением ГХК на равновесную вероятность пребывания канала в открытом состоянии (при определенном V_m) или коэффициент, пропорциональный $[Ca^{2+}]_i$. Диапазон, ограниченный кривыми для 10 и 40 ммоль/л $[Cl^-]_i$, соответствует возможным

величинам ионного тока, потенциально достигаемым в кардиомиоцитах различных отделов сердца.

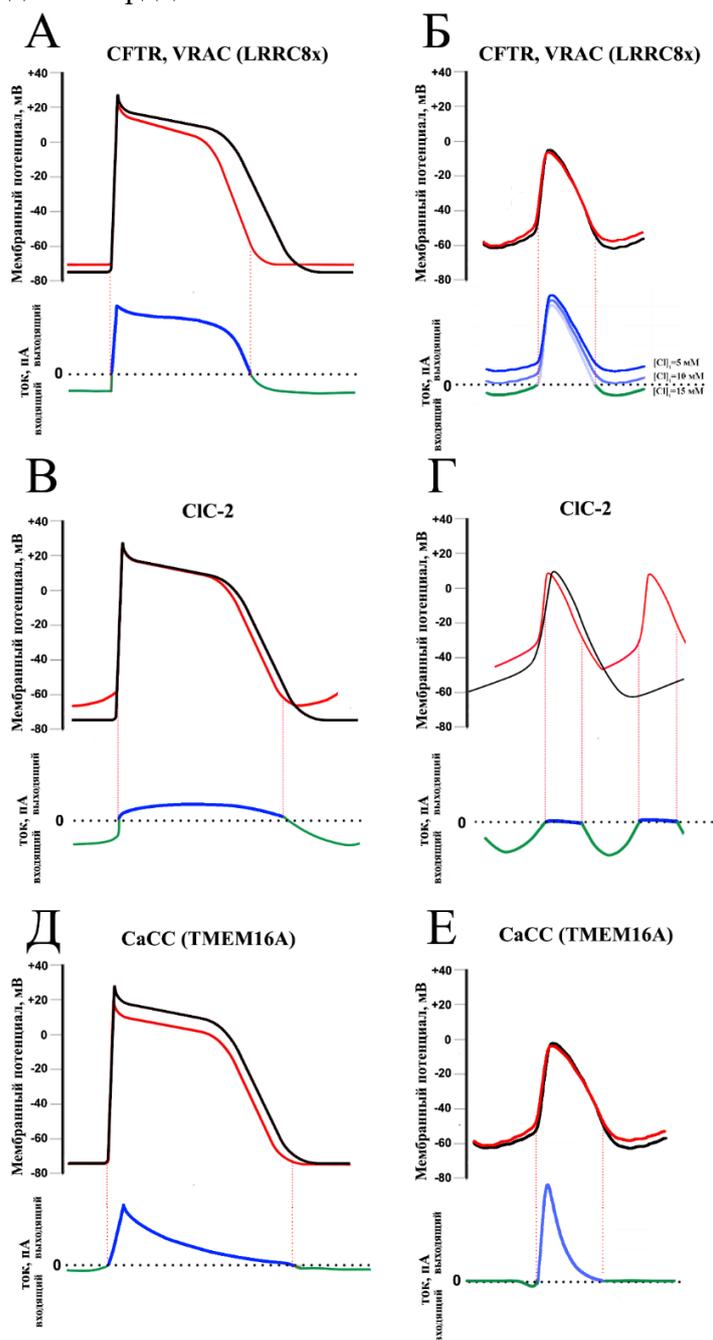


Рисунок 51. Верхние панели – изменение конфигурации потенциала действия кардиомиоцитов рабочего (слева) и пейсмекерного (справа) миокарда при активации хлорных каналов. Черный цвет – потенциал действия в контроле, красный цвет – потенциал действия при активации разных типов хлорных каналов – CFTR (А-Б), LRRC8x (А-Б), CIC-2 (В-Г), TMEM16A (Д-Е). Нижние панели – изменение хлорного тока через разные хлорные каналы в зависимости от мембранного потенциала в ходе потенциала действия кардиомиоцитов рабочего (слева) и пейсмекерного (справа) миокарда – CFTR (А-Б), LRRC8x (А-Б), CIC-2 (В-Г), TMEM16A (Д-Е). Зеленый цвет – входящий ток (ионы хлора выходят из клетки), синий цвет – выходящий ток (ионы хлора входят в клетку). На панели А входящая и выходящая компонента тока показана для трех значений $[Cl^-]_i$; поскольку эта величина может различаться для центральной и периферической частей

гетерогенной ткани САУ, что обуславливает различные электрофизиологические эффекты.

Поскольку $I_{Cl, vol}$ был обнаружен в пейсмекерных клетках, то предполагается, что он играет значительную роль не только в функционировании рабочего миокарда, но и в реализации пейсмекерной функции САУ и АВУ. Эффекты $I_{Cl, vol}$ в САУ, как и для других токов, будут сильно зависеть от $[Cl^-]_i$, а также от $[Ca^{2+}]_i$ (Рисунок 50 Г). На основе теоретических расчетов можно заключить, что при высоких значениях $[Cl^-]_i$ ток, формируемый LRRC8, будет иметь деполяризующую входящую компоненту, способствующую увеличению скорости МДД и автоматии САУ (Рисунок 51 Б).

В наших экспериментах блокатор хлорной проводимости DCPiB, который преимущественно влияет на чувствительные к изменению объема хлорные каналы LRRC, приводит к подавлению пейсмекерной функции как САУ, так и АВУ. DCPiB вызывает снижение спонтанного ритма САУ, а также увеличивает время его восстановления. Эффекты DCPiB на ритм ИС наиболее выражены при высокой частоте стимуляции. Эта особенность действия DCPiB позволяет предположить, что хлорная проводимость становится критически важна для реализации пейсмекерной функции синоатриальным узлом при высоком ритме, то есть при усилении гиперполяризующего влияние периферии вследствие загрузки кардиомиоцитов Na^+ и активации Na^+/K^+ -АТФазы.

В наших экспериментах DCPiB вызывал изменение паттерна активации САУ, приводя к смещению точки первичной активации и уменьшению площади зоны первичной активации. При действии DCPiB в АВУ наблюдается увеличение ЭРП, а также уменьшение доли блоков проведения в АВ-соединении. 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 хлорных каналов TMEM16A в кардиомиоцитах проводящей системы сердца

В работе впервые показано, что как в САУ, так и в АВУ обнаруживается мРНК кальций-чувствительного хлорного канала TMEM16A, молекулярного субстрата хлорного тока $I_{Cl, Ca}$, который демонстрирует свойства тока выходящего выпрямления (Рисунок 50 В). Согласно данным РНК-секвенирования, в САУ по сравнению с рабочим миокардом левого предсердия уровень транскриптов TMEM16A значительно выше. Считается, что кальций-зависимая компонента тока I_{to} ($I_{to,2}$) формируется сложным канальным комплексом, в котором TMEM16A является порообразующей субъединицей.

В экспериментах с гетерологическими системами для TMEM16A показана коэкспрессия с пуриновыми рецепторами, активация которых приводит к усилению $I_{Cl,Ca}$ [Pedemonte, Galietta, 2014]. Кроме того, при взаимодействии CaCC/TMEM16A с рецепторами инозитол-1,4,5-трифосфата (IP_3R) СПР также наблюдается усиление $I_{Cl,Ca}$ [Jin и др., 2013].

В пейсмекерных кардиомиоцитах повышение $[Ca^{2+}]_i$ предшествует фазе деполяризации. Важно, что рост $[Ca^{2+}]_i$ происходит в период, когда в ходе МДД значения МП негативнее E_{Cl} . В таком случае, активация CaCC/TMEM16A будет приводить к усилению входящей компоненты $I_{to,2}$ ($I_{Cl,Ca}$) и способствовать деполяризации, ускорению конечной (нелинейной) фазы МДД и усилению автоматии САУ (Рисунок 50 В). С другой стороны, медленный спад $[Ca^{2+}]_i$ (Рисунок 51 Е) в пейсмекерных кардиомиоцитах может приводить к большему влиянию $I_{to,2}$ ($I_{Cl,Ca}$) на конфигурацию ПД в САУ, чем в миокарде предсердий желудочков.

В наших экспериментах NPPB, который преимущественно является блокатором CaCC/TMEM16A и CFTR, приводит к подавлению пейсмекерной функции САУ и не оказывает статистически значимого влияния на проведение возбуждения в АВУ. NPPB оказывает наибольшее влияние на ритм, генерируемый САУ, и время его восстановления в высокой частоте стимуляции. Кроме того, NPPB приводит к уменьшению площади зоны первичной активации и формированию невозбудимой зоны в области, где в контрольных условиях располагается точка первичной активации. Селективный блокатор кальций-чувствительных хлорных каналов MONNA также вызывает подавление пейсмекерной функции САУ, что проявляется в снижении частоты сокращений ИС и увеличении времени восстановления функции САУ.

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.

Роль хлорных каналов CFTR в кардиомиоцитах проводящей системы сердца

Анализ экспрессии канала CFTR, опосредующего РКА-зависимый хлорный ток ($I_{Cl,RKA}$), с использованием данных РНК-секвенирования показал, что каналы CFTR в большом количестве обнаруживаются в кардиомиоцитах человека (<https://www.proteinatlas.org/>). Зависимость величины тока, текущего через CFTR, от мембранного потенциала (вольт-амперная характеристика) близка к Гольдмановской (Рисунок 50 А). CFTR может взаимодействовать со многими мембранными белками,

которые прямо или косвенно влияют на функцию других ионных каналов и транспортеров, а также с другими хлорными каналами, например, CaCC или VRAC [Kunzelmann, 2001].

Известно, что в САУ высок базальный уровень активности РКА. В связи с этим, CFTR/I_{Cl,PKA} должны оказывать существенное влияние на работу пейсмекера, которое может выражаться как в облегчении, так и в подавлении автоматии, в зависимости от уровня [Cl⁻]_i (Рисунок 51 Б). В литературе отсутствуют сведения об эффектах CFTR/I_{Cl,PKA} в пейсмекерном миокарде.

В наших экспериментах 9-АС, который преимущественно является блокатором CFTR, подавляет пейсмекерную функцию САУ, но способствует проведению возбуждения в АВУ. 9-АС приводит к уменьшению частоты сердечных сокращений и увеличению времени восстановления функции САУ, а также к подавлению выхода возбуждения из центральной части САУ. В АВУ 9-АС приводит к уменьшению длительности АВЗ и уменьшению доли блоков в АВУ по сравнению с контрольными значениями, что может способствовать пейсмекерной функции АВУ.

Однако, как по данным РНК-секвенирования, так и по данным РВ-ПЦР в предсердном рабочем миокарде и в структурах проводящей системы сердца (САУ и АВУ) крысы CFTR на уровне мРНК не обнаруживается.

Роль катион-хлорных котранспортеров кардиомиоцитах в проводящей системе сердца

В представленной работе впервые в проводящей системе сердца была выявлена экспрессия генов, кодирующих хлор-катионные котранспортеры KCC1 и NKCC1. Относительный уровень мРНК транспортера KCC1, который отвечает за перенос ионов калия и хлора во внеклеточное пространство, в САУ значительно выше по сравнению с рабочим миокардом и АВУ. Транспортер NKCC1, переносящий ионы натрия, калия и хлора внутрь клетки из внеклеточного пространства, также обнаруживается как в левом предсердии, так и в элементах проводящей системы сердца.

KCC и NKCC реципрокно влияют на [Cl⁻]_i (Рисунок 52). Хорошо установлено, что блокирование NKCC приводит к снижению [Cl⁻]_i, тогда как подавление активности KCC приводит к увеличению [Cl⁻]_i как в кардиомиоцитах, так и других тканях [Orlov и др., 2014]. Известно, что баланс активности NKCC и KCC, а соответственно и «установочная точка» для [Cl⁻]_i, изменяются в миокарде в ходе онтогенеза, а также при развитии патологий. Таким образом, изменение уровня экспрессии и/или работы переносчиков

хлора обязательно будет приводить к изменению E_{Cl} , характеристик хлорных токов, и оказывать влияние на биоэлектрическую активность кардиомиоцитов разных отделов сердца.

Интенсивность переноса хлора КСС и НКСС в рабочих и пейсмекерных кардиомиоцитах будет определяться, при прочих равных условиях, соотношением продолжительности пребывания кардиомиоцитов в покое и деполяризованном состоянии, а также уровнем потенциала покоя (Рисунок 52). Например, КСС является электронейтральным переносчиком, то есть суммарный переносимый им заряд и трансмембранный ток является нулевым. Однако интенсивность переноса пары ионов K^+ и Cl^- (сумма разнонаправленных токов) во внеклеточную среду посредством КСС будет тем больше, чем положительнее будет мембранный потенциал. Иными словами, выведение анионов хлора из цитоплазмы происходит эффективнее не при ПП, а во время деполяризации кардиомиоцитов. В противоположность КСС, поступление Cl^- в цитоплазму кардиомиоцитов, опосредуемое НКСС, будет наибольшим при МП, близком к ПП, а наименьшим при МП, близком к значениям, соответствующим овершуту ПД. Поэтому, КСС и НКСС в рабочих и пейсмекерных кардиомиоцитах даже при одинаковом уровне экспрессии будут приводить к установлению различных значений $[Cl^-]_i$, и E_{Cl} .

5.7. Роль трансмембранной хлорной ионной проводимости в реализации эффектов α_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). Поскольку активация G_q -сопряженных α_1 -АР несомненно приводит к повышению внутриклеточной концентрации кальция, в представленной работе была предпринята попытка выяснить влияние блокады именно кальций-чувствительных хлорных каналов ТМЕМ16А на эффекты активации α_1 -АР в САУ.

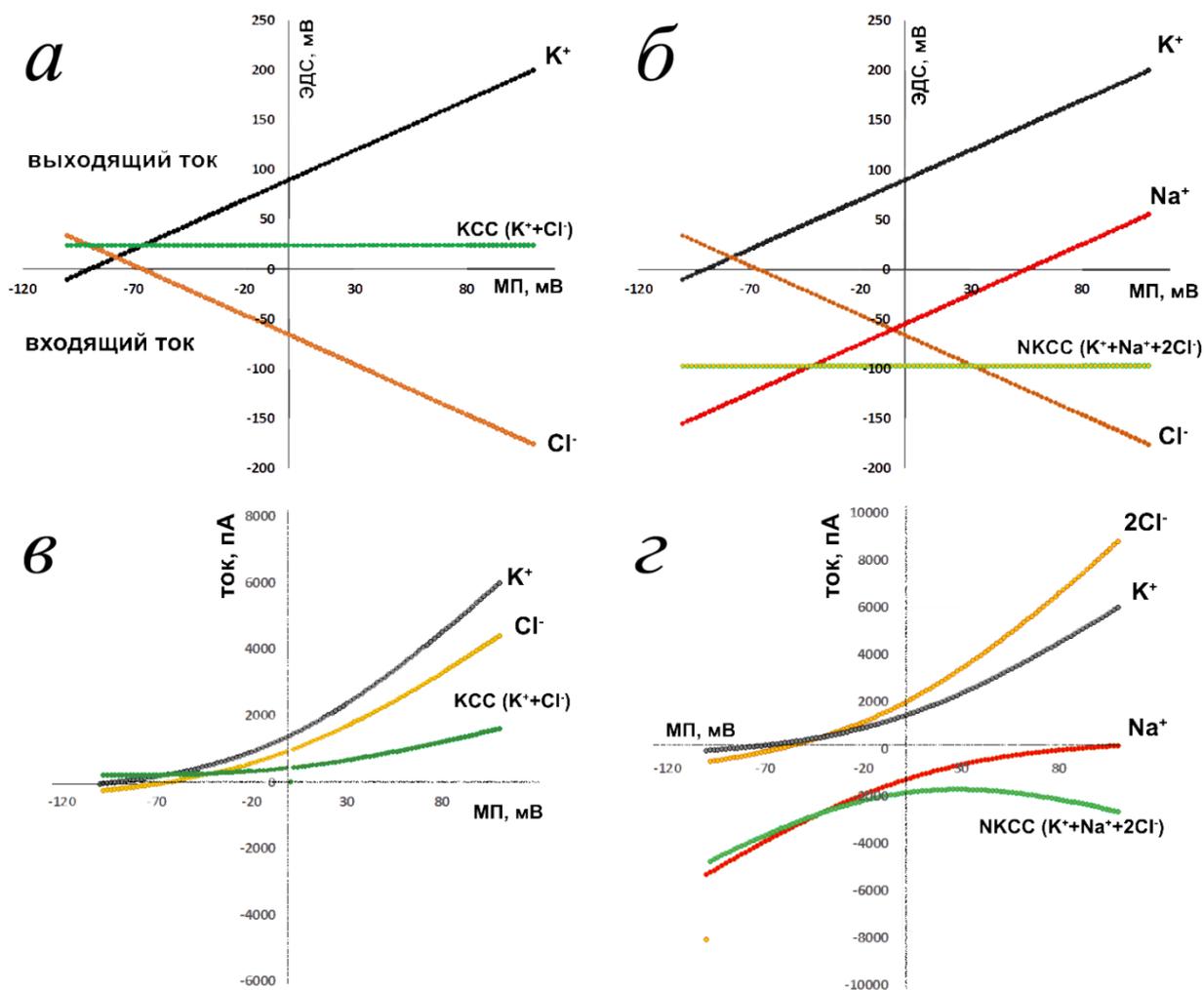


Рисунок 52. Электрические характеристики хлор-катионных котранспортеров. А – Зависимость электродвижущей силы (ЭДС) от мембранного потенциала (МП) для ионов калия, хлора и котранспортера КСС. Б – Зависимость электродвижущей силы (ЭДС) от мембранного потенциала (МП) для ионов натрия, калия, хлора и котранспортера НКСС. В – Вольт-амперная характеристика калиевого и хлорного токов, а также суммарного тока котранспортера КСС. Г – Вольт-амперная характеристика натриевого, калиевого и хлорного токов, а также суммарного тока котранспортера НКСС.

Блокада хлорной проводимости, в частности кальций-чувствительных хлорных каналов, приводила к подавлению эффектов ФЭ в синоатриальном узле, что проявлялось в увеличении скорректированного времени восстановления функции САУ. Важно, что при активации α_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 [Tapilina и др., 2010]. В

наших экспериментах с оптическим картированием электрической активности установлено, что NPPB действительно вызывает формирование невозбудимой зоны в САУ, а также предотвращает смещение точки первичной активации при стимуляции α_1 -АР в область миокарда, прилегающую к устью верхней полой вены.

Таким образом, последовательность событий, наблюдаемых при активации α_1 -АР САУ может включать повышение $[Ca^{2+}]_i$ и усиление деполяризующей компоненты трансмембранного хлорного тока, обусловленного Ca^{2+} -зависимыми хлорными каналами TMEM16A [Burashnikov, Antzelevitch, 1999]. 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. Как указано выше, увеличение ЧСС или частоты спонтанных ПД вызывает гиперполяризацию в результате активации Na/K-АТФазы. Возможно, что α_1 -АР-зависимое усиление хлорной проводимости предотвращает гиперполяризацию на периферии САУ или в областях миокарда, демонстрирующих свойства латентного пейсмекера, способствует облегчению проведения волны возбуждения от пейсмекерных кардиомиоцитов к рабочему миокарду при высокой ЧСС.

В данной работе с применением флуоресцентного подхода впервые показано, что активация α_1 -АР приводит к повышению уровня $[Cl^-]_i$ в ткани САУ, причем 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 TMEM16A. Можно предположить, что вызванное активацией α_1 -АР увеличение $[Cl^-]_i$, и ЧСС в САУ обусловлено реципрокной стимуляцией NKCC и подавлением KCC.

Исходя из наших данных, полученных в результате анализа экспрессии генов различных хлорных каналов в проводящей системе сердца, видно, что наибольший уровень мРНК в АБУ среди генов хлорных каналов характерен для объем-чувствительных каналов LRRC. Однако DCPIB, блокатор каналов LRRC, не оказывает влияния на эффекты стимуляции α_1 -АР в АБУ.

NPPB-подобный блокатор анионной проводимости пробенецид подавляет увеличение эффективного рефрактерного периода в АБУ, а также уменьшает величину осцилляций атриовентрикулярной задержки, вызванных стимуляцией α_1 -АР. Кроме того, пробенецид подавляет вызванные АТФ блоки атриовентрикулярного проведения. Эти

результаты, хоть и косвенно, но подтверждают роль хлорных каналов как конечных мишеней сигнальных каскадов G_q-сопряженных рецепторов (α_1 -АР, P2Y₂) АВ-узла.

Осцилляции длительности АВ-задержки обусловлены электрофизиологической гетерогенностью ткани АВУ и отражают, помимо прочего, переключение проводящих путей с разными свойствами в АВУ. Величина осцилляций атриовентрикулярной задержки характеризует вероятность того, что АВУ может стать источником аритмий. Уменьшая амплитуду осцилляций, пробенецид, вероятно, снижает функциональную гетерогенность ткани АВУ, увеличенную при стимуляции α -АР, а также способствует поддержанию активности «быстрых» внутриузловых проводящих путей. Эти эффекты пробенецида можно рассматривать как антиаритмические.

5.8. Влияние активации катион-хлорных котранспортеров на пейсмекерную функцию САУ

Некоторые из белковых структур, демонстрирующих хлорную проводимость, в частности катион-хлорные котранспортеры, обладают механочувствительностью и участвуют в регуляции клеточного объема. Механизмы регуляции клеточного объема активируются при изменении осмолярности внеклеточной среды [Mitrokhin и др., 2023].

Уменьшение объема клетки при увеличении осмолярности внешней среды приводит к активации НКСС и подавлению КСС. Усиление проводимости НКСС в таких условиях приводит к поступлению Na⁺, K⁺ и Cl⁻ в цитоплазму, что уравнивает осмолярность внешней и внутренней среды и предотвращает «утечку» воды. Активация НКСС, как указано выше, способствует увеличению [Cl⁻]_i и сдвигу E_{Cl} в сторону положительных значений. Наоборот, увеличение объема клетки, например, в результате уменьшения осмолярности внеклеточной среды приводит к увеличению проводимости КСС и снижению содержания ионов K⁺ и Cl⁻ в цитоплазме, в результате чего E_{Cl} становится более негативным (Рисунок 53).

В данной работе впервые показано, что снижение осмолярности приводит к снижению частоты генерации спонтанных ПД в САУ и сопровождается снижением [Cl⁻]_i за счет активации катион-хлорного котранспортера КСС1, экспрессия которого в САУ высока. В свою очередь, повышение осмолярности приводит к увеличению частоты спонтанных потенциалов действия. 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.

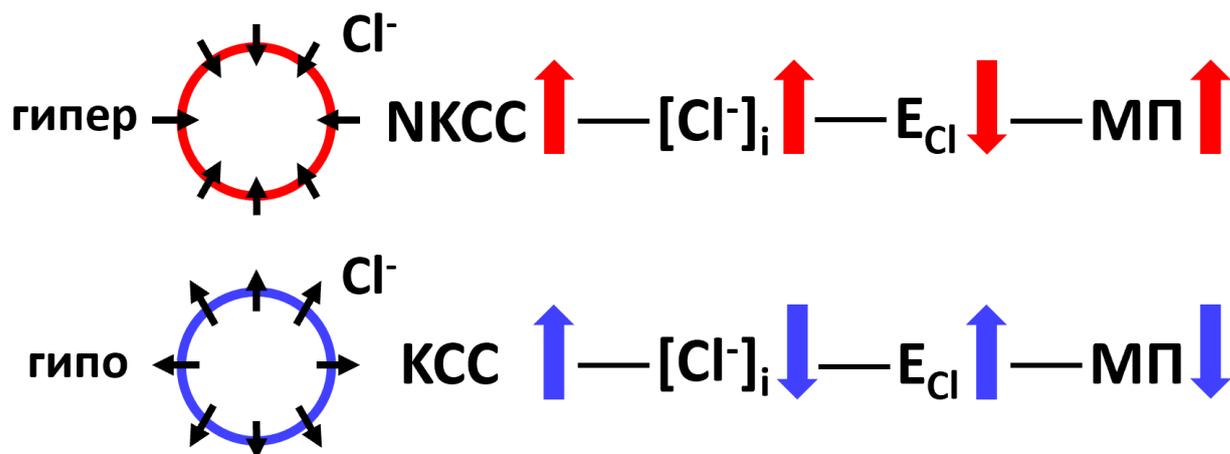


Рисунок 53. Влияние изменения осмолярности внеклеточного раствора на электрофизиологические характеристики кардиомиоцитов. Гипер – гиперосмотический раствор, гипо – гипоосмотический раствор.

5.9. Модуляция работы катион-хлорных котранспортеров при активации α_1 -АР САУ

Как показано выше, изменение автоматической активности САУ, вызванное колебаниями осмолярности внеклеточной среды, обусловлено активацией трансмембранных переносчиков хлора КСС1 и НКСС1.

В литературе имеются противоречивые сведения касательно регуляции катион-хлорных котранспортеров факторами вегетативной нервной системы. В частности, в некоторых работах показано, что стимуляция α_1 -АР приводит к активации НКСС1, в других же работах показан обратный эффект – подавление активности НКСС1 [Andersen и др., 2004; Anfinogenova и др., 2004]. Однако установлено, что симпатическая/адренергическая стимуляция, опосредованная как α - так и β -АР, приводит именно к реципрокному изменению активности НКСС1 и КСС и, таким образом, синергично влияет на E_{Cl} и $[Cl^-]_i$.

В наших экспериментах активация α_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, чем при действии каждого из этих факторов по отдельности. Таким образом, можно предположить, что активация α_1 -АР подавляет активность котранспортёра КСС, что приводит к повышению $[Cl^-]_i$ и дополнительной деполяризации, способствующей пейсмекерной функции САУ.

6. 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 α_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 α_1 -АР и P2-пуринорецепторов в ритмоводителе и проводящей системе сердца. В работе продемонстрировано, что физиологическая роль адренорецепторов α_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 α_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 β -адренорецепторы. Более того, на основе наблюдаемых феноменов, сопровождающих активацию α_1 -АР, можно заключить, что они не являются функциональными «дубликатами» β -адренорецепторов в проводящей системе сердца, а дополняют или ограничивают некоторые (положительные хронотропные и дромотропные) эффекты, развивающиеся при активации β -АР. В работе показано, что основной пуриновый комедиатор 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 β -адренорецепторов, а в норме реализуется с вовлечением α_1 -адренорецепторов, и, возможно, P2Y-рецепторов пуриновых котрансмиттеров. Однако избыточная стимуляция как α_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 α_1 -АР заключается в поддержании работы САУ и синхронизации его активности с работой АВУ в тех условиях, когда β -адренергическая стимуляция задает чрезвычайно высокую ЧСС.

Заключительная часть работы направлена на решение вопроса о том, за счет какого механизма может реализовываться физиологическая роль α_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.

7. ВЫВОДЫ

1. В кардиомиоцитах синоатриального (САУ) и атриовентрикулярного узлов (АВУ) сердца крысы обнаруживаются α_{1A} -адренорецепторы (α_{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 KCC выше, чем NKCC.
3. Стимуляция α_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 α_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 α_1 -АР приводит к увеличению цитоплазматической концентрации Cl^- в САУ. Блокада хлорных каналов, для которых обнаруживается наибольшее количество мРНК, приводит к частичному подавлению эффектов активации α_1 -АР в САУ, но не в АВУ.
6. Активация отдельных катион-хлорных симпортеров (KCC1, NKCC1) оказывает существенное влияние на автоматию САУ. Стимуляция α_1 -АР модифицирует эффекты, обусловленные активацией катион-хлорных трансмембранных симпортеров в САУ.

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abramochkin D. V., Filatova T.S., Pustovit K.B., Voronina Y.A., Kuzmin V.S., Vornanen M. Ionic currents underlying different patterns of electrical activity in working cardiac myocytes of mammals and non-mammalian vertebrates // *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* 2022. T. 268.
2. Abramochkin D. V., Kuzmin V.S., Sukhova G.S., Rosenshtraukh L. V. Modulation of rabbit sinoatrial node activation sequence by acetylcholine and isoproterenol investigated with optical mapping technique // *Acta Physiol.* 2009. T. 196. № 4. C. 385–394.
3. Adragna N.C., White R.E., Orlov S.N., Lauf P.K. K-Cl cotransport in vascular smooth muscle and erythrocytes: Possible implication in vasodilation // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 2000. T. 278. № 2. C. 47–52.
4. Ahles A., Engelhardt S. Polymorphic variants of adrenoceptors: pharmacology, physiology, and role in disease // *Pharmacol. Rev.* 2014. T. 66. № 3. C. 598–637.
5. Alings A.M.W., Abbas R.F., Jonge B. de, Bouman L.N. Structure and function of the simian sinoatrial node (*Macaca fascicularis*) // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1990. T. 22. № 12. C. 1453–1466.
6. Almeida M.C. De, Sánchez-Quintana D., Davis N., Charles F.R., Chikweto A., Sylvester W., Loukas M., Anderson R.H. The ox atrioventricular conduction axis compared to human in relation to the original investigation of sunao tawara // *Clin. Anat.* 2020. T. 33. № 3. C. 383–393.
7. Alvarez B. V., Kieller D.M., Quon A.L., Markovich D., Casey J.R. Slc26a6: A cardiac chloride-hydroxyl exchanger and predominant chloride-bicarbonate exchanger of the mouse heart // *J. Physiol.* 2004. T. 561. № 3. C. 721–734.
8. Alvarez B. V., Kieller D.M., Quon A.L., Robertson M., Casey J.R. Cardiac hypertrophy in anion exchanger 1-null mutant mice with severe hemolytic anemia // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 2007. T. 292. № 3. C. 1301–1312.
9. Alves L.A., Silva J.H.M. da, Ferreira D.N.M., Fidalgo-Neto A.A., Teixeira P.C.N., Souza C.A.M. de, Caffarena E.R., Freitas M.S. de. Structural and molecular modeling features of P2X receptors // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. C. 4531–4549.
10. Andersen G.Ø., Skomedal T., Enger M., Fidjeland A., Brattelid T., Levy F.O., Osnes J.B. α 1-AR-mediated activation of NKCC in rat cardiomyocytes involves ERK-dependent phosphorylation of the cotransporter // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 2004. T. 286. № 4. C. 1354–1360.
11. Anderson M.P., Berger H.A., Rich D.P., Gregory R.J., Smith A.E., Welsh M.J. Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel // *Cell.* 1991. T. 67. № 4. C. 775–

784.

12. Anderson R.H., Mori S., Spicer D.E., Sanchez-Quintana D., Jensen B. The anatomy, development, and evolution of the atrioventricular conduction axis // *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 2018. T. 5. № 3. C. 1–17.
13. Anderson R.H., Yanni J., Boyett M.R., Chandler N.J., Dobrzynski H. The anatomy of the cardiac conduction system // *Clin. Anat.* 2009. T. 22. № 1. C. 15–25.
14. Anfinogenova Y.J., Baskakov M.B., Kovalev I. V., Kilin A.A., Dulin N.O., Orlov S.N. Cell-volume-dependent vascular smooth muscle contraction: Role of Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransport, intracellular Cl⁻ and L-type Ca²⁺ channels // *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 2004. T. 449. № 1. C. 42–55.
15. Arreola J., Begenisich T., Melvin J.E. Conformation-dependent regulation of inward rectifier chloride channel gating by extracellular protons // *J. Physiol.* 2002. T. 541. № 1. C. 103–112.
16. Atkinson A.J., Logantha S.J.R.J., Hao G., Yanni J., Fedorenko O., Sinha A., Gilbert S.H., Benson A.P., Buckley D.L., Anderson R.H., Boyett M.R., Dobrzynski H. Functional, Anatomical, and Molecular Investigation of the Cardiac Conduction System and Arrhythmogenic Atrioventricular Ring Tissue in the Rat Heart // *J. Am. Heart Assoc.* 2013. T. 2. № 6. C. e000246–e000246.
17. Aumüller G. The Discovery of the Cardiac Atrioventricular Node by Sunao Tawara and Ludwig Aschoff // *Dtsch. Medizinische Wochenschrift.* 2019. T. 144. № 25. C. 1771–1777.
18. Badino P., Odore R., Re G. Are so many adrenergic receptor subtypes really present in domestic animal tissues? A pharmacological perspective // *Vet. J.* 2005. T. 170. № 2. C. 163–174.
19. Balderas E., Ateaga-Tlecuil R., Rivera M., Gomora J.C., Darszon A. Niflumic acid blocks native and recombinant T-type channels // *J. Cell. Physiol.* 2012. T. 227. № 6. C. 2542–2555.
20. Bavan S., Farmer L., Singh S.K., Straub V.A., Guerrero F.D., Ennion S.J. The penultimate arginine of the carboxyl terminus determines slow desensitization in a P2X receptor from the cattle tick *Boophilus microplus* // *Mol. Pharmacol.* 2011. T. 79. № 4. C. 776–785.
21. Berg J., Yang H., Jan L.Y. Ca²⁺-activated Cl⁻ channels at a glance // *J. Cell Sci.* 2012. T. 125. № 6. C. 1367–1371.
22. Berger H.A., Anderson M.P., Gregory R.J., Thompson S., Howard P.W., Maurer R.A., Mulligan R., Smith A.E., Welsh M.J. Identification and regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-generated chloride channel // *J. Clin. Invest.* 1991. T. 88. № 4. C. 1422–1431.
23. Berkowitz D.E., Price D.T., Bello E.A., Page S.O., Schwinn D.A. Localization of messenger

- RNA for three distinct α_2 -adrenergic receptor subtypes in human tissues: Evidence for species heterogeneity and implications for human pharmacology // *Anesthesiology*. 1994. T. 81. № 5. C. 1235–1244.
24. Bers D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. // *Nature*. 2002. T. 415. № 6868. C. 198–205.
25. Billet A., Jia Y., Jensen T., Riordan J.R., Hanrahan J.W. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator anion channel by tyrosine phosphorylation // *FASEB J*. 2015. T. 29. № 9. C. 3945–3956.
26. Billette J. Atrioventricular nodal activation during periodic premature stimulation of the atrium // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 1987. T. 252. № 1. C. 163–177.
27. Bleeker W.K., Mackaay A.J.C., Masson-Pevet M., Bouman L.N., Becker A.E. Functional and morphological organization of the rabbit sinus node // *Circ. Res.* 1980. T. 46. № 1. C. 11–22.
28. Boehm S. ATP stimulates sympathetic transmitter release via presynaptic P2X purinoceptors. // *J. Neurosci.* 1999. T. 19. № 2. C. 737–46.
29. Bonar P.T., Casey J.R. Plasma membrane Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers: Structure, mechanism and physiology // *Channels*. 2008. T. 2. № 5. C. 337–345.
30. Boyett M.R., Honjo H., Kodama I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure // *Cardiovasc. Res.* 2000. T. 47. № 4. C. 658–687.
31. Brodde O.E., Michel M.C. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart // *Pharmacol Rev.* 1999. T. 51. № 4. C. 651–690.
32. Brunner J.D., Lim N.K., Schenck S., Duerst A., Dutzler R. X-ray structure of a calcium-activated TMEM16 lipid scramblase // *Nature*. 2014. T. 516. № 7530. C. 207–212.
33. Bulley S., Neeb Z.P., Burris S.K., Bannister J.P., Thomas-Gatewood C.M., Jangsongthong W., Jaggar J.H. TMEM16A/ANO1 channels contribute to the myogenic response in cerebral arteries // *Circ. Res.* 2012. T. 111. № 8. C. 1027–1036.
34. Burashnikov A., Antzelevitch C. Differences in the electrophysiologic response of four canine ventricular cell types to α_1 -adrenergic agonists // *Cardiovasc. Res.* 1999. T. 43. № 4. C. 901–908.
35. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors // *Cell. Mol. Life Sci.* 2007. T. 64. № 12. C. 1471–1483.
36. Burnstock G. Cotransmission in the autonomic nervous system. : *Autonomic Nervous System*, 2013. 23–35 c.
37. Burnstock G. Purinergic signalling: From discovery to current developments // *Exp. Physiol.* 2014. T. 99. № 1. C. 16–34.

38. Burnstock G. Purinergic signalling: Therapeutic developments // *Front. Pharmacol.* 2017. T. 8. № 3. C. 1–55.
39. Burnstock G., Dumsday B., Smythe A. Atropine resistant excitation of the urinary bladder: the possibility of transmission via nerves releasing a purine nucleotide // *Br. J. Pharmacol.* 1972.
40. Burnstock G., Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? // *Gen. Pharmacol.* 1985.
41. Burnstock G., Pelleg A. Cardiac purinergic signalling in health and disease // *Purinergic Signal.* 2015. T. 11. № 1. C. 1–46.
42. Bylund D.B., Eikenberg D.C., Hieble J.P., Langer S.Z., Lefkowitz R.J., Minneman K.P., Molinoff P.B., Ruffolo R.R., Trendelenburg U. International union of pharmacology nomenclature of adrenoceptors // *Pharmacol. Rev.* 1994. T. 46. № 2. C. 121–136.
43. Caputo A., Caci E., Ferrera L., Pedemonte N., Barsanti C., Sondo E., Pfeffer U., Ravazzolo R., Zegarra-Moran O., Galletta L.J.V. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity // *Science (80-.)*. 2008. T. 322. № 5901. C. 590–594.
44. Carvalho A. de, Almedia D. de. Spread of activity through the atrioventricular node // *Circ. Res.* 1960. T. 8. C. 1–15.
45. Cattaneo M., Schulz R., Nylander S. Adenosine-mediated effects of ticagrelor: Evidence and potential clinical relevance // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014. T. 63. № 23. C. 2503–2509.
46. Centeio R., Ousingsawat J., Schreiber R., Kunzelmann K. Ca²⁺ Dependence of Volume-Regulated VRAC/LRRC8 and TMEM16A Cl⁻ Channels // *Front. Cell Dev. Biol.* 2020. T. 8.
47. Chakraborti S., Chakraborti T., Shaw G. β -Adrenergic mechanisms in cardiac diseases: A perspective // *Cell. Signal.* 2000. T. 12. № 8. C. 499–513.
48. Chandler N.J., Greener I.D., Tellez J.O., Inada S., Musa H., Molenaar P., DiFrancesco D., Baruscotti M., Longhi R., Anderson R.H., Billeter R., Sharma V., Sigg D.C., Boyett M.R., Dobrzynski H. Molecular architecture of the human sinus node insights into the function of the cardiac pacemaker // *Circulation.* 2009. T. 119. № 12. C. 1562–1575.
49. Chapp A.D., Schum S., Behnke J.E., Hahka T., Huber M.J., Jiang E., Larson R.A., Shan Z., Chen Q.H. Measurement of cations, anions, and acetate in serum, urine, cerebrospinal fluid, and tissue by ion chromatography // *Physiol. Rep.* 2018. T. 6. № 7.
50. Chemaly A. El, Norez C., Magaud C., Bescond J., Chatelier A., Fares N., Findlay I., Jayle C., Becq F., Faivre J.F., Bois P. ANO1 contributes to Angiotensin-II-activated Ca²⁺-dependent Cl⁻ current in human atrial fibroblasts // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2014. T. 68. C. 12–19.
51. Chernova M.N., Jiang L., Friedman D.J., Darman R.B., Lohi H., Kere J., Vandorpe D.H., Alper

- S.L. Functional comparison of mouse slc26a6 anion exchanger with human SLC26A6 polypeptide variants: Differences in anion selectivity, regulation, and electrogenicity // *J. Biol. Chem.* 2005. T. 280. № 9. C. 8564–8580.
52. Chun H., Cho H., Choi J., Lee J., Kim S.M., Kim H., Oh U. Protons inhibit anoctamin 1 by competing with calcium // *Cell Calcium.* 2015. T. 58. № 5. C. 431–441.
53. Cingolani H.E., Chiappe G.E., Ennis I.L., Morgan P.G., Alvarez B. V., Casey J.R., Dulce R.A., Pérez N.G., Camilión De Hurtado M.C. Influence of Na⁺-Independent Cl⁻-HCO₃⁻ Exchange on the Slow Force Response to Myocardial Stretch // *Circ. Res.* 2003. T. 93. № 11. C. 1082–1088.
54. Cipriani G., Serboiu C.S., Gherghiceanu M., Simonetta Faussonne-Pellegrini M., Vannucchi M.G. NK receptors, Substance P, Ano1 expression and ultrastructural features of the muscle coat in Cav-1 ^{-/-} mouse ileum // *J. Cell. Mol. Med.* 2011. T. 15. № 11. C. 2411–2420.
55. Colucci W.S., Wright R.F., Braunwald E. New positive inotropic agents in the treatment of congestive heart failure // *N. Engl. J. Med.* 1986. T. 314. № 5. C. 290–299.
56. Coppin S.R., Severs N.J., Gourdie R.G. Connexin45 (α6) expression delineates an extended conduction system in the embryonic and mature rodent heart // *Dev. Genet.* 1999. T. 24. № 1–2. C. 82–90.
57. Cotecchia S., Vescovo C.D. del, Colella M., Caso S., Diviani D. The alpha1-adrenergic receptors in cardiac hypertrophy: Signaling mechanisms and functional implications // *Cell. Signal.* 2015. T. 27. № 10. C. 1984–1993.
58. Csanády L., Vergani P., Gadsby D.C. Structure, gating, and regulation of the CFTR anion channel // *Physiol. Rev.* 2019. T. 99. № 1. C. 707–738.
59. Cuppoletti J., Tewari K.P., Sherry A.M., Ferrante C.J., Malinowska D.H. Sites of protein kinase A activation of the human ClC-2 Cl⁻ channel // *J. Biol. Chem.* 2004. T. 279. № 21. C. 21849–21856.
60. Dang S., Feng S., Tien J., Peters C.J., Bulkley D., Lolicato M., Zhao J., Zuberbühler K., Ye W., Qi L., Chen T., Craik C.S., Jan Y.N., Minor D.L., Cheng Y., Jan L.Y. Cryo-EM structures of the TMEM16A calcium-activated chloride channel // *Nature.* 2017. T. 552. № 7685. C. 426–429.
61. Delpire E. Advances in the development of novel compounds targeting cation-chloride cotransporter physiology // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 2021. T. 320. № 3. C. 324–340.
62. Deneka D., Sawicka M., Lam A.K.M., Paulino C., Dutzler R. Structure of a volume-regulated anion channel of the LRRC8 family // *Nature.* 2018. T. 558. № 7709. C. 254–259.
63. Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner // *Bioinformatics.* 2013. T. 29. № 1. C.

1–16.

64. Dobrzynski H., Anderson R.H., Atkinson A., Borbas Z., D'Souza A., Fraser J.F., Inada S., Logantha S.J.R.J., Monfredi O., Morris G.M., Moorman A.F.M., Nikolaidou T., Schneider H., Szuts V., Temple I.P., 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. T. 139. № 2. C. 260–288.
65. Dolmatova E., Spagnol G., Boassa D., Baum J.R., Keith K., Ambrosi C., Kontaridis M.I., Sorgen P.L., Sosinsky G.E., Duffy H.S. Cardiomyocyte ATP release through pannexin 1 aids in early fibroblast activation // *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 2012. T. 303. № 10. C. H1208–H1218.
66. Drury A.N., Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart // *J. Physiol.* 1929. T. 68. № 3. C. 213–237.
67. Duan D. Phenomics of cardiac chloride channels: The systematic study of chloride channel function in the heart // *J. Physiol.* 2009. T. 587. № 10. C. 2163–2177.
68. Duan D.D. Phenomics of cardiac chloride channels // *Compr. Physiol.* 2013. T. 3. № 2. C. 667–692.
69. Duan D.Y., Liu L.L.H., Bozeat N., Huang Z.M., Xiang S.Y., Wang G.L., Ye L., Hume J.R. Functional role of anion channels in cardiac diseases // *Acta Pharmacol. Sin.* 2005. T. 26. № 3. C. 265–278.
70. Dubyak G.R., El-Moatassim C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides // *Am. J. Physiol.* 1993. T. 265. № 3. C. 577–606.
71. Dunn P.M., Zhong Y., Burnstock G. P2X receptors in peripheral neurons // *Prog. Neurobiol.* 2001. T. 65. № 2. C. 107–134.
72. Dupré D.J., Robitaille M., Rebois R.V., Hébert T.E. The role of Gβγ subunits in the organization, assembly, and function of GPCR signaling complexes // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2009. T. 49. C. 31–56.
73. Duran C., Thompson C.H., Xiao Q., Hartzell H.C. Chloride channels: Often enigmatic, rarely predictable // *Annu. Rev. Physiol.* 2009. T. 72. C. 95–121.
74. Ebert S.N., Taylor D.G. Catecholamines and development of cardiac pacemaking: An intrinsically intimate relationship // *Cardiovasc. Res.* 2006. T. 72. № 3. C. 364–374.
75. Ecke D., Hanck T., Tulapurkar M.E., Schäfer R., Kassack M., Stricker R., Reiser G. Hetero-oligomerization of the P2Y11 receptor with the P2Y1 receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P2Y11 receptor // *Biochem. J.* 2008. T. 409. № 1. C. 107–116.
76. Evans R.J., Surprenant A. P2X receptors in autonomic and sensory neurons // *Semin. Neurosci.*

1996. T. 8. № 4. C. 217–223.

77. Ferrera L., Caputo A., Galletta L.J.V. TMEM16A protein: A new identity for Ca²⁺-dependent Cl⁻ channels // *Physiology*. 2010. T. 25. № 6. C. 357–363.

78. Fisher S.K., Cheema T.A., Foster D.J., Heacock A.M. Volume-dependent osmolyte efflux from neural tissues: Regulation by G-protein-coupled receptors // *J. Neurochem*. 2008. T. 106. № 5. C. 1998–2014.

79. Fredholm B.B., Abbracchio M.P., Burnstock G., Daly J.W., Harden T.K., Jacobson K.A., Leff P., Williams M. VI. Nomenclature and classification of purinoceptors // *Pharmacol. Rev.* 1994. T. 46. № 2. C. 143–156.

80. Fritsch J., Edelman A. Modulation of the hyperpolarization-activated Cl⁻ current in human intestinal T84 epithelial cells by phosphorylation // *J. Physiol.* 1996. T. 490. № 1. C. 115–128.

81. Fryatt A.G., Dayl S., Cullis P.M., Schmid R., Evans R.J. Mechanistic insights from resolving ligand-dependent kinetics of conformational changes at ATP-gated P2X1R ion channels // *Sci. Rep.* 2016. T. 6. C. 1–20.

82. Fujiwara Y., Kubo Y. Regulation of the desensitization and ion selectivity of ATP-gated P2X2 channels by phosphoinositides // *J. Physiol.* 2006. T. 576. № 1. C. 135–149.

83. Gagnon M., Bergeron M.J., Lavertu G., Castonguay A., Tripathy S., Bonin R.P., Perez-Sanchez J., Boudreau D., Wang B., Dumas L., Valade I., Bachand K., Jacob-Wagner M., Tardif C., Kianicka I., Isenring P., Attardo G., Coull J.A.M., Koninck Y. De. Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics for neurological diseases // *Nat. Med.* 2013. T. 19. № 11. C. 1524–1528.

84. Garneau A.P., Marcoux A.A., Noël M., Frenette-Cotton R., Drolet M.C., Couet J., Larivière R., Isenring P. Ablation of potassium-chloride cotransporter type 3 (Kcc3) in mouse causes multiple cardiovascular defects and isosmotic polyuria // *PLoS One*. 2016. T. 11. № 5. C. 1–12.

85. Garneau A.P., Marcoux A.A., Slimani S., Tremblay L.E., Frenette-Cotton R., Mac-Way F., Isenring P. Physiological roles and molecular mechanisms of K⁺-Cl⁻ cotransport in the mammalian kidney and cardiovascular system: where are we? // *J. Physiol.* 2019. T. 597. № 6. C. 1–18.

86. Ghouli M.R., Fiacco T.A., Binder D.K. Structure-function relationships of the LRRC8 subunits and subdomains of the volume-regulated anion channel (VRAC) // *Front. Cell. Neurosci.* 2022. T. 16. № August. C. 1–13.

87. Glukhov A. V., Fedorov V. V., Anderson M.E., Mohler P.J., Efimov I.R. Functional anatomy of the murine sinus node: High-resolution optical mapping of ankyrin-B heterozygous mice // *Am.*

- J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol. 2010. T. 299. № 2. C. 482–491.
88. Glukhov A. V., Hage L.T., Hansen B.J., Pedraza-Toscano A., Vargas-Pinto P., Hamlin R.L., Weiss R., Carnes C.A., Billman G.E., Fedorov V. V. Sinoatrial node reentry in a canine chronic left ventricular infarct model role of intranodal fibrosis and heterogeneity of refractoriness // *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.* 2013. T. 6. № 5. C. 984–994.
89. Gould D.J., Hill C.E. α -Adrenoceptor activation of a chloride conductance in rat iris arterioles // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 1996. T. 271. № 40. C. 2469–2476.
90. Grozinger C.M., Schreiber S.L. Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000. T. 97. № 14. C. 7835–7840.
91. Haefliger J.A., Bruzzone R., Jenkins N.A., Gilbert D.J., Copeland N.G., Paul D.L. Four novel members of the connexin family of gap junction proteins: Molecular cloning, expression, and chromosome mapping // *J. Biol. Chem.* 1992. T. 267. № 3. C. 2057–2064.
92. Hallows K.R., Raghuram V., Kemp B.E., Witters L.A., Foskett J.K. Inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by novel interaction with the metabolic sensor AMP-activated protein kinase // *J. Clin. Invest.* 2000. T. 105. № 12. C. 1711–1721.
93. Hamm H.E. The many faces of G protein signaling // *J. Biol. Chem.* 1998. T. 273. № 2. C. 669–672.
94. Hancox J., Levi A. The hyperpolarisation-activated current, I_f , is not required for pacemaking in single cells from the rabbit atrioventricular node // *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 1994. T. 427. № 1–2. C. 121–128.
95. Hancox J.C., Yuill K.H., Mitcheson J.S., Convery M.K. Progress and gaps in understanding the electrophysiological properties of morphologically normal cells from the cardiac atrioventricular node // *Int. J. Bifurcat. Chaos.* 2003. T. 13. № 12. C. 3675–3691.
96. Hansen T.H., Yan Y., Ahlberg G., Vad O.B., Refsgaard L., Santos J.L. dos, Mutsaers N., Svendsen J.H., Olesen M.S., Bentzen B.H., Schmitt N. A Novel Loss-of-Function Variant in the Chloride Ion Channel Gene *Clcn2* Associates with Atrial Fibrillation // *Sci. Rep.* 2020. T. 10. № 1. C. 1–10.
97. Hartmann A.M., Nothwang H.G. Molecular and evolutionary insights into the structural organization of cation chloride cotransporters // *Front. Cell. Neurosci.* 2015. T. 8. № JAN. C. 1–20.
98. Hartzell H.C., Yu K., Xiao Q., Chien L.T., Qu Z. Anoctamin/TMEM16 family members are Ca^{2+} -activated Cl^- channels // *J. Physiol.* 2009. T. 587. № 10. C. 2127–2139.

99. Hasan W. Autonomic cardiac innervation // *Organogenesis*. 2013. T. 9. № 3. C. 176–193.
100. Horváth B., Váczi K., Hegyi B., Gönczi M., Dienes B., Kistamás K., Bányász T., Magyar J., Baczkó I., Varró A., Seprényi G., Csernoch L., Nánási P.P., Szentandrassy N. Sarcolemmal Ca²⁺-entry through L-type Ca²⁺ channels controls the profile of Ca²⁺-activated Cl⁻ current in canine ventricular myocytes // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2016. T. 97. C. 125–139.
101. Huang F., Zhang H., Wu M., Yang H., Kudo M., Peters C.J., Woodruff P.G., Solberg O.D., Donne M.L., Huang X., Sheppard D., Fahy J. V., Wolters P.J., Hogan B.L.M., Finkbeiner W.E., Li M., Jan Y.N., Jan L.Y., Rock J.R. Calcium-activated chloride channel TMEM16A modulates mucin secretion and airway smooth muscle contraction // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. T. 109. № 40. C. 16354–16359.
102. Huang Z.M., Prasad C., Britton F.C., Ye L.L., Hatton W.J., Duan D. Functional role of CLC-2 chloride inward rectifier channels in cardiac sinoatrial nodal pacemaker cells // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2009. T. 47. № 1. C. 121–132.
103. Hucker W.J., Nikolski V.P., Efimov I.R. Autonomic control and innervation of the atrioventricular junctional pacemaker // *Hear. Rhythm.* 2007. T. 4. № 10. C. 1326–1335.
104. Irisawa H., Brown H.F., Giles W. Cardiac pacemaking in the sinoatrial node // *Physiol. Rev.* 1993. T. 73. № 1. C. 197–227.
105. 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 Physiol.* 2021. T. 231. № 4.
106. Ivanova A.D., Kuzmin V.S. Electrophysiological characteristics of the rat azygos vein under electrical pacing and adrenergic stimulation // *J. Physiol. Sci.* 2018. T. 68. № 5. C. 617–628.
107. James T.N. Anatomy of the human sinus node // *Anat. Rec.* 1961. T. 141. № 2. C. 109–139.
108. Jentsch T.J. VRACs and other ion channels and transporters in the regulation of cell volume and beyond // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2016. T. 17. № 5. C. 293–307.
109. Jentsch T.J., Pusch M. CLC chloride channels and transporters: Structure, function, physiology, and disease // *Physiol. Rev.* 2018. T. 98. № 3. C. 1493–1590.
110. Jesús-Pérez J.J. De, Castro-Chong A., Shieh R.C., Hernández-Carballo C.Y., Santiago-Castillo J.A. De, Arreola J. Gating the glutamate gate of CLC-2 chloride channel by pore occupancy // *J. Gen. Physiol.* 2016. T. 147. № 1. C. 25–37.
111. Jia Y., Mathews C.J., Hanrahan J.W. Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A // *J.*

- Biol. Chem. 1997. T. 272. № 8. C. 4978–4984.
112. Jin X., Shah S., Liu Y., Zhang H., Lees M., Fu Z., Lippiat J.D., Beech D.J., Sivaprasadarao A., Baldwin S.A., Zhang H., Gamper N. Activation of the Cl⁻ Channel ANO1 by localized calcium signals in nociceptive sensory neurons requires coupling with the IP3 receptor // *Sci. Signal.* 2013. T. 6. № 290. C. 73–82.
113. Jung J., Nam J.H., Park H.W., Oh U., Yoon J.H., Lee M.G. Dynamic modulation of ANO1/TMEM16A HCO₃⁻ permeability by Ca²⁺/calmodulin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. T. 110. № 1. C. 360–365.
114. Kahle K.T., Rinehart J., Ring A., Gimenez I., Gamba G., Hebert S.C., Lifton R.P. WNK protein kinases modulate cellular Cl⁻ flux by altering the phosphorylation state of the Na-K-Cl and K-Cl cotransporters // *Physiology.* 2006. T. 21. № 5. C. 326–335.
115. Kamkin A., Kiseleva I., Wagner K.D., Pylaev A., Leiterer K.P., Theres H., Scholz H., Günther J., Isenberg G. A possible role for atrial fibroblasts in postinfarction bradycardia // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 2002. T. 282. № 3 51-3. C. 842–849.
116. Kanter H.L., Saffitz J.E., Beyer E.C. Cardiac myocytes express multiple gap junction proteins // *Circ. Res.* 1990. T. 70. № 2. C. 438–444.
117. Karlsson M., Zhang C., Méar L., Zhong W., Digre A., Katona B., Sjöstedt E., Butler L., Odeberg J., Dusart P., Edfors F., Oksvold P., Feilitzten K. von, Zwahlen M., Arif M., Altay O., Li X., Ozcan M., Mardonoglu A., Fagerberg L., Mulder J., Luo Y., Ponten F., Uhlén M., Lindskog C. A single-cell type transcriptomics map of human tissues // *Sci. Adv.* 2021. T. 7. № 31. C. 1–17.
118. Kashou A.H., Kashou H.E. Rhythm, Atrioventricular Block. , 2018.
119. Kasuya G., Nakane T., Yokoyama T., Jia Y., Inoue M., Watanabe K., Nakamura R., Nishizawa T., Kusakizako T., Tsutsumi A., Yanagisawa H., Dohmae N., Hattori M., Ichijo H., Yan Z., Kikkawa M., Shirouzu M., Ishitani R., Nureki O. Cryo-EM structures of the human volume-regulated anion channel LRRC8 // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2018. T. 25. № 9. C. 797–804.
120. Kawashima T. The autonomic nervous system of the human heart with special reference to its origin, course, and peripheral distribution // *Anat. Embryol. (Berl).* 2005. T. 209. № 6. C. 425–438.
121. Keith A., Flack M. The Form and Nature of the Muscular Connections between the Primary Divisions of the Vertebrate Heart. // *J. Anat. Physiol.* 1907. T. 41. № 3. C. 172–89.
122. King B.F., Ziganshina L.E., Pintor J., Burnstock G. Full sensitivity of P2X2 purinoceptor to ATP revealed by changing extracellular pH // *Br. J. Pharmacol.* 1996. T. 117. № 7. C. 1371–1373.

123. Ko Y.S., Yeh H.I., Ko Y.L., Hsu Y.C., Chen C.F., Wu S., Lee Y.S., Severs N.J. Three-Dimensional Reconstruction of the Rabbit Atrioventricular Conduction Axis by Combining Histological, Desmin, and Connexin Mapping Data // *Circulation*. 2004. T. 109. № 9. C. 1172–1179.
124. Kostyunina D.S., Zhang L., Shvetsova A.A., Selivanova E.K., Tarasova O.S., Matchkov V. V., Gaynullina D.K. Trophic sympathetic influence weakens pro-contractile role of Cl⁻ channels in rat arteries during postnatal maturation // *Sci. Rep.* 2020. T. 10. № 1. C. 1–13.
125. Kudrycki K.E., Newman P.R., Shull G.E. cDNA cloning and tissue distribution of mRNAs for two proteins that are related to the band 3 Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger // *J. Biol. Chem.* 1990. T. 265. № 1. C. 43–54.
126. Kügelgen I. von. Pharmacology of P2Y receptors // *Brain Res. Bull.* 2019. T. 151. № October 2018. C. 12–24.
127. Kügelgen I. Von, Hoffmann K. Pharmacology and structure of P2Y receptors // *Neuropharmacology*. 2016. T. 104. C. 50–61.
128. Kügelgen I. von, Stoffel D., Starke K. P2-purinoceptor-mediated inhibition of noradrenaline release in rat atria // *Br. J. Pharmacol.* 1995. T. 115. № 2. C. 247–254.
129. Kunzelmann K. CFTR: Interacting with everything? // *News Physiol. Sci.* 2001. T. 16. № 4. C. 167–170.
130. Kuruma A., Hartzell H.C. Bimodal control of a Ca²⁺-activated Cl⁻ channel by different Ca²⁺ signals // *J. Gen. Physiol.* 2000. T. 115. № 1. C. 59–80.
131. 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. // *J. Biomed. Sci.* 2016. T. 23. № 1. C. 50.
132. Lakatta E.G., Maltsev V.A., Vinogradova T.M. A Coupled SYSTEM of intracellular Ca²⁺ clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker // *Circ. Res.* 2010. T. 106. № 4. C. 659–673.
133. Lamb F.S., Kooy N.W., Lewis S.J. Role of Cl⁻ channels in α -adrenoceptor-mediated vasoconstriction in the anesthetized rat // *Eur. J. Pharmacol.* 2000. T. 401. № 3. C. 403–412.
134. Lang D., Petrov V., Lou Q., Osipov G., Efimov I.R. Spatiotemporal control of heart rate in a rabbit heart // *J. Electrocardiol.* 2011. T. 44. № 6. C. 626–634.
135. Lang F., Voelkl J. Therapeutic potential of serum and glucocorticoid inducible kinase inhibition // *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2013. T. 22. № 6. C. 701–714.
136. Latek D., Modzelewska A., Trzaskowski B., Palczewski K., Filipek S. G protein-coupled

- receptors-recent advances // *Acta Biochim. Pol.* 2012. T. 59. № 4. C. 515–529.
137. Li B., Hoel C.M., Brohawn S.G. Structures of tweety homolog proteins TTYH2 and TTYH3 reveal a Ca²⁺-dependent switch from intra- to intermembrane dimerization // *Nat. Commun.* 2021. T. 12. № 1. C. 6913–6925.
138. Li G.R., Sun H., To J., Tse H.F., Lau C.P. Demonstration of calcium-activated transient outward chloride current and delayed rectifier potassium currents in Swine atrial myocytes // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004. T. 36. № 4. C. 495–504.
139. Li J., Greener I.D., Inada S., Nikolski V.P., Yamamoto M., Hancox J.C., Zhang H., Billeter R., Efimov I.R., Dobrzynski H., Boyett M.R. Computer three-dimensional reconstruction of the atrioventricular node // *Circ. Res.* 2008. T. 102. № 8. C. 975–985.
140. Liao Y., Smyth G.K., Shi W. FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features // *Bioinformatics.* 2014. T. 30. № 7.
141. Litviňuková M., Talavera-López C., Maatz H., Reichart D., Worth C.L., Lindberg E.L., Kanda M., Polanski K., Heinig M., Lee M., Nadelmann E.R., Roberts K., Tuck L., Fasouli E.S., DeLaughter D.M., McDonough B., Wakimoto H., Gorham J.M., Samari S., Mahbubani K.T., Saeb-Parsy K., Patone G., Boyle J.J., Zhang H., Zhang H., Viveiros A., Oudit G.Y., Bayraktar O.A., Seidman J.G., Seidman C.E., Nosedá M., Hubner N., Teichmann S.A. Cells of the adult human heart // *Nature.* 2020. T. 588. № 7838. C. 466–472.
142. Liu Y., Zhang H., Men H., Du Y., Xiao Z., Zhang F., Huang D., Du X., Gamper N., Zhang H. Volume-regulated Cl⁻ current: Contributions of distinct Cl⁻ channels and localized Ca²⁺ signals // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 2019. T. 317. № 3. C. 466–480.
143. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method // *Methods.* 2001. T. 25. № 4.
144. Locher K.P. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. T. 23. № 6. C. 487–493.
145. Lohi H., Lamprecht G., Markovich D., Heil A., Kujala M., Seidler U., Kere J. Isoforms of SLC26A6 mediate anion transport and have functional PDZ interaction domains // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 2003. T. 284. № 3 53-3.
146. Lopatin A.N., Nichols C.G. Inward rectifiers in the heart: an update on I(K1) // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2001. T. 33. № 4. C. 625–638.
147. Lopez I., Mak E.C., Ding J., Hamm H.E., Lomasney J.W. A Novel Bifunctional Phospholipase C That Is Regulated by G α 12 and Stimulates the Ras/Mitogen-activated Protein Kinase Pathway // *J. Biol. Chem.* 2001. T. 276. № 4. C. 2758–2765.

148. Love M.I., Huber W., Anders S. Differential gene expression analysis based on the negative binomial distribution // *Genome Biol.* 2014. T. 15. № 12.
149. Ludwig A., Rivera C., Uvarov P. A noninvasive optical approach for assessing chloride extrusion activity of the K-Cl cotransporter KCC2 in neuronal cells // *BMC Neurosci.* 2017. T. 18. № 1. C. 23.
150. Luo J., Pato M.D., Riordan J.R., Hanrahan J.W. Differential regulation of single CFTR channels by PP2C, PP2A, and other phosphatases // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 1998. T. 274. № 5. C. 43–45.
151. Lutter D., Ullrich F., Lueck J.C., Kempa S., Jentsch T.J. Selective transport of neurotransmitters and modulators by distinct volume-regulated LRRC8 anion channels // *J. Cell Sci.* 2017. T. 130. № 6. C. 1122–1133.
152. Lymperopoulos A. Physiology and pharmacology of the cardiovascular adrenergic system // *Front. Physiol.* 2013. T. 4. № 240. C. 1–8.
153. Lytle C., McManus T. Coordinate modulation of Na-K-2Cl cotransport and K-Cl cotransport by cell volume and chloride // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 2002. T. 283. № 5. C. 52–55.
154. Ma K., Wang H., Yu J., Wei M., Xiao Q. New Insights on the Regulation of Ca²⁺-Activated Chloride Channel TMEM16A // *J. Cell. Physiol.* 2017. T. 232. № 4. C. 707–716.
155. Mahmood A., Ahmed K., Zhang Y. β -Adrenergic Receptor Desensitization/Down-Regulation in Heart Failure: A Friend or Foe? // *Front. Cardiovasc. Med.* 2022. T. 9. № July. C. 1–5.
156. Maier S.K.G., Westenbroek R.E., Yamanushi T.T., Dobrzynski H., Boyett M.R., Catterall W.A., Scheuer T. An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003. T. 100. № 6. C. 3507–3512.
157. Manoj P., Kim J.A., Kim S., Li T., Sewani M., Chelu M.G., Li N. Sinus node dysfunction: current understanding and future directions // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2023. T. 324. № 3. C. 259–278.
158. Marionneau C., Couette B., Liu J., Li H., Mangoni M.E., Nargeot J., Lei M., Escande D., Demolombe S. Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart // *J. Physiol.* 2005. T. 562. № 1. C. 223–234.
159. Markowitz S.M., Lerman B.B. A contemporary view of atrioventricular nodal physiology // *J. Interv. Card. Electrophysiol.* 2018. T. 52. № 3. C. 271–279.
160. Marquez-Klaka B., Rettinger J., Bhargava Y., Eisele T., Nicke A. Identification of an

- intersubunit cross-link between substituted cysteine residues located in the putative ATP binding site of the P2X1 receptor // *J. Neurosci.* 2007. T. 27. № 6. C. 1456–1466.
161. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads // *EMBnet.journal.* 2011. T. 17. № 1. C. 1–20.
162. Meor Azlan N.F., Zhang J. Role of the Cation-Chloride-Cotransporters in Cardiovascular Disease // *Cells.* 2020. T. 9. № 10. C. 2293.
163. Miller A.N., Vaisey G., Long S.B. Molecular mechanisms of gating in the calcium-activated chloride channel bestrophin // *Elife.* 2019. T. 8. C. 43231.
164. Mitrokhin V., Bilichenko A., Kazanski V., Schobik R., Shileiko S., Revkova V., Kalsin V., Kamkina O., Kamkin A., Mladenov M. Transcriptomic profile of the mechanosensitive ion channelome in human cardiac fibroblasts // *Exp. Biol. Med.* 2023. T. 248. № 23. C. 2341–2350.
165. Modi A.D., Khan A.N., Cheng W.Y.E., Modi D.M. KCCs, NKCCs, and NCC: Potential targets for cardiovascular therapeutics? A comprehensive review of cell and region specific expression and function // *Acta Histochem.* 2023. T. 125. № 4. C. 152045.
166. Monfredi O., Dobrzynski H., Mondal T., Boyett M.R., Morris G.M. The anatomy and physiology of the sinoatrial node-A contemporary review // *PACE - Pacing Clin. Electrophysiol.* 2010. T. 33. № 11. C. 1392–1406.
167. Morris G.M., Kalman J.M. Fibrosis, electrics and genetics - Perspectives on sinoatrial node disease - // *Circ. J.* 2014. T. 78. № 6. C. 1272–1282.
168. Motiejunaite J., Amar L., Vidal-Petiot E. Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines // *Ann. Endocrinol. (Paris).* 2021. T. 82. № 3–4. C. 193–197.
169. Mount D.B., Mercado A., Song L., Jason X., George A.L., Delpire E., Gamba G. Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family // *J. Biol. Chem.* 1999. T. 274. № 23. C. 16355–16362.
170. Munk A.A., Adjemian R.A., Zhao J., Ogbaghebriel A., Shrier A. Electrophysiological properties of morphologically distinct cells isolated from the rabbit atrioventricular node // *J. Physiol.* 1996. T. 493. № 3. C. 801–818.
171. Nan J., Yuan Y., Yang X., Shan Z., Liu H., Wei F., Zhang W., Zhang Y. Cryo-EM structure of the human sodium-chloride cotransporter NCC // *Sci. Adv.* 2022. T. 8. № 45. C. eadd7176.
172. Nikmaram M.R., Liu J., Abdelrahman M., Dobrzynski H., Boyett M.R., Lei M. Characterization of the effects of Ryanodine, TTX, E-4031 and 4-AP on the sinoatrial and atrioventricular nodes // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2008. T. 96. № 1–3. C. 452–464.
173. Nilius B., Eggermont J., Voets T., Buyse G., Manolopoulos V., Droogmans G. Properties of

- volume-regulated anion channels in mammalian cells // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1997. T. 68. № 1. C. 69–119.
174. Nilius B., Voets T., Prenen J., Barth H., Aktories K., Kaibuchi K., Droogmans G., Eggermont J. Role of Rho and Rho kinase in the activation of volume-regulated anion channels in bovine endothelial cells // *J. Physiol.* 1999. T. 516. № 1. C. 67–74.
175. Noble D. Cardiac action and pacemaker potentials based on the Hodgkin-Huxley equations // *Nature*. 1960. T. 188. № 4749. C. 495–497.
176. Noma A., Nakayama T., Kurachi Y., Irisawa H. Resting K conductances in pacemaker and non-pacemaker heart cells of the rabbit // *Jpn. J. Physiol.* 1984. T. 34. № 2. C. 245–254.
177. North R.A. Molecular physiology of P2X receptors // *Physiol. Rev.* 2002. T. 82. № 4. C. 1013–1067.
178. O’Connell T.D., Ishizaka S., Nakamura A., Swigart P.M., Rodrigo M.C., Simpson G.L., Cotecchia S., Rokosh D.G., Grossman W., Foster E., Simpson P.C. The α 1A/C- and α 1B-adrenergic receptors are required for physiological cardiac hypertrophy in the double-knockout mouse // *J. Clin. Invest.* 2003. T. 111. № 11. C. 1783–1791.
179. O’Connell T.D., Jensen B.C., Baker A.J., Simpson P.C. Cardiac α 1-adrenergic receptors: Novel aspects of expression, signaling mechanisms, physiologic function, and clinical importance // *Pharmacol. Rev.* 2014. T. 66. № 1. C. 308–333.
180. Oh S.J., Hwang S.J., Jung J., Yu K., Kim J., Choi J.Y., Hartzell H.C., Roh E.J., Justin Lee C. Monna, a potent and selective blocker for transmembrane protein with unknown function 16/anoctamin-1 // *Mol. Pharmacol.* 2013. T. 84. № 5. C. 726–735.
181. Okada T., Islam M.R., Tsiferova N.A., Okada Y., Sabirov R.Z. Specific and essential but not sufficient roles of LRRC8A in the activity of volume-sensitive outwardly rectifying anion channel (VSOR) // *Channels*. 2017. T. 11. № 2. C. 109–120.
182. Okada Y., Sabirov R.Z., Merzlyak P.G., Numata T., Sato-Numata K. Properties, Structures, and Physiological Roles of Three Types of Anion Channels Molecularly Identified in the 2010’s // *Front. Physiol.* 2021. T. 12. № 4. C. 203–220.
183. 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. T. 294. № 44. C. 16049–16061.
184. Oliveira Moreira D. De, Santo Neto H., Marques M.J. P2Y2 purinergic receptors are highly expressed in cardiac and diaphragm muscles of mdx mice, and their expression is decreased by suramin // *Muscle and Nerve*. 2017. T. 55. № 1. C. 116–121.

185. Opthof T., Jonge B. de, Jongsma H.J., Bouman L.N. Functional morphology of the pig sinoatrial node // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1987. T. 19. № 12. C. 1221–1236.
186. Opthof T., Jonge B. de, Mackaay A.J.C., Bleeker W.K., Masson-Pevet M., Jongsma H.J., Bouman L.N. Functional and morphological organization of the guinea-pig sinoatrial node compared with the rabbit sinoatrial node // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1985. T. 17. № 6. C. 549–564.
187. Opthof T., Jonge B. de, Masson-Pevet M., Jongsma H.J., Bouman L.N. Functional and morphological organization of the cat sinoatrial node // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1986. T. 18. № 10. C. 11–22.
188. Orlov S.N., Koltsova S. V., Kapilevich L. V., Dulin N.O., Gusakova S. V. Cation-chloride cotransporters: Regulation, physiological significance, and role in pathogenesis of arterial hypertension // *Biochem.* 2014. T. 79. № 13. C. 1546–1561.
189. Orlov S.N., Tremblay J., Hamet P. Cell volume in vascular smooth muscle is regulated by bumetanide-sensitive ion transport // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 1996. T. 270. № 5. C. 39–45.
190. Pakhomov N. V, Pustovit K.B., Abramochkin D. V, Kuz'min V.S. The role of diadenosine pentaphosphate and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) as potential nucleotide comediators in the adrenergic regulation of cardiac function // *Neurochem. J.* 2017. T. 11. № 1. C. 63–71.
191. Palmada M., Dieter M., Boehmer C., Waldegger S., Lang F. Serum and glucocorticoid inducible kinases functionally regulate ClC-2 channels // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. T. 321. № 4. C. 1001–1006.
192. Park K., Begenisich T., Melvin J.E. Protein kinase A activation phosphorylates the rat ClC-2 Cl⁻ channel but does not change activity // *J. Membr. Biol.* 2001. T. 182. № 1. C. 31–37.
193. Paulino C., Kalienkova V., Lam A.K.M., Neldner Y., Dutzler R. Activation mechanism of the calcium-activated chloride channel TMEM16A revealed by cryo-EM // *Nature.* 2017a. T. 552. № 7685. C. 421–425.
194. Paulino C., Neldner Y., Lam A.K.M., Kalienkova V., Brunner J.D., Schenck S., Dutzler R. Structural basis for anion conduction in the calcium-activated chloride channel TMEM16A // *Elife.* 2017b. T. 6. C. 1–23.
195. Pedemonte N., Galletta L.J.V. Structure and function of tmem16 proteins (anoctamins) // *Physiol. Rev.* 2014. T. 94. № 2. C. 419–459.
196. Pervaiz S., Kopp A., Kleist L. von, Stauber T. Absolute protein amounts and relative abundance of volume-regulated anion channel (VRAC) LRRC8 subunits in cells and tissues revealed by quantitative immunoblotting // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. T. 20. № 23. C. 5879.

197. Petrecca K., Shrier A. Spatial distribution of nerve processes and β -adrenoreceptors in the rat atrioventricular node // *J. Anat.* 1998. T. 192. № 4. C. 517–528.
198. Pierpont G.L., DeMaster E.G., Reynolds S., Pederson J., Cohn J.N. Ventricular myocardial catecholamines in primates // *J. Lab. Clin. Med.* 1985. T. 106. № 2. C. 205–210.
199. Pifferi S., Dibattista M., Menini A. TMEM16B induces chloride currents activated by calcium in mammalian cells // *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 2009. T. 458. № 6. C. 1023–1038.
200. Pritchard H.A.T., Leblanc N., Albert A.P., Greenwood I.A. Inhibitory role of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on TMEM16A-encoded calcium-activated chloride channels in rat pulmonary artery // *Br. J. Pharmacol.* 2014. T. 171. № 18. C. 4311–4321.
201. Pucéat M., Vassort G. Signalling by protein kinase C isoforms in the heart // *Mol. Cell. Biochem.* 1996. T. 157. № 1–2. C. 65–72.
202. Pustovit K.B., Abramochkin D. V. Effects of Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD⁺) and Diadenosine Tetraphosphate (Ap₄A) on Electrical Activity of Working and Pacemaker Atrial Myocardium in Guinea Pigs // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016. C. 1–4.
203. Pustovit K.B., Potekhina V.M., Ivanova A.D., Petrov A.M., Abramochkin D. V., Kuzmin V.S. Extracellular ATP and β -NAD alter electrical properties and cholinergic effects in the rat heart in age-specific manner // *Purinergic Signal.* 2019. T. 15. № 1. C. 09645.
204. Qiu Z., Dubin A.E., Mathur J., Tu B., Reddy K., Miraglia L.J., Reinhardt J., Orth A.P., Patapoutian A. SWELL1, a plasma membrane protein, is an essential component of volume-regulated anion channel // *Cell.* 2014. T. 157. № 2. C. 447–458.
205. Ralevic V., Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines // *Pharmacol. Rev.* 1998. T. 50. № 3. C. 413–492.
206. Reed K.E., Westphale E.M., Larson D.M., Wang H.Z., Veenstra R.D., Beyer E.C. Molecular cloning and functional expression of human connexin37, an endothelial cell gap junction protein // *J. Clin. Invest.* 1993. T. 91. № 3. C. 997–1004.
207. Riemann B., Schäfers M., Law M.P., Wichter T., Schober O. Radioligands for imaging myocardial α - and β -adrenoceptors // *Nuklearmedizin.* 2003. T. 42. № 01. C. 4–9.
208. Robinson R.B., LIU Q., Rosen M.R. Ionic basis for action potential prolongation by phenylephrine in canine epicardial myocytes // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2000. T. 11. № 1. C. 70–76.
209. Rodefeld M.D., Beau S.L., Schuessler R.B., Boineau J.P., Saffitz J.E. Beta-adrenergic and muscarinic cholinergic receptor densities in the human sinoatrial node: identification of a high beta 2-adrenergic receptor density // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 1996. T. 7. № 11. C. 1039–1049.

210. Roth N.S., Campbell P.T., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Lohse M.J. Comparative rates of desensitization of β -adrenergic receptors by the β -adrenergic receptor kinase and the cyclic AMP-dependent protein kinase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991. T. 88. № 14. C. 6201–6204.
211. Rudkouskaya A., Chernoguz A., Haskew-Layton R.E., Mongin A.A. Two conventional protein kinase C isoforms, α and β I, are involved in the ATP-induced activation of volume-regulated anion channel and glutamate release in cultured astrocytes // *J. Neurochem.* 2008. T. 105. № 6. C. 1–12.
212. Saeed Y., Temple I.P., Borbas Z., Atkinson A., Yanni J., Maczewski M., Mackiewicz U., Aly M., Logantha S.J.R.J., Garratt C.J., Dobrzynski H. Structural and functional remodeling of the atrioventricular node with aging in rats: The role of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated and ryanodine 2 channels // *Hear. Rhythm.* 2018. T. 15. № 5. C. 752–760.
213. Sano T., Tasaki M., Shimamoto T. Histologic examination of the origin of the action potential characteristically obtained from the region bordering the atrioventricular node // *Circ. Res.* 1959. T. 7. C. 700–704.
214. Sathnur N., Ebin E., Benditt D.G. Sinus Node Dysfunction // *Cardiol. Clin.* 2023. T. 41. № 3. C. 349–367.
215. Sato N., Tanaka H., Habuchi Y., Giles W.R. Electrophysiological effects of ibutilide on the delayed rectifier K^+ current in rabbit sinoatrial and atrioventricular node cells // *Eur. J. Pharmacol.* 2000. T. 404. № 3. C. 281–288.
216. Satoh H. Sino-atrial nodal cells of mammalian hearts: ionic currents and gene expression of pacemaker ionic channels. // *J. smooth muscle Res.* 2003. T. 39. № 5. C. 175–193.
217. Schulte G. International Union of Basic and Clinical // *Pharmacol. Rev.* 2010. T. 62. № 4. C. 632–667.
218. Sesti C., Broekman M.J., Drosopoulos J.H.F., Islam N., Marcus A.J., Levi R. EctoNucleotidase in cardiac sympathetic nerve endings modulates ATP-mediated feedback of norepinephrine release. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002. T. 300. № 2. C. 605–611.
219. Seyama I. Characteristics of the anion channel in the sino-atrial node cell of the rabbit // *J. Physiol.* 1979. T. 294. № 1. C. 447–460.
220. Sherry A.M., Stroffekova K., Knapp L.M., Kupert E.Y., Cuppoletti J., Malinowska D.H. Characterization of the human pH- and PKA-activated CIC-2G(2 α) Cl⁻ channel // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 1997. T. 273. № 2. C. 42–52.
221. Simon A.M., Goodenough D.A., Paul D.L. Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block // *Curr. Biol.* 1998.

T. 8. № 5. C. 295–298.

222. Sipido K.R., Callewaert G., Carmeliet E. $[Ca^{2+}]_i$ transients and $[Ca^{2+}]_i$ -dependent chloride current in single Purkinje cells from rabbit heart // *J. Physiol.* 1993. T. 468. № 1. C. 641–667.

223. Skeberdis V.A., Gendviliene V., Zablockaitė D., Treinys R., Macyskiene R., Bogdelis A., Jurevicius J., Fischmeister R. β_3 -adrenergic receptor activation increases human atrial tissue contractility and stimulates the L-type Ca^{2+} current // *J. Clin. Invest.* 2008.

224. Smith J.B., Smith L. $Na^+/K^+/Cl^-$ cotransport in cultured vascular smooth muscle cells: Stimulation by angiotensin II and calcium ionophores, inhibition by cyclic AMP and calmodulin antagonists // *J. Membr. Biol.* 1987. T. 99. № 1. C. 51–63.

225. Sperlágh B., Erdélyi F., Szabó G., Vizi E.S. Local regulation of $[^3H]$ -noradrenaline release from the isolated guinea-pig right atrium by P2X-receptors located on axon terminals // *Br. J. Pharmacol.* 2000. T. 131. № 8. C. 1775–1783.

226. Steinberg S.F. Cardiac actions of protein kinase C isoforms // *Physiology.* 2012. T. 27. № 3. C. 130–139.

227. Tabcharani J.A., Rommens J.M., Hou Y.X., Chang X.B., Tsui L.C., Riordan J.R., Hanrahan J.W. Multi-ion pore behaviour in the CFTR chloride channel // *Nature.* 1993. T. 366. № 6450. C. 79–82.

228. Takata K., Adachi Y.U., Suzuki K., Obata Y., Sato S., Nishiwaki K. Dexmedetomidine-induced atrioventricular block followed by cardiac arrest during atrial pacing: A case report and review of the literature // *J. Anesth.* 2014. T. 28. № 1. C. 116–120.

229. Tang X., Downes C.P. Purification and characterization of $G\beta\gamma$ -responsive phosphoinositide 3-kinases from pig platelet cytosol // *J. Biol. Chem.* 1997. T. 272. № 22. C. 14193–14199.

230. Tapilina S. V., Abramochkin D. V., Sukhova G.S., Rosenshtaukh L. V. Cholinergic Inexcitability in the Sinoatrial Node of the Mouse // *Dokl. Biol. Sci.* 2010. T. 435. № 1. C. 393–397.

231. Taussig R., Tang W.J., Hepler J.R., Gilman A.G. Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases // *J. Biol. Chem.* 1994. T. 269. № 8. C. 6093–6100.

232. Tavernier G., Toumaniantz G., Erfanian M., Heymann M., Laurent K., Langin D., Gauthier C. β_3 -Adrenergic stimulation produces a decrease of cardiac contractility *ex vivo* in mice overexpressing the human β_3 -adrenergic receptor // *Cardiovasc. Res.* 2003. T. 59. № 2. C. 288–296.

233. Tokunaga T., Katsuragi T., Sato C., Furukawa T. ATP release evoked by isoprenaline from adrenergic nerves of guinea pig atrium // *Neurosci. Lett.* 1995. T. 186. № 2–3. C. 95–98.

234. Uhlen M., Uhlén M., Fagerberg L., Hallström B.M., Hallstrom B.M., Lindskog C., Oksvold P., Mardinoglu A., Sivertsson A., Sivertsson A., Kampf C., Sjöstedt E., Sjostedt E., Asplund A., Olsson I., Edlund K., Lundberg E., Navani S., Szigartyo C.A.-K., Odeberg J., Djureinovic D., Takanen J.O., Hober S., Alm T., Edqvist P.H., Edqvist P.-H., Berling H., Tegel H., Mulder J., Rockberg J., Nilsson P., Schwenk J.M., Hamsten M., Feilitzen K. von, Feilitzen K. von, Forsberg M., Persson L., Johansson F., Zwahlen M., Heijne G. von, Heijne G. von, Nielsen J., Ponten F., Ponten F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. // *Science* (80-.). 2015. T. 347. № 6220.
235. Uramoto H., Takahashi N., Dutta A.K., Sabirov R.Z., Ando-Akatsuka Y., Morishima S., Okada Y. Ischemia-Induced Enhancement of CFTR Expression on the Plasma Membrane in Neonatal Rat Ventricular Myocytes // *Jpn. J. Physiol.* 2003. T. 53. № 5. C. 357–365.
236. Vega R.B., Harrison B.C., Meadows E., Roberts C.R., Papst P.J., Olson E.N., McKinsey T.A. Protein Kinases C and D Mediate Agonist-Dependent Cardiac Hypertrophy through Nuclear Export of Histone Deacetylase 5 // *Mol. Cell. Biol.* 2004. T. 24. № 19. C. 8374–8385.
237. Vocke K., Dauner K., Hahn A., Ulbrich A., Broecker J., Keller S., Frings S., Möhrlein F. Calmodulin-dependent activation and inactivation of anoctamin calcium-gated chloride channels // *J. Gen. Physiol.* 2013. T. 142. № 4. C. 381–404.
238. Vogel S.M., Terzic A. α -Adrenergic regulation of action potentials in isolated rat cardiomyocytes // *Eur. J. Pharmacol.* 1989. T. 164. № 2. C. 231–239.
239. Voss F.K., Ullrich F., Münch J., Lazarow K., Lutte D., Mah N., Andrade-Navarro M.A., Kries J.P. Von, Stauber T., Jentsch T.J. Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC // *Science* (80-.). 2014. T. 344. № 6184.
240. Wang H.-S. Critical role of bicarbonate and bicarbonate transporters in cardiac function // *World J. Biol. Chem.* 2014. T. 5. № 3. C. 334.
241. Wang T., Wang B. Identification of microRNA-mRNA interactions in atrial fibrillation using microarray expression profiles and bioinformatics analysis // *Mol. Med. Rep.* 2016. T. 13. № 6. C. 4535–4540.
242. Weinreich F., Jentsch T.J. Pores Formed by Single Subunits in Mixed Dimers of Different CLC Chloride Channels // *J. Biol. Chem.* 2001. T. 276. № 4. C. 2347–2353.
243. Woodcock E.A., Matkovich S.J. Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005. T. 37. № 9. C. 1746–1751.
244. Wright C.D., Chen Q., Baye N.L., Huang Y., Healy C.L., Kasinathan S., O’Connell T.D. Nuclear α 1-adrenergic receptors signal activated ERK localization to caveolae in adult cardiac

- myocytes // *Circ. Res.* 2008. T. 103. № 9. C. 992–1000.
245. Wu M.M., Lou J., Song B.L., Gong Y.F., Li Y.C., Yu C.J., Wang Q.S., Ma T.X., Ma K., Hartzell H.C., Duan D.D., Zhao D., Zhang Z.R. Hypoxia augments the calcium-activated chloride current carried by anoctamin-1 in cardiac vascular endothelial cells of neonatal mice // *Br. J. Pharmacol.* 2014. T. 171. № 15. C. 3680–3692.
246. Wu S.C., O'Connell T.D. Nuclear Compartmentalization of α_1 -Adrenergic Receptor Signaling in Adult Cardiac Myocytes editorial: A nuclear option? G-protein coupled receptors at the nucleus in cardiac myocytes // *J. Cardiovascular Pharmacol. Cardiovasc Pharmacol* Ô. 2015. T. 6565. № 2. C. 9089–9091.
247. Xiao R.P., Zhu W., Zheng M., Cao C., Zhang Y., Lakatta E.G., Han Q. Subtype-specific α_1 - and β -adrenoceptor signaling in the heart // *Trends Pharmacol.Sci.* 2006. T. 27. № 6. C. 330–337.
248. Yang H., Kim A., David T., Palmer D., Jin T., Tien J., Huang F., Cheng T., Coughlin S.R., Jan Y.N., Jan L.Y. TMEM16F Forms a Ca^{2+} -Activated Cation Channel Required for Lipid Scrambling in Platelets during Blood Coagulation // *Cell.* 2012. T. 151. № 1. C. 111–122.
249. Yang Y.D., Cho H., Koo J.Y., Tak M.H., Cho Y., Shim W.S., Park S.P., Lee J., Lee B., Kim B.M., Raouf R., Shin Y.K., Oh U. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance // *Nature.* 2008. T. 455. № 7217. C. 1210–1215.
250. Yannoukakos D., Stuart-Tilley A., Fernandez H.A., Fey P., Duyk G., Alper S.L. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of two isoforms of the AE3 anion exchanger from human heart // *Circ. Res.* 1994. T. 75. № 4. C. 603–614.
251. Yoo S., Dobrzynski H., Fedorov V. V., Xu S.Z., Yamanushi T.T., Jones S.A., Yamamoto M., Nikolski V.P., Efimov I.R., Boyett M.R. Localization of Na^+ channel isoforms at the atrioventricular junction and atrioventricular node in the rat // *Circulation.* 2006. T. 114. № 13. C. 1360–1371.
252. Yuill K.H., Hancox J.C. Characteristics of single cells isolated from the atrioventricular node of the adult guinea-pig heart // *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 2002. T. 445. № 3. C. 311–320.
253. Zhang S., Coso O.A., Collins R., Silvio Gutkind J., Simonds W.F. A C-terminal mutant of the G protein β subunit deficient in the activation of phospholipase C- β // *J. Biol. Chem.* 1996. T. 271. № 33. C. 20208–20212.
254. Zhou S., Paz O., Cao J.-M., Asotra K., Chai N.-N., Wang C., Chen L.S., Fishbein M.C., Sharifi B., Chen P.-S. Differential β -adrenoceptor expression induced by nerve growth factor infusion into the canine right and left stellate ganglia // *Hear. Rhythm.* 2018. T. 2. № 12. C. 1347–

1355.

255. Воронина Я.А., Кузьмин В.С. Влияние пробенцида 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.

256. Воронина Я.А., Кархов А.М., Кузьмин В.С. Современные представления о структурной основе и молекулярных механизмах трансмембранного транспорта Cl⁻ - в кардиомиоцитах // 2024. Т. 79. № 2S. С. 22–36.

257. Воронина Я.А., Федоров А.В., Челомбитько М.А., Пиунова У.Е., Кузьмин В.С. α1-адренорецепторы регулируют пейсмекерную функцию синоатриального узла сердца, оказывая влияние на хлорный трансмембранный транспорт // Биологические Мембраны. 2024. Т. 41. № 1. С. 58–72.

258. Гайнуллина Д.К., Тарасова О.С., Швецова А.А. Регуляция сокращения гладкомышечных клеток сосудов в раннем постнатальном онтогенезе // Вестник московского университета. Серия 16. Биология. 2024. Т. 79. № 2S. С. 55–64.

259. 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. 11. С. 536–542.

260. Кузьмин В.С., Абрамочкин Д.В., Закарян А.А., Сухова Г.С., Розенштраух Л.В. Влияние пуриновых нуклеотидов и аденозина на биоэлектрическую активность сердца летучей мыши *Pipistrellus nathusii* // Кардиология. 2008a. Т. 48. № 8. С. 46–48.

261. Кузьмин В.С., Абрамочкин Д.В., Сухова Г.С., Розенштраух Л.В. Влияние АДФ-рибозы, АМФ и аденозина на электрическую активность в предсердии и папиллярной мышце гибернирующего суслика // Кардиология. 2008b. Т. 48. № 11. С. 53–60.

262. 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.

263. Мансур Н., Зиятдинова Н.И., Галиева А.М., Шакиров Р.Р., Зефирова Т.Л. Влияние стимуляции α1-адренорецепторов на электрическую активность предсердий крысы // Биофизика. 2023. Т. 68. № 4. С. 748–753.

264. Пустовит К.Б., Иванова А.Д., Кузьмин В.С. Внеклеточный НАД⁺ подавляет адренергические эффекты в предсердном миокарде крыс на раннем этапе постнатального онтогенеза // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2018. Т. 165. № 1. С. 4–

8.

265. Пустовит К.Б., Кузьмин В.С., Сухова Г.С. Влияние внеклеточного никотинамидадениндинуклеотида (NAD⁺) на биоэлектрическую активность пейсмекера и проводящей системы сердца // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 159. № 2. С. 144–147.