

Каримова В. М.¹, Кузьмин В. С.^{1,2}, Розенштраух Л. В.²

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», Москва

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава РФ, Москва

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АДРЕНЕРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИОКАРДА ЛЕГОЧНЫХ ВЕН

Ключевые слова: миокардиальная обкладка, легочные вены, потенциал покоя, адренергическая регуляция, протеинкиназа С, ингибиторы протеинкиназы А, аритмия.

Ссылка для цитирования: Каримова В. М., Кузьмин В. С., Розенштраух Л. В. Внутриклеточные молекулярные механизмы адренергической регуляции мембранного потенциала миокарда легочных вен. *Кардиология*. 2017;57(11):34–41.

РЕЗЮМЕ

Миокардиальная ткань стенки легочных вен (ЛВ) млекопитающих и человека обладает рядом электрофизиологических свойств, которые способствуют возникновению в данной структуре предсердных аритмий, в том числе фибрилляции предсердий. Одним из таких свойств является нестабильный уровень мембранного потенциала покоя (ПП), колебания которого усиливаются при адренергической стимуляции. Установлено, что активация β -адренорецепторов приводит к гиперполяризации ПП, а активация α_1 -адренорецепторов – к деполяризации ПП в ЛВ. Внутриклеточные механизмы, определяющие разнонаправленные сдвиги ПП в ЛВ при α_1 - и β -адренергической стимуляции, не исследованы. С помощью стандартной микроэлектродной техники в многоклеточных изолированных перфузируемых препаратах ЛВ крысы показано, что форсколин вызвал гиперполяризацию, сравнимую по величине с таковой при действии агониста β -адренорецепторов изопротеренола. Ингибиторы протеинкиназы А (РКА) KT5720, H-89 и Rp-adenosine-cAMP подавляли гиперполяризующий эффект изопротеренола. Ингибирование фосфолипазы С и D (PLC, PLD), а также протеинкиназы С (РКС) не влияло на деполяризацию, вызываемую агонистом α_1 -адренорецепторов фенилэфрином. Таким образом, β -адренергическая гиперполяризация ПП в миокардиальной ткани ЛВ крысы в значительной степени обусловлена «классическим» cAMP-зависимым сигнальным каскадом и РКА. Деполяризация ПП, возникающая в ответ на стимуляцию α_1 -адренорецепторов в ЛВ, и скорее всего, не связана с активацией PLC, PLD, PKC и фосфатидилинозитольным сигнальным каскадом.

Karimova V. M.¹, Kuzmin V. S.^{1,2}, Rosenshtraukh L. V.²

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² National Medical Research Center for Cardiology, Moscow, Russia

INTRACELLULAR MOLECULAR MECHANISMS OF ADRENERGIC REGULATION OF PULMONARY VEIN MYOCARDIUM MEMBRANE POTENTIAL

Keywords: myocardial sleeves; pulmonary veins; resting potential; adrenergic regulation; protein kinase C; protein kinase A; arrhythmia

For citation: Karimova V. M., Kuzmin V. S., Rosenshtraukh L. V. Intracellular Molecular Mechanisms of Adrenergic Regulation of Pulmonary Vein Myocardium Membrane Potential. *Kardiologiia*. 2017;57(11):34–41.

SUMMARY

Pulmonary vein (PV) myocardium is characterized by numerous electrophysiological properties which make this tissue highly prone to spontaneous, ectopic activity partially due to resting potential (RP) instability. PV derived ectopy frequently underlies supraventricular arrhythmias, including atrial fibrillation. It has also been demonstrated that adrenergic stimulation causes proarrhythmic alterations in PV. Selective α_1 - and β -adrenoreceptors stimulation causes RP depolarization and hyperpolarization, respectively, at least in rats. The intracellular mechanisms of α_1 - and β -adrenoreceptors-dependent RP drifts are not investigated. Adenylate cyclase (AC) activator forskolin similarly to selective β -adrenoreceptors agonist isoproterenol (ISO) induced strong hyperpolarization in quiescent isolated perfused multicellular preparations of rat PV. Maximal value of hyperpolarization in PV was equal after application of both compounds. Protein kinase A (PKA) inhibitors KT5720, H-89 and Rp-adenosine-cAMP suppressed ISO-induced hyperpolarization in PV. Inhibitors of phospholipase C (U73122) or D (FPLI), similarly to protein kinase C (PKC) inhibitor chelerythrine, failed to suppress α -adrenoreceptors-dependent phenylephrine-induced depolarization in rat PV myocardium. These results allow us to suggest that β -adrenoreceptors-dependent RP hyperpolarization in quiescent rat PV myocardium is only partially mediated by cAMP-dependent signal transduction pathway and by PKA. Besides, PKA-independent mechanisms also contribute to β -agonists effects in PV. In addition, α -adrenoreceptors-dependent depolarization in rat PV myocardium could be independent on PLC and PKC.

В настоящее время показано, что у большинства млекопитающих животных и у человека участки стенок легочных вен (ЛВ), прилегающие к левому предсердию (ЛП), содержат кардиомиоциты, формирующие миокардиальную ткань в стенках данных сосудов, так называемые «миокардиальные рукава», «миокардиальные обкладки» ЛВ [1]. В последние два десятилетия «миокардиальная обкладка» ЛВ является объектом пристального внимания, так как предполагается, что именно эта область служит источником активности, приводящей к возникновению суправентрикулярных аритмий, в том числе фибрилляции предсердий (ФП) [2]. Миокардиальная ткань ЛВ обладает рядом типичных для предсердного миокарда свойств – способностью проводить волну возбуждения, генерировать потенциалы действия (ПД). Вместе с тем миокардиальная обкладка ЛВ обладает рядом специфических биоэлектрических свойств, которые наряду с другими факторами делают эту ткань аритмогенной. К таким свойствам ЛВ относится способность генерировать спонтанные ПД, формировать триггерную активность; для ЛВ также характерен нестабильный уровень мембранного потенциала покоя (ПП) [3–5]. Последнее свойство проявляется особенно сильно в тех условиях, когда миокард ЛВ лишен нормальной активации со стороны синоатриального узла. В случае, если миокардиальная ткань ЛВ ритмически возбуждается, ПП поддерживается на уровне, характерном для рабочего миокарда (–80 мВ). Однако, когда ритмическая стимуляция и возбуждение миокардиальной ткани в ЛВ прерываются, например, в результате блокады проведения возбуждения из предсердий, ПП спонтанно смещается (деполяризуется) до уровня, характерного для пейсмекерных клеток (–65–55 мВ). Предполагается, что нестабильный и низкий уровень ПП облегчает возникновение «аритмогенных» явлений в ЛВ [6].

Хорошо известно, что симпатические или адренергические воздействия играют значительную роль в инициации предсердных аритмий, в том числе и за счет влияния на миокардиальную ткань ЛВ. В экспериментальных условиях было показано, что адренергическая стимуляция усиливает аритмогенные свойства миокардиальной обкладки ЛВ у различных млекопитающих [7–9] за счет влияния на биоэлектрическую активность. Спонтанные ПД лежат в основе эктопии ЛВ [10].

Миокардиальные обкладки ЛВ богато иннервированы. Показано, что в данной ткани содержатся симпатические терминалы, а на мембране кардиомиоцитов имеются адренорецепторы [11]. На примере экспериментальных животных (крысы, собаки) установлено, что активация норадреналином приводит к разнона-

правленным сдвигам ПП в покое (т. е. лишенном ритмической активации со стороны синусного узла) миокарде ЛВ [3]. Неизвестно, каковы механизмы данных эффектов, однако их понимание позволило бы приблизиться к выяснению молекулярных основ возникновения предсердных нарушений ритма сердца.

Данная работа направлена на решение одного из аспектов указанной проблемы – исследование роли внутриклеточных сигнальных каскадов в гиперполяризации и деполяризации ПП, вызываемой, соответственно, активацией β - либо α_1 -адренорецепторов в миокардиальной ткани ЛВ.

Экспериментальная часть

Экспериментальные животные

В работе использовали самцов крыс массой 250–300 г (возраст около 8 нед). Животные были получены из питомника ФГБУ «НЦ биомедицинских технологий» ФМБА. Перед экспериментом животных содержали в течение 4 нед в виварии в стандартных условиях, при 12-часовом световом дне с доступом к пище *ad libidum*. Эксперименты проводили на изолированных многоклеточных препаратах, включающих участки ЛВ и участок ЛП. Всего получено 78 препаратов.

Эксперименты на животных выполнены в соответствии с актуальными требованиями по содержанию и использованию лабораторных животных. Экспериментальный протокол был одобрен Комитетом по биоэтике Московского государственного университета.

Регистрация ПП и ПД

Крыс декапитировали, вскрывали грудную клетку, извлекали сердце, выделяли ЛП и ЛВ, идущую от левой доли легкого. Регистрировали ПП в дистальной части ЛВ и в предсердной части препарата с помощью стандартной микроэлектродной техники, подробно описанной ранее [12, 13]. Для отведения ПП использовали стеклянные микроэлектроды (сопротивлением 15–30 МОм), подключенные к усилителю (A–M system 1600, США). Усиленный сигнал поступал на АЦП (E-154, L–Card) и далее на компьютер для записи. Запись и анализ сигнала осуществляли с помощью программы Power Graph 3.3.

ПП регистрировали с эндокардиальной стороны препаратов после получасового периода адаптации, в течение которого препараты работали в навязанном ритме (частота 3,3 Гц, длительность импульса 2 мс, амплитуда 3–10 В). Препараты перфузировали при температуре 37°C оксигенированным (O_2 95%, CO_2 5%) раствором Тироде (состав, mM: NaCl – 129, KCl – 4, NaH_2PO_4 – 20,9, $MgSO_4$ – 0,5, $NaHCO_3$ – 20, $CaCl_2$ – 1,2, глюкоза – 5, pH 7,2–7,4) со скоростью потока 10 мл/мин.

Протоколы экспериментов

Эксперименты, направленные на выявление эффектов агонистов адrenoрецепторов на ПП в АВ, проводили по следующей схеме: после получасового периода адаптации в течение 1–2 мин регистрировали ПД, затем прекращали стимуляцию. Непосредственно после прекращения стимуляции следовал период стабилизации ПП, который в АВ продолжался в течение 4–6 мин. По окончании периода стабилизации ПП подавали агонисты адrenoрецепторов (15 мин): фенилэфрин (α_1 -агонист), изопроterenол (β -агонист). Таким образом, исследовали влияние агонистов адrenoрецепторов на миокард АВ или рабочий миокард предсердий, находящийся в покое состоянии. В течение всего эксперимента после прекращения стимуляции ПП регистрировали непрерывно, что позволяло наблюдать изменения ПП в одной клетке.

Эксперименты по изучению внутриклеточных каскадов, активируемых при стимуляции адrenoрецепторов, выполняли с использованием блокаторов ферментов, участвующих в соответствующих каскадах. В случае активации α_1 -адrenoрецепторов после прекращения стимуляции и стабилизации ПП в препаратах АВ сначала подавали блокатор в течение 5–10 мин, а затем на его фоне подавали фенилэфрин в течение 10 мин. В случае активации β -адrenoрецепторов изопроterenолом после развития максимального эффекта агониста подавали блокатор в течение 7–10 мин.

Реактивы и материалы

В работе были использованы агонисты β - и α_1 -адrenoрецепторов изопроterenол (10 мкМ), фенилэфрин (10 мкМ), соответственно; ингибитор фосфолипазы C U-73122 (0,5 мкМ), ингибитор фосфолипазы D FIPI (0,1 мкМ), ингибитор РКС хелеритрин (1 мкМ), неселективный блокатор хлорных каналов SITS (100 мкМ). Кроме того, применяли активатор аденилатциклазы форсколин (50 мкМ), неселективный ингибитор cAMP и cGMP фосфодиэстераз 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, 10 мкМ), селективные ингибиторы протеинкиназы A: H-89 (5 мкМ), KT5720 (0,1 мкМ), Adenosine-3',5'-cyclic Monophosphothioate, Rp-Isomer. sodium salt (Rp-adenosine-cAMP, 5 мкМ).

Статистическая обработка данных

Статистически значимые различия выявляли с помощью непараметрических критериев для связанных и несвязанных выборок – критерий Вилкоксона (T), Манна-Уитни (U). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные в группах представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение.

Результаты

Влияние агониста β -адrenoрецепторов изопроterenола на ПП в АВ

В первой части экспериментов использовали изопроterenол – селективный агонист β -адrenoрецепторов. Изопроterenол (10 мкМ) вызвал значительную гиперполяризацию ПП в покое лежащих препаратах АВ, которая составила 10 ± 2 мВ ($n=20$; $p(T) < 0,05$). ПП при дей-

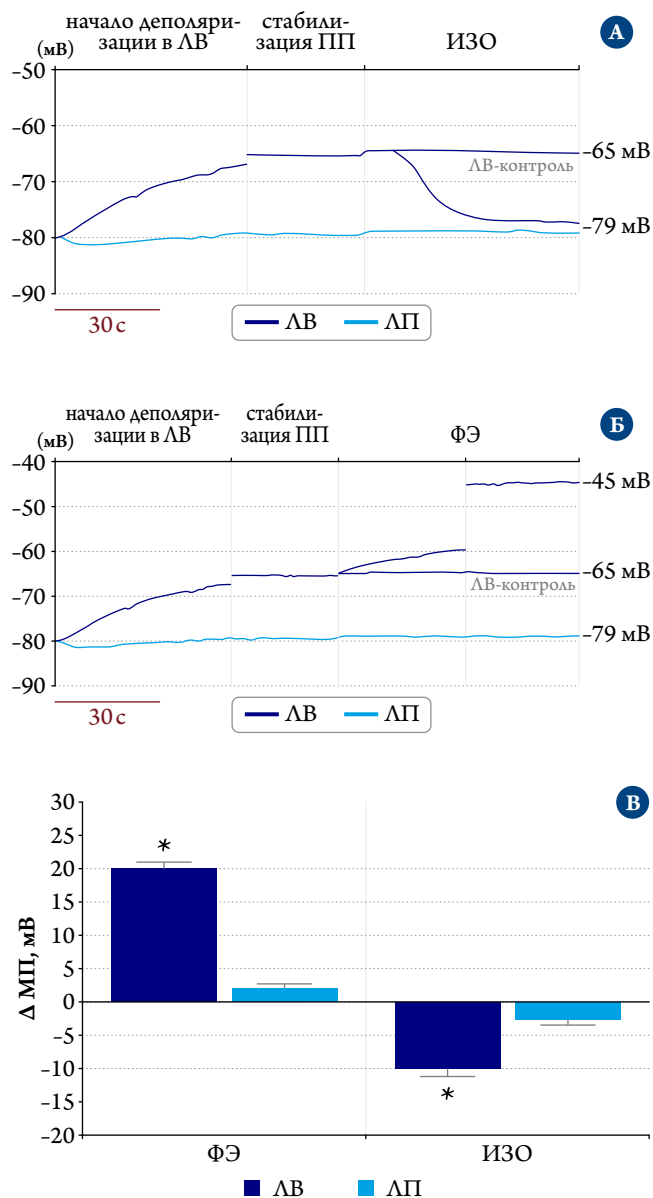


Рис. 1. ПП в миокарде АВ крысы при действии агонистов α - и β -адrenoрецепторов.

А. Пример изменения ПП в миокарде АВ (синие кривые) и в ЛП (голубые кривые) при действии изопроterenола; Б. Пример изменения ПП в миокарде АВ и ЛП при действии фенилэфрина, показан эффект фенилэфрина на 10-й минуте действия вещества; В. Изменение мембранного потенциала (Δ МП) в миокарде АВ (синие столбики) и в препаратах ЛП (голубые столбики) при действии фенилэфрина (ФЭ, 10 мкМ) и изопроterenола (ИЗО, 10 мкМ). * – $p(T) < 0,01$. Здесь и на рис. 2, 3: ПП – правое предсердие; АВ – легочные вены; ЛП – левое предсердие.

ствии изопротеренола сдвигался от -65 ± 3 до -75 ± 2 мВ (рис. 1, А, В). Эффект развивался сразу после начала подачи изопротеренола и достигал максимума спустя 2–3 мин его действия. В отличие от АВ, в препаратах ЛП изопротеренол вызывал незначительную гиперполяризацию (2–4 мВ; см. рис. 1, В).

Роль аденилатциклазы, фосфодиэстераз, протеинкиназы С в β -адренергической гиперполяризации ПП в АВ

Активатор АС форсколин (50 мкМ) вызывал быструю гиперполяризацию мембранного потенциала в АВ на 11 ± 2 мВ ($n=6$; $p(T) < 0,01$; рис. 2, А, В).

Неселективный ингибитор фосфодиэстераз IBMX при самостоятельном действии вызывал гиперполяризацию ПП в препаратах АВ крысы на 6 ± 3 мВ ($n=6$; $p(T) < 0,05$; см. рис. 2, В).

Далее было изучено влияние различных ингибиторов РКА (Н-89, КТ5720 и Rp-adenosine-cAMP) на эффекты изопротеренола в миокардиальной ткани АВ. Сами блокаторы РКА не приводили к изменению ПП в АВ. Однако все блокаторы существенно подавляли гиперполяризацию, вызванную изопротеренолом, при этом ПП сдвигался в положительную сторону от уровня, наблюдаемого при действии изопротеренола. Наиболее выраженный эффект наблюдался при действии КТ5720 (0,1 мкМ) – данный блокатор вызывал снижение эффекта изопротеренола на $67 \pm 4\%$ ($n=5$; рис. 2, Б; $p(U) < 0,05$). Н-89 (5 мкМ) подавлял эффект изопротеренола на $42 \pm 5\%$, а Rp-adenosine-cAMP – на $30 \pm 3\%$ ($n=6$ для каждого из блокаторов; во всех случаях $p(U) < 0,05$; см. рис. 2, В).

Влияние агониста α -адренорецепторов фенилэфрина на ПП в АВ

Во второй части экспериментов использовали агонист α_1 -адренорецепторов фенилэфрин. В противоположность β -агонисту изопротеренолу фенилэфрин (10 мкМ) вызывал выраженную деполяризацию ПП в покоящихся препаратах АВ. При действии фенилэфрина в течение 10 мин наблюдали сдвиг ПП на 20 ± 2 мВ ($n=10$; $p(T) < 0,01$, от контрольного значения -65 ± 2 мВ, до -45 ± 3 мВ при действии фенилэфрина). Эффект начал проявляться через 3–4 мин после начала действия фенилэфрина и сохранялся в течение всего времени подачи фенилэфрина (см. рис. 1, Б).

Роль фосфолипаз С и D, протеинкиназы С, хлорных токов в α_1 -адренергической деполяризации ПП в АВ

Ингибиторы фосфолипаз С и D, протеинкиназы С не оказывали статистически значимого влияния на уровень ПП в АВ (аппликация в течение 10 мин; $n=6$; $p(T)$

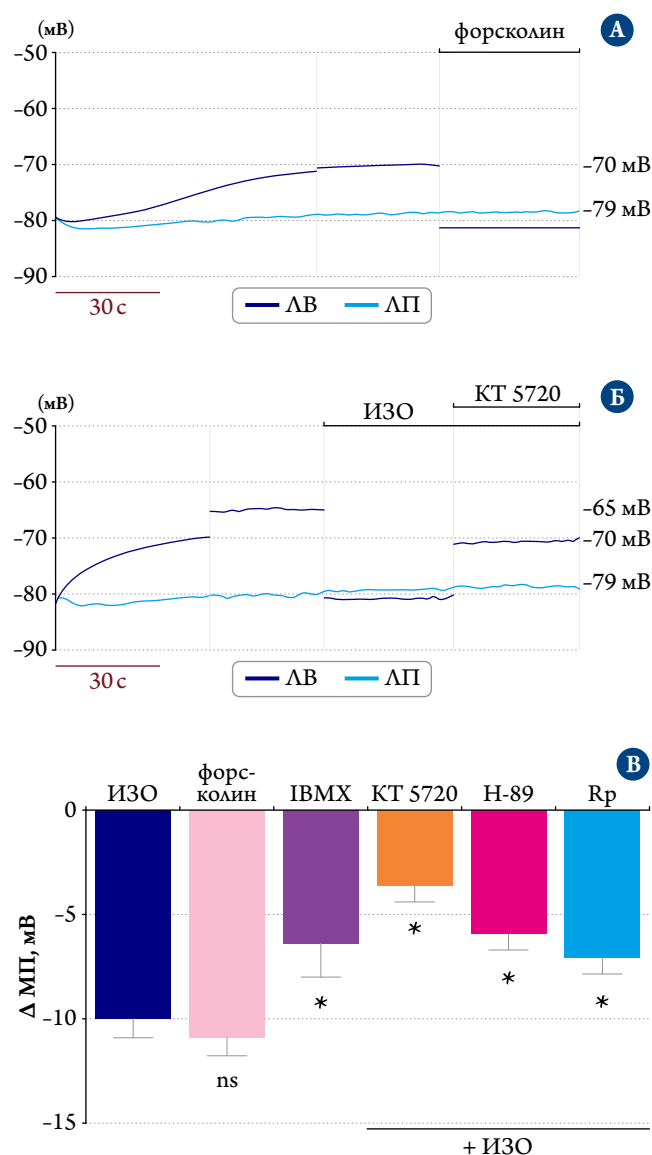


Рис. 2. ПП в миокарде АВ крысы при действии агониста β -адренорецепторов изопротеренола, а также блокаторов соединений сигнального каскада β -адренорецепторов.

А. Пример записи ПП в миокарде легочных вен (АВ, синие кривые) и ЛП (ЛП, голубые кривые) крысы в контроле и при действии активатора аденилатциклазы форсколина (50 мкМ);

Б. Изменение ПП в миокарде АВ крысы при действии изопротеренола на фоне ингибитора РКА КТ5720 (0,1 мкМ);

В. Изменение мембранного потенциала (Δ МП) в АВ, вызванное изопротеренолом, форсколином, IBMX и изопротеренолом на фоне различных ингибиторов РКА.

* – $p(U) < 0,05$. Здесь и на рис. 3 ns – статистически незначимо.

$> 0,5$ для U – 73 122; $n=5$, $p(T) > 0,5$ для FIPI; $n=5$, $p(T) > 0,5$ для хелеритрина). Кроме того, ни один из блокаторов не подавлял деполяризацию, вызванную фенилэфрином ($p(U) > 0,5$; рис. 3, А, Б, Г).

В дополнительной серии экспериментов мы использовали блокатор хлорных каналов SITS (100 мкМ). При самостоятельном действии SITS в покоящемся миокарде АВ вызывал гиперполяризацию; этот эффект

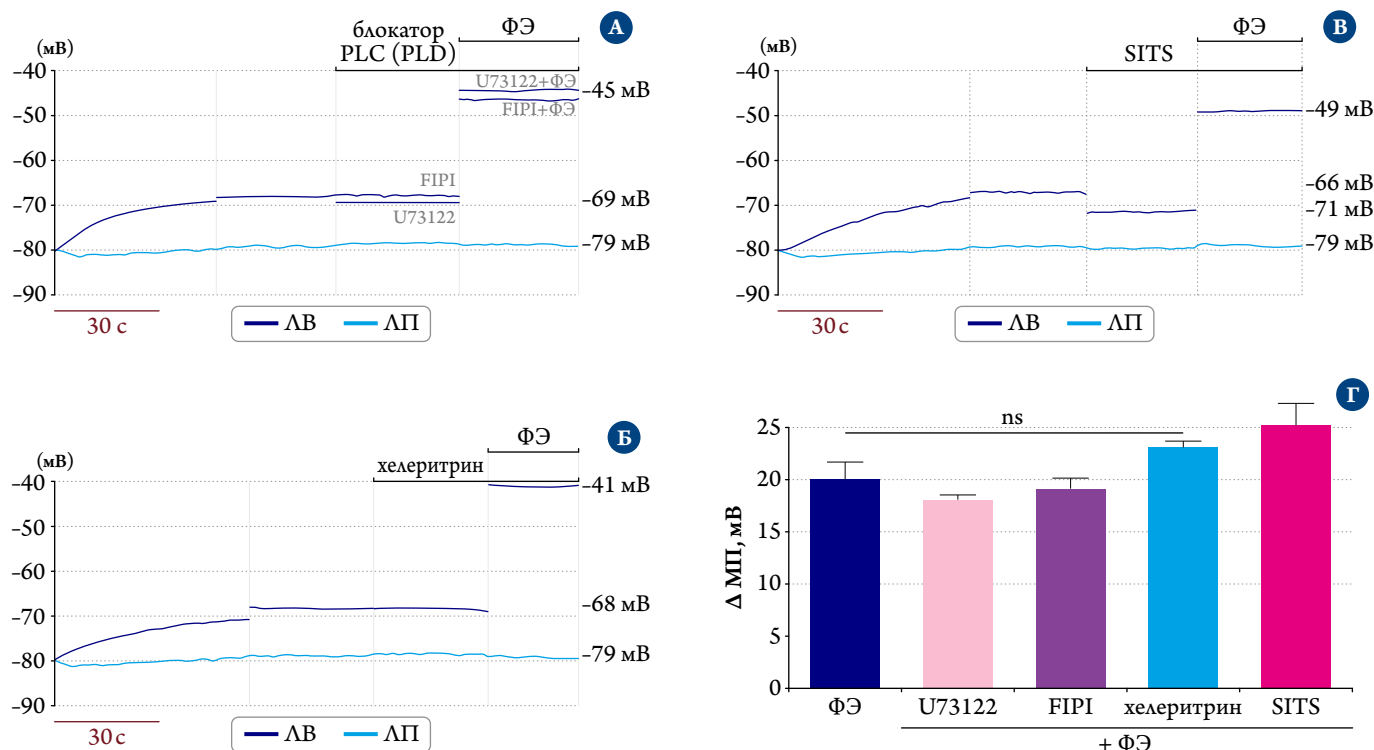


Рис. 3. Пример записи ПП в миокарде ЛВ и АП в контроле, при действии агониста α -адренорецепторов фенилэфрина (10 мкМ), а также при действии различных блокаторов соединений – участников данного сигнального каскада.

А. Изменение ПП в миокарде ЛВ при аппликации ингибиторов PLC (U – 73122, 0,5 мкМ) и PLD (FIP1, 0,1 мкМ), а также при действии ингибиторов фосфолипаз на фоне фенилэфрина;

Б. Изменение ПП в миокарде ЛВ при аппликации ингибитора РКС хелеритрина (1 мкМ) и действии фенилэфрина на фоне данного ингибитора;

В. Пример записи ПП в миокарде ЛВ в контроле, при действии блокатора хлорных токов SITS (100 мкМ) и при действии фенилэфрина на фоне SITS;

Г. Изменение мембранного потенциала (Δ МП) в ЛВ, вызванное действием агониста α -адренорецепторов фенилэфрина, а также при действии фенилэфрина на фоне блокаторов различных соединений сигнального каскада, активируемого при α -стимуляции.

развивался в течение 2–3 мин. SITS вызывал сдвиг ПП на $6,5 \pm 2$ мВ ($n=3$), и мембранный потенциал при его действии составлял $-71,5 \pm 2$ мВ. Тем не менее SITS не подавлял эффекты (деполяризацию ПП), вызываемые в миокардиальной ткани ЛВ фенилэфрином (см. рис. 3, В). В данной группе экспериментов деполяризация, развивающаяся при действии фенилэфрина на фоне SITS (25 ± 3 мВ, $n=3$), оказывалась сходной либо выше, чем деполяризация, наблюдаемая при самостоятельном действии фенилэфрина (20 ± 2 мВ).

Обсуждение

Показано, что уровень ПП в миокардиальной ткани ЛВ крысы зависит от режима работы ткани. В случае, если миокард ЛВ находится в покое, ПП достигает значений -68 – -60 мВ. При таком ПП в ЛВ возможна значительная (около 10 мВ) гиперполяризация (т.е. сдвиг в сторону отрицательных значений) вплоть до уровня, близкого к калиевому равновесному потенциалу, при действии различных факторов. Кроме того, в покое миокарде ЛВ возможна дальнейшая деполяризация ПП. Как было установлено ранее,

норадреналин последовательно вызывает разнонаправленные изменения ПП, и такое его действие связано с активацией α - и β -адренорецепторов [3]. В наших экспериментах β -агонист изопротеренол вызывал гиперполяризацию (на 10 ± 2 мВ), α_1 -агонист фенилэфрин – деполяризацию (на 20 ± 2 мВ) ПП в ЛВ крысы.

Стимуляция β -адренорецепторов приводит к активации внутриклеточного сигнального каскада, последовательными элементами которого являются аденилатциклаза и протеинкиназа А [14, 15]. Протеинкиназа имеет множество мишеней в кардиомиоцитах, в том числе ионные каналы и транспортеры, изменение проводимости или активности которых за счет фосфорилирования РКА вызывает изменение биоэлектрической активности.

Помимо АС/РКА, эффекты β -адренорецепторов могут реализовываться посредством прямого действия субъединицы $G_{\beta\gamma}$ на ионные каналы [16]. В данной работе использовали активатор аденилатциклазы форсколин. Максимальный эффект форсколина был примерно равен максимальному эффекту изопротеренола, т.е. эффект активации аденилатциклазы совпадал с эффектом активации β -адренорецепторов.

Неселективный ингибитор фосфодиэстераз IBMX также вызывал в миокарде ЛВ гиперполяризацию, как и изопротеренол, хотя меньшую по величине. Фосфодиэстеразы являются ферментами, расщепляющими циклические нуклеотиды в клетке (сАМР, сGMP), тем самым снижая их активность [17]. Ингибирование фосфодиэстераз приводит к повышению уровня сАМР при базальной активности аденилатциклазы. В наших экспериментах эффект IBMX (гиперполяризация) составил только 60% от эффекта активации аденилатциклазы форсколином, а также от эффекта активации β -адренорецепторов изопротеренолом. Таким образом, результаты опытов с форсколином и IBMX позволяют предположить, что β -адренергическая гиперполяризация в ЛВ крысы зависит от аденилатциклазы и сАМР и, скорее всего, не связана с эффектами субъединицы $G_{\beta\gamma}$ белка Gs.

Обусловлена ли β -адренергическая гиперполяризация в ЛВ сАМР-зависимой активацией РКА? Ингибирование РКА посредством блокатора KT5720 приводило к подавлению эффекта изопротеренола на 67%, посредством блокатора H-89 – на 42% и Rp-adenosine-cАМР – на 30%, т. е. каждый из используемых блокаторов РКА подавлял эффект активации β -адренорецепторов. Таким образом, гиперполяризация, наблюдаемая в покое миокарде ЛВ крысы в ответ на активацию β -адренорецепторов изопротеренолом, в значительной степени, хотя и не полностью, обусловлена активацией «классического» внутриклеточного сАМР-зависимого сигнального каскада и РКА.

Наши эксперименты позволяют предположить, что часть эффекта изопротеренола может реализовываться без участия РКА. Известно, что сАМР способен напрямую связываться с некоторыми ионными каналами. Наиболее известным примером являются HCN (cyclic nucleotide gated channels) каналы, которые в синоатриальном узле сердца обеспечивают так называемый пейсмекерный ток I_f [18]. Вклад тока I_f в эффект изопротеренола в наших экспериментах является маловероятным, так как β -адренергическая стимуляция приводит к усилению тока I_f и деполяризации, а не к гиперполяризации мембранного потенциала (как происходило в нашей работе). Возможно, что в кардиомиоцитах ЛВ крысы сАМР оказывает прямое влияние на калиевые каналы токов задержанного выпрямления (hERG), как это показано в желудочковом миокарде [19]. Показано, что сАМР способен независимо от РКА стимулировать экзоцитоз пресинаптических везикул [20]. In vivo РКА-независимая составляющая β -адренергической гиперполяризации может быть связана со стимуляцией сАМР, высвобождением ацетилхолина из парасимпатических интрамуральных постганглионарных волокон, что будет

вызывать гиперполяризацию. Данные предположения требуют дальнейших исследований.

Основными адренорецепторами кардиомиоцитов являются рецепторы β -подтипа, но в сердце также представлены α_1 -адренорецепторы. Особенно много α_1 -адренорецепторов в сердце грызунов [21]. Стимуляция α_1 -адренорецепторов приводит к активации внутриклеточного сигнального каскада, элементами которого являются фосфолипаза С и различные подтипы протеинкиназы С [22]. Мы использовали ингибиторы PLC β -1 (наиболее распространенная форма в кардиомиоцитах) и РКС, чтобы выявить роль этого каскада в деполяризации, вызываемой активацией α_1 -адренорецепторов в ЛВ крысы. В наших экспериментах ни ингибирование PLC, ни РКС не подавляло деполяризацию, вызываемую фенилэфрином. Соответственно роль РКС в α -адренергической деполяризации остается неясной. Можно предположить, что α -адренергическая деполяризация в ЛВ крысы обусловлена PLC- и РКС-независимыми механизмами.

Известно, что стимуляция α_1 -адренорецепторов в кардиомиоцитах может приводить к активации фосфолипазы D [23]. Активация PLD может происходить как посредством РКС, так и независимо от этой протеинкиназы [24]. В наших экспериментах ингибитор PLD не оказывал существенного влияния на деполяризацию ПП, вызываемую фенилэфрином. Вероятно, что роль PLD в реализации эффектов фенилэфрина в ЛВ незначительна. Ранее было показано, что субъединица α белка $G_{q/11}$ напрямую может подавлять активность каналов TRPM8 [25], а также каналов TASK, формирующих калиевый ток утечки I_{leak} [26]. Установлено, что субъединица $\beta\gamma$ белка $G_{q/11}$, взаимодействуя напрямую с каналами Kir.2.x, может вызывать подавление тока I_{K1} , который регулирует уровень ПП в кардиомиоцитах [27, 28]. Можно предположить, что эффекты фенилэфрина, независимые от фосфолипаз и РКС, связаны с прямым действием субъединиц α или $\beta\gamma$ белка $G_{q/11}$ на некоторые ионные каналы и токи.

В наших экспериментах неселективный блокатор хлорных токов SITS вызывал сдвиг ПП в сторону отрицательных значений в контрольных условиях. Такие результаты указывают на то, что хлорные токи принимают участие в деполяризации ПП и поддержании его на уровне -65 – -70 мВ в покое миокардиальной ткани ЛВ крыс. Следует отметить, что выяснение роли хлорных токов в регуляции ПП в ЛВ является отдельной задачей вследствие огромного их разнообразия. Ранее показано, что активация α -адренорецепторов может приводить как к подавлению, так и к активации хлорных токов [29, 30] в различных тканях. Можно предположить, что дополнительная деполяризация в ЛВ при α_1 -адреностимуляции

обусловлена усилением хлорной проводимости. Однако в наших экспериментах SITS не подавлял деполяризующий эффект фенилэфрина. Таким образом, роль хлорных токов в α_1 -адренорецепторзависимой деполяризации в миокарде ЛВ оказывается под вопросом. Наиболее вероятным механизмом PLC-, РКС-независимой деполяризации является подавление тока I_{K1} , который может быть исходно снижен в этой ткани за счет малой плотности каналов $Kir2.x$ [31, 32]. Дополнительные механизмы могут лежать в основе указанного явления, например, подавление калиевых токов утечки I_{leak} .

В итоге результаты наших экспериментов позволяют предположить, что гиперполяризация ПП в миокардиальной ткани ЛВ при активации β -адренорецепторов обусловлена «классическим» каскадом АС/сАМР/РКА и частично РКА-независимыми механизмами. Деполяризация ПП в ответ на стимуляцию α -адренорецепторов, скорее всего, не связана с классическим механизмом – активацией PLC и РКС.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 17-04-01634.

Сведения об авторах:

Кузьмин В. С. – к.биол.н., доцент биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», Москва; н.с. лаборатории электрофизиологии сердца института экспериментальной кардиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава РФ, Москва.

Розенштраух Л. В. – д.биол.н., акад. РАН., руков. лаборатории электрофизиологии сердца «Института экспериментальной кардиологии» ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава РФ, Москва.

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», Москва

Кафедра физиологии человека и животных

Каримова В. М. – аспирант кафедры.

E-mail: vm-karimova@yandex.ru

Information about the author:

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Biological department

Viktoriia M. Karimova – graduate student.

E-mail: vm-karimova@yandex.ru

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Masani F. Node-like cells in the myocardial layer of the pulmonary vein of rats: an ultrastructural study. *J Anat* 1986;145:133–142.
- Haissaguerre M., Jais P., Shah D. C. Spontaneous initiation of AF by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med* 1998;339:659–666.
- Doisne N., Maupoil V., Cosnay P., Findlay I. Catecholaminergic automatic activity in the rat pulmonary vein: electrophysiological differences between cardiac muscle in the left atrium and pulmonary vein. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:102–108.
- Chen Y. J., Chen S. A., Chang M. S., Lin C. I. Arrhythmogenic activity of cardiac muscle in pulmonary vein 3s of the dog: Implication for the genesis of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2000;48:265–273.
- Cheung D. W. Electrical activity of the pulmonary vein and its interaction with the right atrium in the guinea-pig. *J Physiol* 1980;314:445–456.
- Tsuneoka Y., Kobayashi Y., Honda Y. et al. Electrical activity of the mouse pulmonary vein myocardium. *J Pharmacol Sci* 2012;119:287–292.
- Maupoil V., Bronquard C., Freslon J. L. et al. Ectopic activity in the rat pulmonary vein can arise from simultaneous activation of α_1 - and β_1 -adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 2007;150:899–905.
- Berngardt E. R. The role of the autonomic nervous system in the development of atrial fibrillation. *Bull of Heart, Blood and Endocrinology Centre* 2011;1:68–71. Russian (Бернгардт Э. Р. Роль автономной нервной системы в развитии фибрилляции предсердий. Бюллетень федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова 2011;1:68–71.)
- Ehrlich J. R., Cha T. J., Zhang L. et al. Cellular electrophysiology of canine pulmonary vein cardiomyocytes: action potential and ionic current properties. *J Physiol* 2003;551:801–813.
- Heijman J., Voigt N., Nattel S., Dobrev D. Cellular and Molecular Electrophysiology of Atrial Fibrillation Initiation, Maintenance, and Progression. *Circ Res* 2014;114:1483–1499.
- Tan A. Y., Li H., Wachsmann-Hogiu S. et al. Autonomic innervation and segmental muscular disconnections at the human pulmonary vein-atrial junction: implications for catheter ablation of atrial-pulmonary vein junction. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:132–143.
- Kuzmin V. S., Abramochkin D. V., Sukhova G. S., Ashmarin I. P. Studies of the receptor mechanisms of the effects of adp-ribose on the rat heart. *Neurochemical J.* 2008;2:23–32. Russian (Кузьмин В. С., Абрамочкин Д. В., Сухова Г. С., Ашмарин И. П. Изучение рецепторных механизмов действия АДФ-рибозы в сердце крысы. Нейрохимия 2008;2:23–32.)
- Kuzmin V. S., Abramochkin D. V., Sukhova G. S., Rosenshtraukh L. V. Effect of ADP-ribose, AMP and adenosine on electrical activity in the atria and papillary muscle of the hibernating ground squirrel. *Kardiologiya* 2008;48:53–60. Russian (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 2008;48:53–60.)

14. Saucerman J.J., McCulloch A.D. Cardiac beta-adrenergic signaling: from subcellular microdomains to heart failure. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1080:348–361.
15. Xiao R., Zhu W., Zheng M. et al. Subtype-specific α_1 - and β -adrenoceptor signaling in the heart. *Trends in Pharmacological Sciences* 2006;27:330–337.
16. Clapham D.E. Direct G protein activation of ion channels. *Annu Rev Neurosci* 1994;17:441–464.
17. Fischmeister R., Castro L.R., Abi-Gerges A. et al. Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res* 2006;99:816–828.
18. St Clair J.R., Liao Z., Larson E.D., Proenza C. PKA-independent activation of I(f) by cAMP in mouse sinoatrial myocytes. *Channels (Austin)* 2013;7:318–321.
19. Cui J., Melman Y., Palma E. et al. Cyclic AMP regulates the HERG K(+) channel by dual pathways. *Curr Biol* 2000;10:671–674.
20. Seino S., Shibasaki T. PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol Rev* 2005;85:1303–1342.
21. 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* 2013;66:308–333.
22. Steinberg S.F. Cardiac actions of protein kinase C isoforms. *Physiology (Bethesda)* 2012;27:130–139.
23. Mier K., Kemken D., Katus H.A. et al. Adrenergic activation of cardiac phospholipase D: role of $\alpha_1(1)$ – adrenoceptor subtypes. *Cardiovasc Res* 2002;54:133–139.
24. Balboa M.A., Insel P.A. Stimulation of phospholipase D via α_1 -adrenergic receptors in Madin-Darby canine kidney cells is independent of PKC α and - ϵ activation. *Mol Pharmacol* 1998;53:221–227.
25. Li L., Zhang X. Differential inhibition of the TRPM8 ion channel by G α_q and G α_{11} . *Channels (Austin)* 2013;7:115–118.
26. Chen X., Talley E.M., Patel N. et al. Inhibition of a background potassium channel by Gq protein α -subunits. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:3422–3427.
27. Anumonwo J.M., Lopatin A.N. Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48:45–54.
28. Cohen N.A., Sha Q., Makhina E.N. et al. Inhibition of an inward rectifier potassium channel (Kir^{2.3}) by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *J Biol Chem* 1996;271:32301–32305.
29. Duan D., Fermini B., Nattel S. Alpha-adrenergic control of volume-regulated Cl-currents in rabbit atrial myocytes. Characterization of a novel ionic regulatory mechanism. *Circ Res* 1995;77:379–393.
30. Walsh K.B. Activation of a heart chloride current during stimulation of protein kinase C. *Mol Pharmacol* 1991;40:342–346.
31. Ehrlich J.R., Cha T.-J., Zhang L. et al. Cellular electrophysiology of canine pulmonary vein cardiomyocytes: action potential and ionic current properties. *J Physiol* 2003;551:801–813.
32. Melnyk P., Ehrlich J.R., Pourrier M. et al. Comparison of ion channel distribution and expression in cardiomyocytes of canine pulmonary veins versus left atrium. *Cardiovasc Res* 2005;65:104–116.

Поступила 07.04.17 (Received 07.04.17)