На правах рукописи

Зиятдинова Нафиса Ильгизовна

Рецепторно-эффекторные механизмы в развивающемся сердце крыс

03.03.01- физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Казань – 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный консультант: **Зефиров Тимур Львович** – доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты: **Рощевская Ирина Михайловна** – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук (г. Сыктывкар), заведующая лабораторией сравнительной кардиологии

Тарасова Ольга Сергеевна – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова" (г. Москва), профессор кафедры физиологии человека и животных

Маслюков Петр Михайлович – доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Ярославский государственный медицинский университет" (г. Ярославль), заведующий кафедрой нормальной физиологии с биофизикой

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Санкт-Петербургский государственный университет"

Защита состоится «31» марта 2015 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.28 при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (420012, г. Казань, ул. ул. Кремлевская, 18).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (420021, г. Казань, ул. Кремлевская, 18), http://kpfu.ru/

Автореферат разослан «___»_____ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор **Т.А. Аникина**

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Контроль сердечной деятельности осуществляется экстракардиальными нервными, гуморальными воздействиями, а также при участии внутрисердечных структур. В основе нервной регуляции деятельности сердца лежит взаимодействие между симпатическим и парасимпатическим отделами вегетативной нервной системы, которые реализуют свои влияния через адренорецепторы и холинорецепторы клеток сердца [Абзалов Р.А., 1987; Аникина Т.А. и др., 2013; Зефиров Т.Л. и др., 2002, 2007, 2011; Ноздрачев А.Д., 1995; Ситдиков Ф.Г., 1974; Тарасова О.С., 2005; Чинкин А.С., 1988, 2006;; Barbuti et al., 2009; Choate J.K., Feldman., 2003; Robinson R.B. et al., 2003; Wydeven N. et al., 2014]. Согласно классическим представлениям в регуляции сердца участвуют два типов рецепторов: β_1-адренорецепторы (β_1-АР) и мускариновые холинорецепторы второго типа (M_2-ХР). Однако, известно, что в сердце присутствуют и другие типы АР и М-ХР [Myslivecek J. et al., 2008]. Принято считать, что в сердце наиболее распространенными являются β-АР. Их стимуляция увеличивает силу сокращения миокарда, учащает сердцебиения, повышает проводимость и возбудимость сердечной мышцы. Через специфические G белки β-АР способны модулировать активность различных внутриклеточных сигнальных систем [Kilts J.D., Gerhardt M.A. et al., 2000], В большинстве клинических и экспериментальных исследований особое внимание уделялось изучению эффекта блокады β-АР. Этот подход возник в связи с преобладающей ролью β-адреноблокаторов в лечении стенокардии, гипертонии и сердечной недостаточности [Jensen B.C. et. al., 2011]. В результате, вопрос о роли α-АР в развитии заболеваний сердца был незаслуженно забыт. В последнее время наблюдается возрождение интереса к комбинированной блокаде всех адренорецепторов. В частности, комбинированная β_1-, β_2-и α_1-блокада приводила к лучшим результатам, чем селективная блокада β_1-АР. Этот результат заставил многих ученых задуматься об участии α-АР в регуляции сердечных функций [Shannon R., Chaudhry M., 2006]. Стимуляция α_1-АР фенилэфрином вызывает гипертрофию неонатальных кардиомиоцитов желудочков сердца крысы. Эти изменения опосредованы через Gq-зависимые и протеинкиназа С-зависимые пути [Jensen B.C. et. al., 2011]. Несмотря на то, что плотность α_1-АР в сравнении с β-АР ниже, α_1-АР играют важную роль в регуляции функций сердца. В настоящее время показано наличие трех подтипов α_1-АР: α_{1A}-, α_{1B}- и α_{1D}-АР [Bylund D.B., Bond R.A. et al., 1998]. Все они активируются адреналином, норадреналином и фенилэфрином и блокируются празозином. Все α_1-АР, взаимодействуя с Gq-белком, активируют фосфолипазу Cβ1, увеличивают концентрацию диацилглицерола и активируют протеинкиназу С. Известно, что α_1-АР присутствуют в сердце и схожи у различных видов животных. Представительство α_1-АР в сердце человека было продемонстрировано на молекулярном уровне [Brodde O.E., Michel MC., 1999]. Ранее считалось, что α_2-АР в сердце млекопитающих лишь модулируют регуляторные влияния, располагаясь пресинаптически и ингибируюя высвобождение норадреналина. Все три подтипа α_2-АР снижают активность аденилатциклазы (АС) и содержание

внутриклеточного цАМФ. Значение α_2-АР в сердце изучено недостаточно [Brodde O.E. et al., 2006].

Считается, что преобладающей формой М-ХР в сердце млекопитающих и человека являются M_2-ХР. Их активация приводит к снижению частоты сердебиений и силы сердечных сокращений [Miaoa Y. et al., 2013]. Как и адренорецепторы, мускариновые холинорецепторы (М-ХР) являются G-белок связанными рецепторами. М-ХР могут взаимодействовать с дополнительными сигнальными системами и оказывать влияние на K^+- и Ca^{2+}-каналы, активацию фосфолипазы А2, фосфолипазы D и протеин тирозинкиназы [Wang Z. et al., 2004; Murakami S. et. al., 2013; Abramochkin D.V. et. al., 2014; Voigt N. et. al., 2014]. В течение последнего десятилетия было подтверждено функциональное значение других подтипов М-ХР в сердце различных видов млекопитающих [Wang H. et al., 2007; Myslivecek J. et al., 2008].

HCN каналы и Ca каналы L-типа являются важными составляющими вегетативной модуляции работы сердца. Показано, что адренергическая и холинергическая модуляция клеток увеличивает, либо уменьшает If ток во время диастолы [Bucchi A. et al., 2007; Mangoni M.E., Nargeot J., 2008]. При симпатической стимуляции катехоламины связываясь с β-АР, активируют Gs белок, вызывая образование ГДФ из ГТФ, что стимулирует синтез аделитциклазы, цАМФ, который, активирует протеинкиназу А (PKA). Многие рецепторы, связанные с G белками (GPCR), стимулируют выработку цАМФ в сердце, но не все вызывают эквивалентные функциональные реакции. Это связано с их возможностями регулировать работу Ca-каналов L-типа (LTCC) [Rochais F. et al., 2006; Warrier S. et al., 2007; Agarwal S.R. et al.,2011; Calaghan S, White E., 2006]. Показано, что $Ca_V1.2$ каналы являются частью сигнального комплекса, который включает Gs белки [Davare M.A. et al., 2001; Balijepalli R.C. et al., 2006]. Наиболее изучена регуляция Ca^{2+} каналов при стимуляции β_2-АР, которые могут связываться как с Gs-, так и с Gi белком и снижать уровень цАМФ путем ингибирования АС [Xiao R.P. et al., 2004]. Это ограничивает образование цАМФ и, как следствие, ПКА зависимую регуляцию белков-мишеней, в том числе $Ca_V1.2$ каналов кардиомиоцитов [Kuschel M. et al., 1999]. Было показано, что β_1-АР также могут активировать как Gi, так и Gs белки с последующей активацией протеинкиназы С [Belevych A.E., et al., 2004]. Протеникиназа С через систему Gq белков связана с α_1-АР, эндотелином, ангиотензиновыми рецепторами и способна регулировать работу LTCC в сердце [Catterall W.A., 2000; Kam T.J. et al., 2000].

Механизмы, определяющие вегетативную регуляцию сердечно-сосудистой системы на разных этапах онтогенеза давно вызывают интерес исследователей (Абзалов Р.А., 2008; Аникина Т.А. и др., 2011; Вахитов И.Х. и др., 2005; Зефиров Т.Л., 2002; Маслюков П.М. и др., 2014; Нигматуллина Р.Р. и др., 2014; Распутина А.А., Рощевская И.М., 2010, 2011; Ситдиков Ф.Г. и др., 2010; Тарасова О.С. и др., 2012; Ходырев Г.Н., Ноздрачёв А.Д., 2013; Chen F. et. al, 2006; Ebert S.N. et. al., 2008; Fregoso S.P., Hoover D.B., 2012; Meidahl P.K. et. al., 2012; Qu J., Robinson R.B., 2004; Sato S. 2008; Zefirov T.L. et al., 2007 и др.). При этом, ряд авторов изменения деятельности сердца с возрастом связывают с усилением

парасимпатических и ослаблением симпатических влияний на сердце [Адольф Э.Ф., 1971]. Другие исследователи, напротив, считают, что симпатическая иннервация сердца развивается позже, чем парасимпатическая [Robinson R.B. 1996]. В процессе постнатального онтогенеза происходит изменение реакции сердца на регуляторные воздействия. Некоторые изменения проявляются в виде количественных различий, в других случаях происходят более сложные качественные изменения функций сердца. Известно, что экспрессия разных подтипов М-холинорецепторов в сердце меняется в процессе онтогенеза. Имеются доказательства того, что сердце эмбрионов позвоночных уже на ранних стадиях развития имеется холинергический и адренергический контроль. Однако это связано с высоким уровнем катехоламинов циркулирующих в крови, а не с симпатической иннервацией [Taylor E. W., 2014]. Катехоламины, еще до появления нервного контроля, могут участвовать в эмбриональном развитии сердца [Lehmann M. et al., 2013]. Имеются доказательства того, что наиболее важными для эмбрионального развития являются β_1 - и α_2 –АР системы [O'Connell T.D. et. al., 2003]. Возрастные изменения претерпевают не только рецепторы, но и ионные каналы, участвующие в формировании потенциала действия атипичных и рабочих кардиомиоцитов. Имеются данные о возрастных особенностях If и I_{CaL} в сердце [Qu J., Robinson R.B., 2004]. Существует предположение о том, что изменения ионных токов кардиомиоцитов может быть связано с формированием симпатической иннервации сердца [Qu J. et al., 2000; Protas L. et al., 2003]. Было показано, что блокада If оказывает различный эффект на сердечную деятельность крыс разного возраста [Zefirov T.L. et al., 2003].

В связи с вышесказанным, можно предположить, что в основе возрастных изменений вегетативной регуляции сердечно-сосудистой системы лежит гетерогенность популяции АР и М-ХР, плотность и активность рецепторных структур и ионных каналов, участвующих в формировании потенциала покоя и потенциала действия кардиомиоцитов. Именно поэтому выявление роли разных подтипов АР и М-ХР и, связанных с ними, сигнальных каскадов, на разных этапах раннего постнатального онтогенеза представляется нам весьма актуальным.

Целью настоящего исследования является изучение рецепторно-эффекторных механизмов в развивающемся сердце крыс.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние стимуляции разных адренорецепторов на хронотропию сердца крыс при формировании адренергической иннервации.
2. Исследовать влияние стимуляции разных адренорецепторов на инотропию сердца крыс при формировании адренергической иннервации.
3. Изучить влияние блокады разных адренорецепторов на хронотропию сердца крыс сердца при формировании адренергической иннервации.
4. Исследовать влияние селективной блокады подтипов α_1-АР на хронотропию сердца крыс при формировании адренергической иннервации.
5. Исследовать влияние блокады If на инотропию сердца крыс при формировании адренергической иннервации.
6. Изучить влияние блокады If на параметры электрической активности рабочих кардиомиоцитов.

7. Выявить влияние блокатора If ZD7288 на ионные токи в кардиомиоцитах.

8. Исследовать влияние стимуляции адренорецепторов на фоне блокады If на хронотропию сердца крыс при формировании адренергической иннервации.

9. Исследовать влияние стимуляции адренорецепторов на фоне блокады Са-токов L–типа на хронотропию сердца крыс при формировании адренергической иннервации.

10. Изучить дозозависимое влияние карбахолина на инотропию сердца крыс при формировании адренергической иннервации.

11. Исследовать влияние блокады различных М-холинорецепторов на хронотропию сердца крыс при формировании адренергической иннервации.

12. Изучить хронотропный эффект электрической стимуляции вагуса на фоне блокады разных М-холинорецепторов при формировании адренергической иннервации сердца крыс.

13. Исследовать влияние блокады разных М-холинорецепторов на инотропию сердца крыс при формировании адренергической иннервации.

14. Изучить влияние карбахолина на инотропию миокарда после блокады разных М-холинорецепторов при формировании адренергической иннервации сердца крыс.

Научная новизна. Впервые установлены возрастные особенности рецепторных и эффекторных механизмов вегетативной регуляции сердечной деятельности крыс в процессе формирования симпатической регуляции. Выявлено, что положительный хронотропный ответ на стимуляцию адренорецепторов норадреналином и изопротеренолом зависит от степени сформированности адренергической иннервации сердца крыс. Стимуляция α-адренорецепторов фэнилэфрином вызывает урежение сердечной деятельности на всех этапах формирования адренергической иннервации. Впервые показано, что направленность хронотропной реакции при селективной блокаде подтипов α_1-АР и M_3-ХР зависит от зрелости механизмов симпатической регуляции сердца. Впервые показано, что стимуляция разных типов адренорецепторов оказывает разнонаправленный эффект на сократимость миокарда предсердий и желудочков крыс. Выявлено, что независимо от возраста животных карбахолин вызывает отрицательный инотропный эффект только в высокой концентрации. Впервые установлено, что селективная блокада подтипов М-ХР не предотвращает развитие брадикардии при электрической стимуляции вагуса на всех этапах формирования адренергической иннервации сердца крыс. Приоритетными являются данные о том, что инотропная реакция сердца при неселективной блокаде М-ХР и селективной блокаде M_1- и M_2-ХР зависит от уровня формирования симпатической регуляции сердца, блокада M_3-ХР не влияет на инотропию сердца крыс всех возрастных групп. Выявлено, что отрицательный инотропный эффект карбахолина не снимается селективной и неселективной блокадой М-ХР. Впервые показано, что If участвуют в регуляции инотропии сердца крыс, а направленность инотропного эффекта при блокаде If связана с формированием адренергической иннервации. Впервые доказано, что блокатор If ZD7288 вызывает увеличение длительности фазы реполяризации и не оказывает влияния на потенциал покоя и

скорость переднего фронта потенциала действия рабочих кардиомиоцитов крыс. Доказано, что ZD7288 селективно ингибирует If, не оказывая влияния на калиевые токи, определяющие скорость реполяризации. Выявлено, что I_{CaL} не участвуют в адренергической регуляции хронотропии сердца новорожденных крысят. Впервые показано, что HCN каналы является важнейшим эффектором симпатической регуляции сердца крыс непосредственно с момента рождения.

Научно-практическая значимость. Полученные результаты расширяют представления о холинергических и адренергических механизмах регуляторных влияний на частоту сердечных сокращений и силу сокращения миокарда крыс в различные периоды постнатального онтогенеза. Результаты экспериментов свидетельствуют об определяющем значении симпатической иннервации сердца в изменении эффектов при воздействии на адрено- и мускариновые холинорецепторы. Полученные данные свидетельствуют о необходимости точной идентификации возраста лабораторных животных при анализе экспериментальных данных. Это относится к результатам экспериментов как in vivo, так и in vitro. Показано, что хронотропная реакция при блокаде α_1-адренорецепторов и M_3-холинорецепторов может носить противоположный характер в зависимости от формирования адренергической иннервации сердца, что следует учитывать при назначении препаратов в детском и старческом возрасте. При применении блокаторов HCN каналов как брадикардических и антиаритмических препаратов следует учитывать, что блокада If оказывает влияние не только на хронотропию, но и на инотропию сердца. Полученные результаты представляют безусловный интерес для фармакологов, изучающих влияние на сердечно-сосудистую систему различных агонистов и блокаторов ионных токов, холино- и адренорецепторов с использованием крыс в качестве экспериментальных животных. Полученные данные необходимо использовать для правильной трактовки результатов фармакологических и физиологических исследований на сердечно-сосудистой системе крыс в зависимости от их возраста. Материал исследований заслуживает внимания со стороны специалистов по возрастной и нормальной физиологии, фармакологии, кардиологии и педиатрии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Формирование симпатической регуляции детерминирует изменения рецепторно-эффекторных механизмов в сердце.
2. При формировании симпатической иннервации происходит переключение в полярности эффектов α-адренорецепторов и М-холинорецепторов на хронотропию и инотропию сердца.
3. Токи, активируемые при гиперполяризации оказывают влияние не только на хронотропию, но и на сократимость миокарда.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на итоговых научных конференциях молодых ученых и преподавателей Казанского Государственного Педагогического Университета, Татарского государственного гуманитарно-педагогического университета, Казанского (Приволжского) федерального университета (2002-2014); III всероссийской конференции «Механизмы функционирования висцеральных систем» (С-Петербург, 2003);

Международной школе по сердечно-сосудистой физиологии «Трансдукция сигнала в сердечно-сосудистой системе», Варшава, 2004; Всероссийской конференции «Растущий организм – адаптация к физической и умственной нагрузке» (Казань, 2006); VIII конференции Международного общества нейробиологии беспозвоночных (Казань, 2006); I съезде физиологов СНГ (Дагомыс, 2005); III конференции нейронаук с международным участием (Донецк, 2005); съезде физиологов Сибири (2005); XX съезде физиологов России (Москва, 2007); III съезде физиологов СНГ (Ялта, 2012); 4-5 всероссийской школе-конференции по физиологии кровообращения (Москва, 2008, 2012); XI Всероссийской с международным участием научной школе-конференции «Механизмы адаптации растущего организма к физической и умственной нагрузке» (Казань-Яльчик, 2012); XXII съезде Физиологического общества имени И.П. Павлова (Волгоград, 2013); XII Международной школе-конференции «Адаптация растущего организма», Казань-Яльчик, 2014; IV съезде физиологов СНГ (Дагомыс, 2014).

Публикации. Автором опубликовано 69 печатных научных работ, 24 из них, в ведущих научных рецензируемых журналах, определенных Высшей аттестационной комиссией.

Личный вклад автора. Приведенные в работе данные, получены при личном участии соискателя на всех этапах работы включая организацию и проведение экспериментов, анализ экспериментальных данных, теоретическое обобщение результатов исследования. Работа выполнена комплексно, на достаточном в количественном отношении статистическом материале исследований.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 340 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора научной литературы, описания материала и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы, включающего 476 наименований. Работа иллюстрирована 46 таблицами и 31 рисунком.

Материалы и методы исследования

Для экспериментов использовались белые беспородные крысы в возрасте от 1-ой до 20-ти недель. Всего в работе представлены данные, полученные на 960 животных. В качестве наркоза использовали 25% раствор уретана, который вводился внутрибрюшинно в количестве 800 мг/кг массы животного. После инъекции уретана в экспериментах in vivo животное фиксировали на специальном операционном столе с мощным освещением и оптической аппаратурой для микрохирургических операций. При помощи инструментов обнажались сосудисто-нервные пучки с двух сторон. Далее при помощи оригинальных зондов и крючков от сонной артерии отделялся ствол блуждающего нерва. Для некоторых экспериментов один или оба блуждающих нерва брали на шелковые лигатуры. При стимуляции правый блуждающий нерв последовательно накладывались на платиновые биполярные электроды. В качестве источника

раздражающих импульсов применяли лабораторный электростимулятор ЭСЛ-2. Амплитуда раздражающих импульсов составляла 5 V. Частота стимуляции варьировала от 1 до 10 Гц, длительность импульсов от 1 до 16 ms, задержка – от 0,8 до 1,6 ms. Параметры раздражения подбирались индивидуально для каждого животного. В ходе всего эксперимента, начиная с момента фиксации крысы на операционном столе, проводилась постоянная регистрация электрокардиограммы с получением усредненных значений параметров вариационной пульсограммы. Данные эксперименты проводилась совместно с Дементьевой Р.Е., Сибалаковой Л.Р.

Сократительную активность миокарда в эксперименте in vitro изучали на полосках предсердий и желудочков. Наркотизированную крысу фиксировали на специальном, освещенном операционном столе, затем вскрывали грудную клетку. Сердце быстро помещали в ванночку с рабочим раствором. В соответствии с анатомическим строением сердца вырезались полоски миокарда из правого предсердия и правого желудочка длиной 2-3 мм и диаметром 0,8-1,0 мм. Препарат помещали вертикально в резервуар V = 20 мл, оксигенированный карбогеном (97% O_2 и 3% CO_2) рабочий раствор. Верхний конец препарата прикреплялся к нержавеющему стержню, соединенному с измерителем напряжения, нижний конец к резиновому блоку. Препарат стимулировался электрическим сигналом через 2 серебряных электрода с помощью стимулятора ЭСЛ – 2 (Россия) с частотой 6 и 10 стимулов в минуту, амплитудой сигнала 10 mV, продолжительность стимула 5 мс. После погружения препарата в резервуар следовал период проработки в течение 40-60 минут. Запись кривой регистрировали на персональном компьютере при помощи программного обеспечения «Chart 5.3». По окончанию проработки 5 минут регистрировались исходные параметры сокращения, затем 21 минуту с добавлением в рабочий раствор специфических агонистов и блокаторов. Силу сокращения (F) выражали в граммах (g). Обработка полученных результатов проводилась с помощью программы Chart 5.3, на установке Power Lab (AD Instruments, Австралия), датчиком силы MLT 050/D (AD Instruments, Австралия). Данные эксперименты проводилась совместно с Сергеевой А.М.

При внутриклеточной регистрации электрической активности в рабочем миокарде животных декапитировали, после чего быстро вскрывали грудную клетку и выделяли сердце. Сердце промывали раствором Тироде, насыщенным карбогеном. После этого выделяли препарат изолированной стенки правого желудочка, либо препарат ушка правого предсердия, лишенный пейсмекерной области, и помещали в камеру объемом 3 мл, где препараты суперфузировались раствором Тироде при температуре 38°С со скоростью 10 мл/мин. Препараты миокарда закрепляли на дне камеры эндокардиальной стороной вверх, в течение всего эксперимента препараты стимулировали с помощью серебряных электродов, подключенных к стимулирующей системе, состоящей из цифро-аналогового преобразователя (в составе комплекса NBL140-4; Нейробиолаб, Россия), управляемого компьютерной программой Digiscope v.2.0 (Нейробиолаб, Россия) и линейного изолятора стимула DL-360 (Нейробиолаб, Россия). С помощью программы задавалась длительность стимула – 1 мс и частота

стимуляции – 5 Гц, соответствующая нормальной частоте сердечных сокращений у взрослой крысы. Для регистрации ПД применялся стандартный метод внутриклеточного отведения биоэлектрической активности с помощью стеклянных микроэлектродов сопротивлением 25-60 Мом. Сигнал оцифровывался на аналогово-цифровом преобразователе E14-140 (L-Card, Россия) и записывался на компьютере с помощью программы Powergraph v.3.3 (DiSoft, Россия). Обработку данных проводили в программе MiniAnalysis v.3.0.1 (Synaptosoft, США). Оценивали длительность ПД на уровне 50 и 90% реполяризации. Данная серия экспериментов проводилась совместно с Абрамочкиным Д.В.

Для регистрации ионных токов методом patch-clamp использовали изолированные желудочковые кардиомиоциты мыши. Животным вводили внутрибрюшинно гепарин (1000 ед/кг), после чего декапитировали и вскрывали грудную клетку. Сердце выделяли, промывали раствором Тироде, после чего в течение 10 минут ретроградно перфузировали по Лангендорфу в системе с постоянным протоком модифицированным раствором Тироде с уменьшенным содержанием ионов кальция и натрия (состав в ммоль·л$^{-1}$: NaCl 120, KCl 5.4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5, пируват натрия 5, глюкоза 20, таурин 20 и Hepes 10 с pH 6.9 выровненным добавлением NaOH). Затем сердце в течение 15 минут перфузировали раствором аналогичного состава с добавлением коллагеназы типа II (0,45 мг·мл$^{-1}$) и 20 μM хлорида кальция. Перфузию проводили при температуре 37±1°C и постоянном насыщении раствора карбогеном (95% O_2 + 5% CO_2). После завершения перфузии желудочки сердца отрезали и механически выделяли кардиомиоциты в растворе Крафтбрюэ следующего состава (ммоль·л$^{-1}$): KCl 30, глутамат К 50, $K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 30, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3, EGTA 0,5, глюкоза 10, таурин 20 и Hepes 10 с pH 7.2 выровненным добавлением NaOH. Данный раствор использовали также для хранения клеток в течение 7-9 часов.

Ионные токи регистрировали методом patch-clamp в конфигурации whole cell при помощи усилителя Axopatch 200A (Molecular Devices, США). Кардиомиоциты помещали в экспериментальную камеру (RC-26; Warner Instrument Corp, Brunswick, CT, USA; объемом 150 μl) с постоянным протоком физиологического раствора (состав в ммоль·л$^{-1}$: 150 NaCl, 5,4 KCl, 1,8 $CaCl_2$, 1,2 $MgCl_2$, глюкоза 10, Hepes 10, с pH 7,6 выровненным добавлением NaOH) комнатной температуры (24±1°C). Сопротивление пипеток составляло в среднем 4,4±0,7 MΩ. Перед началом регистрации компенсировали емкость пипетки, емкость клетки и сопротивление доступа. Данная серия экспериментов проводилась совместно с Абрамочкиным Д.В.

Для введения фармакологических агентов в экспериментах in vivo после препаровки блуждающих нервов производили подготовку к внутривенному введению в правую бедренную вену. В экспериментах использовались – ZD 7288 – препарат, блокирующий гиперполяризационные токи, верапамил – блокатор потенциалзависимых кальциевых каналов L-типа, пропранолол (обзидан) неспецифический блокатор β-адренорецепторов, фентоламин – неселективный блокатор α-адренорецепторов, празозин – селективный блокатор α_1-адренорецепторов, йохимбин, являющийся специфическим антагонистом α_2-

адренорецепторов, WB 4101 – селективный блокатор α_{1A}-АР, хлорэтилклонидин – селективный блокатор α_{1B}-АР, BMY 7378 – селективный блокатор α_{1D}-АР, норадреналин – неселективный агонист адренорецепторов, изопротеренол, который является неспецифическим агонистом β-адренорецепторов, фенилэфрин – стимулятор α-адренорецепторов, агонист холинорецепторов карбахолин, неселективный блокатор М-ХР атропин, селективный блокатор M_1-ХР пирензипин, селективный блокатор M_2-ХР галламин, селективный блокатор M_3-ХР 4-DAMP. Препараты произведены фиромой Sigma/

В экспериментах (in vivo) блокатор токов, активируемых при гиперполяризации, ZD 7288, вводился в дозе: 0,07мг/кг, верапамил вводился в дозе 0,1 мг/кг, норадреналин вводили в дозе 0,01мг/кг, изопротеренол вводился из расчета 0,1мг/кг, фенилэфрин – в дозе 0,1 мг/кг, фентоламин вводили в дозе 10 мг/кг, празозин – в дозе 0,1 мг/кг, пирензепин в дозе 0,02 мг/кг, раствор галламина в дозе 0,2 мг/кг и 0,02 мг/кг, 4-DAMP – в дозе 0,02 мг/кг, йохимбин вводили в дозе 1 мг/кг. Селективные блокаторы α_{1A}-АР WB 4101 и α_{1D}-АР BMY 7378 вводили в дозе 1 мг/кг массы животного. Хлороэтилклонидин вводили в дозе 5 мг/кг массы животного. Для инъекций использовали 0,1 % раствор атропина сульфата, отечественного производства в дозе 0,6 мг/кг массы животного и 0,1% раствор обзидана из расчета 0,8 мг/кг массы животного. Введение препаратов осуществлялось при помощи инсулиновых шприцов, позволяющих производить достаточно точную дозировку вводимых веществ. Данная часть исследований проводилась совместно с Дементьевой Р.Е., Салман М.А.Х., Сибалаковой Л.Р.

В экспериментах регистрации сократимости полосок миокарда и с внутриклеточной регистрацией электрической активности в рабочем миокарде использовали вещества: агонист холинорецепторов карбахолин в концентрациях 10^{-5} – 10^{-9}М, неселективный блокатор М-ХР атропин в концентрациях 10^{-3} – 10^{-6}М, селективный блокатор M_1-ХР пирензипин в концентрации 10^{-6}М, селективный блокатор M_2-ХР галламин в концентрации 10^{-6}М, селективный блокатор M_3-ХР 4-DAMP в концентрации 10^{-6}М, блокатор If каналов ZD7288 в концентрациях 10^{-6}, 3×10^{-6}, 10^{-5}, 3×10^{-5} и 2×10^{-4} М. Данная часть исследований проводилась совместно с Сергеевой А.М., Абрамочкиным Д.В.

Статистическая обработка проводилась с применением пакета программ Statgraphics, При оценке достоверности различий использовали по критерию Стьюдента и Вилкоксона. В редакторе Microsoft Excel вычисляли: среднее значение (М), среднее квадратическое отклонение (δ), ошибку средней (m). Различия считались статистически достоверными при $P\leq0,05$(*), $P\leq0,01$(**), $P\leq0,001$(***).

Результаты собственных исследований

Исследование адренергической регуляции сердечной деятельности взрослых крыс

В сердце млекопитающих представлены как β-, так и α-адренорецепторы. Роль β-АР в регуляции функций сердца изучена довольно хорошо. Роль α-АР является в настоящее время предметом интенсивного исследования. Для полного представления о значении β- и α-адренорецепторов в регуляции сердца были проведены эксперименты с блокадой α-адренорецепторов фентоламином и β-адренорецепторов обзиданом. Введение неселективного блокатора α-адренорецепторов фентоламина взрослым крысам не приводило к достоверным изменения показателей вариационной пульсограммы. У взрослых животных внутривенное болюсное введение обзидана (пропранолола) приводило к достоверным изменениям хронотропии сердца. Максимальное урежение сердцебиений было зафиксировано к 15 минуте и составило 37 % ($p<0,05$) от исходного значения. Таким образом, если результаты экспериментов с пропранололом свидетельствуют об урежающем эффекте блокады β-АР на частоту сердечных сокращений, эксперименты с блокадой α-адренорецепторов фентоламином вызывают вопросы. Известно, что в сердечно-сосудистой системе присутствуют два подтипа α-адренорецепторов: α_1-АР и α_2-АР. Был проведен сравнительный анализ результатов экспериментов с введением селективного блокатора α_1-АР празозина и избирательного блокатора α_2-АР йохимбина.

Внутривенное болюсное введение селективного блокатора α_1-адренорецепторов празозина 20-ти недельным крысам вызывало плавное урежение частоты сердечных сокращений. Значение среднего кардиоинтервала увеличивалось с 166±8,9 мс до 236±11,1 мс ($P<0,05$) к 30 минуте после инъекции празозина. Динамика параметров вариабельности сердечного ритма отражает снижение тонуса симпатического канала регуляции работы сердца.

Блокада α_2-АР йохимбином не вызывала существенных изменений показателей хронотропии сердца 20-ти недельных крыс. Таким образом, у взрослых животных было выявлено наличие отрицательного хронотропного эффекта при блокаде α_1-АР. Поэтому, изучению данных адренорецепторов мы уделили особое внимание. Были проведены эксперименты с селективной блокадой α_{1A}-, α_{1B}-, и α_{1D}-АР. Селективный блокатор α_{1A}-АР WB 4101 вызывал увеличение значения Хср у взрослых животных с 190,6±20,9 мс до 363,6±38,4 мс ($p<0,01$). Динамика показателей вариабельности сердечного ритма (ΔХ, АМо и ИН) свидетельствовала о снижении симпатических влияний. Блокада α_{1B}-АР хлоэтилклонидином вызывала увеличение значения Хср с 171±14,0 мс до 220±13,6 мс ($p<0,05$). К 10 минуте наблюдалось восстановление Хср. К 30 минуте после инъекции хлорэтилклонидина значение Хср вновь увеличивалось до 200±14,1 мс ($p<0,05$). К 60 минуте наблюдалось плавное восстановление значений Хср. При введении селективного блокатора α_{1D}-АР BMY 7378 значение Хср

увеличивалось с 185,0±9,6 мс до 226,3±13,2 мс ($p<0,05$). К 30 минуте после инъекции BMY 7378 значение Xcp составляло 205,6±14,5 мс.

Для выявления роли адренорецепторов в регуляции хронотропии и инотропии сердца взрослых крыс были проведены эксперименты с внутривенным введением агонистов адренорецепторов: агониста всех АР норадреналина, агониста α-АР фенилэфрина, агониста β-АР изопротеренола. При внутривенном болюсном введении норадреналина наблюдалось кратковременное, достоверное учащение сердечной деятельности, значение Xcp уменьшалось с 197±8,8 мс до 165,2±7,3 мс ($p<0,05$). Динамика показателей вариационной пульсограммы отражала увеличение активности симпатического канала регуляции. При введении фенилэфрина наблюдалась кратковременная брадикардия. Сразу после введения препарата значение среднего кардиоинтервала увеличилось с 172,7±11,4 мс до 276,7±26,6 мс ($p<0,01$) Через 1 минуту после инъекции агониста Xcp достоверно превышало исходные значения – 203,6±3,2 мс ($p<0,05$). Через 15 минут после внутривенного болюсного введения изопротеренола наблюдалось достоверное уменьшение значений Xcp с 198±7,12 мс до 174,0±7,3 мс ($p<0,05$). Влияние норадреналина, фенилэфрина и изопртеренола на сократимость миокарда крыс изучали в концентрациях 10^{-5} – 10^{-9} М. Стимуляция разных типов адренорецепторов оказывала различный эффект на сократимость миокарда как предсердий, так и желудочков взрослых крыс.

Таким образом, эксперименты с введением агонистов адренорецепторов взрослым крысам выявили наличие выраженных хронотропных эффектов и отсутствие однозначных инотропных эффектов. Поэтому, следующие серии экспериментов были посвящены изучению адренергических механизмов хронотропии сердца. В настоящее время считается, что симпатическая регуляция в основном связана с двумя типами ионных токов. Первые из них – это If, вторые – I_{CaL}. Внутривенное введение норадреналина на фоне ZD-7288 20 недельным крысам вызывало кратковременное недостоверное снижение значения Xcp с 242,6±15,2 мс до 219,8±13,9 мс. Стимуляции адренорецепторов на фоне действия блокатора If ZD-7288 приводила к нарушению баланса систем регулирующих работу сердца. Норадреналин на фоне блокады $I_{Ca,L}$ не вызывал достоверных изменений показателей работы сердца. Значение Xcp изменялось с 185±16,1 мс до 206,3±27 мс. Урежение после внутривенного введение фенилэфрина на фоне действия верапамила было кратковременным, но более выраженным, по сравнению с результатами введения чистого фенилэфрина (155% и 60%). Причем, значения Xcp сразу после введения увеличивались аналогично результатам с введением чистого фенилэфрина, а на 3 минуте после инъекции агониста α-АР на фоне действия верапамила наблюдалось учащение сердцебиений. В динамике параметров вариабельности сердечного ритма не наблюдалось двухфазных изменений. На фоне блокады If, агонист β-адренорецепторов изопротеренол вызывал тахикардию ($p<0,05$). Внутривенное болюсное введение изопротеренола на фоне действия блокатора $I_{Ca,L}$ приводило к учащению сердцебиений взрослых крыс. Через 1 минуту после введения изопротеренола значения Xcp снижались с 185,7±16,5 мс до 141,4±7,3 мс эксперимента ($p<0,05$).

Влияние блокады If на инотропию миокарда взрослых крыс

В последние годы были высказаны предположения о возможности участия If в функционировании рабочих кардиомиоцитов. В связи с чем, нами были проведены исследования по выявлению роли токов, активируемых гиперполяризацией в механизмах регуляции рабочего миокарда. Блокада If вызывала достоверное и стойкое увеличение силы сокращения миокарда предсердий ($p \leq 0,01$) и желудочков ($p \leq 0,01$) взрослых крыс (Таблица 1).

Таблица 1 - Влияние введения ZD7288 на силу сокращения миокарда крыс

F (g)	Исходная	7 мин	14 мин	21 мин
20 недель (n=8)				
предсердия	0,15538±0,0632	0,18922±0,08412*	0,21409±0,09734**	0,21872±0,08914**
желудочки	0,263913±0,0736	0,27821±0,07524**	0,28885±0,07393**	0,30167±0,07598**
8 недель (n=8)				
предсердия	0,2328±0,05197	0,25753±0,05788	0,30145±0,06636*	0,2988±0,0698
желудочки	0,10738±0,0092	0,11844±0,01161*	0,12529±0,01196*	0,13272±0,0129*
6 недель (n=8)				
предсердия	0,151803±0,034102	0,164867±0,036319*	0,169901±0,03479*	0,169924±0,034347*
желудочки	0,068751±0,02691	0,0800461±0,03167*	0,08386±0,03275*	0,085518±0,032945*
3 недели (n=8)				
предсердия	0,25584±0,01365	0,24898±0,01329*	0,2397±0,013019*	0,22415±0,01298
желудочки	0,08809±0,01848	0,08547±0,01733	0,08025±0,01558*	0,07211±0,01363**
1 неделя (n=8)				
предсердия	0,05705±0,02559	0,06825±0,02648*	0,07396±0,02226**	0,08467±0,03032
желудочки	0,03522±0,00716	0,03616±0,00721*	0,03928±0,00753**	0,03953±0,00752**

(*-P<0,05; **-P<0,01)

Влияние блокады If на электрическую активность рабочего миокарда

В экспериментах с внутриклеточной регистрацией электрической активности в рабочем миокарде на препаратах миокарда ушка правого предсердия и стенки правого желудочка крысы, было изучено влияние блокатора If ZD7288 в 4 концентрациях: 10^{-6}, 3×10^{-6}, 10^{-5} и 3×10^{-5}М. Основной эффект блокатора If ZD7288 в рабочем миокарде предсердий и желудочков крыс выражался в замедлении фазы реполяризации потенциала действия в концентрациях от 3×10^{-6} до 3×10^{-5}М (Рисунок 1).

Поскольку скорость реполяризации в рабочем миокарде крысы определяется в основном калиевыми токами, мы решили проверить возможность реализации наблюдаемых эффектов ZD7288 за счет его действия на ток входящего выпрямления I_{K1}, отвечающий за уровень потенциала покоя и конечную стадию реполяризации, а также токи задержанного выпрямления, которые в миокарде крысы представлены ультрабыстрым током I_{Kur} и транзиторным током I_{to}. Для этого были проведены эксперименты на желудочковых кардиомиоцитах мышей, у которых набор ионных токов не отличаются от таковых крыс, но значительно удобнее для регистрации токов.

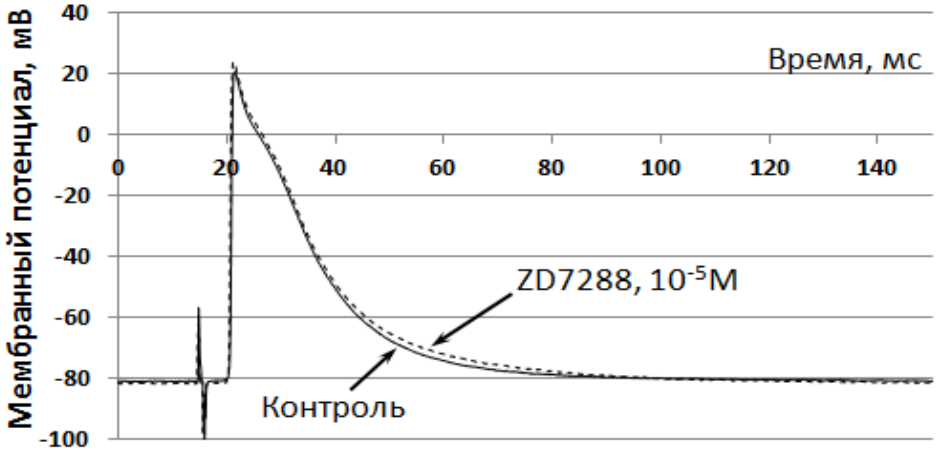
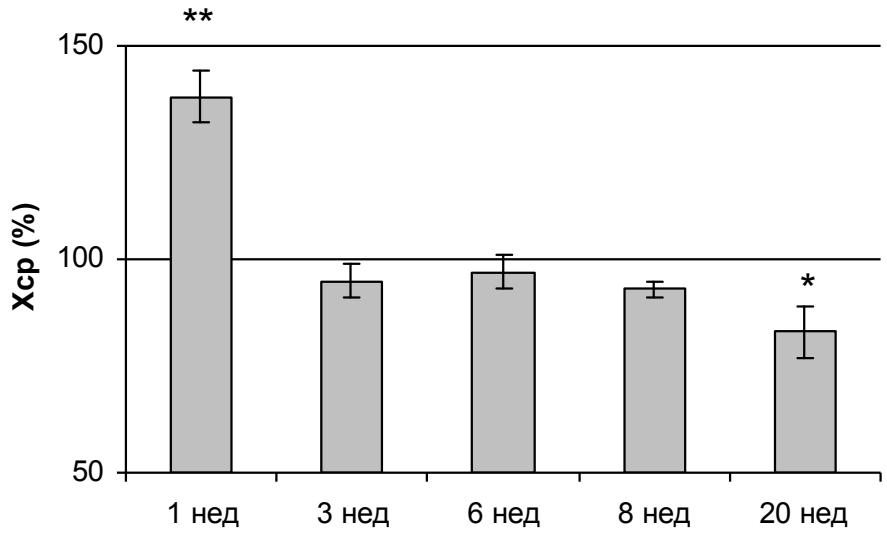


Рисунок 1 – Эффекты ZD7288 (10^{-5}M) в препарате изолированной стенки правого желудочка крысы в контроле и на фоне аппликации ZD7288

В экспериментах с регистрацией ионных токов методом patch-clamp было показано, что ZD7288 в концентрации 10^{-5}M не оказывал достоверного влияния ни на один из перечисленных калиевых токов. С другой стороны, при сдвиге мембранного потенциала от поддерживаемого уровня -35 мВ до -120 мВ в кардиомиоцитах желудочков был показан небольшой медленно активирующийся ток входящего направления величиной 0,95±0,14 пА/пФ. Блокатор If ZD7288 в концентрации 10^{-5}M снижал данный ток на 78,3±7,2% от контрольной величины, что в совокупности с кинетическими свойствами тока позволило сделать вывод о его принадлежности к If.

Исследование холинергической регуляции сердечной деятельности взрослых крыс

С целью выявления роли М-ХР в регуляции сердечно-сосудистой системы были проделаны эксперименты с селективной и неселективной блокадой М-ХР и последующей электрической стимуляцией блуждающих нервов на фоне действия блокаторов М-ХР. Введение взрослым животным атропина не вызывало достоверных изменений показателей вариационной пульсограммы. При селективной блокаде M_1-холинорецепторов пирензепином у 20-ти недельных крыс значение Хср недостоверно уменьшалось. В серии экспериментов с блокадой M_2-холинорецепторов галламином не наблюдалось существенного изменения показателей работы сердца. При блокаде M_3-ХР на 30 секунде эксперимента наблюдалось достоверное снижение значение Хср с 177,7±32,1 мс до 149,2±12,1 мс ($P<0,05$) (Рисунок 2). Затем, в течение 15 минут, мы наблюдали плавное восстановление частоты сердцебиений. Для выяснения роли каждого из подтипов М-холинорецептров в экстренном тормозном влиянии вагуса на сердце были проведены несколько серий экспериментов, в которых мы осуществляли регистрацию значений параметров сердечно-сосудистой системы при стимуляции вагуса на фоне блокады разных подтипов М-ХР.



(*-P<0,05; **-P<0,01)

Рисунок 2 – Влияние введения 4-DAMP на хронотропию сердца крыс

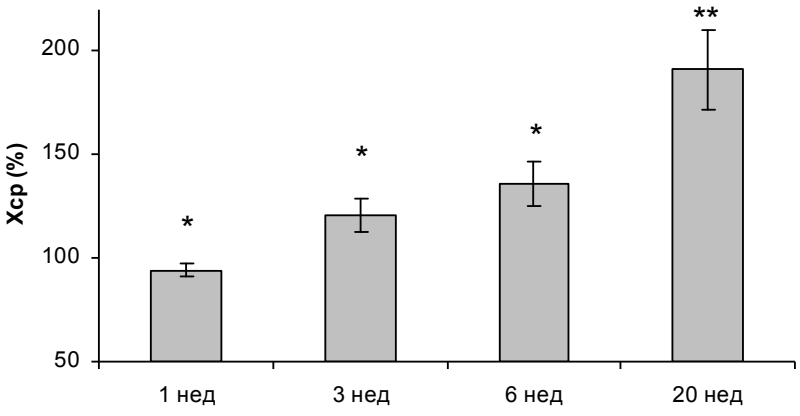
При электрической стимуляции вагуса у интактных животных (до введения блокаторов) наблюдалась выраженная брадикардия и существенная гипотония. Изменение показателей вариабельности сердечного ритма указывало на увеличение активности парасимпатического отдела ВНС. При электрической стимуляции вагуса на фоне действия атропина АД и частота сердцебиений не изменялись. Электрическая стимуляция вагуса на фоне действия пирензепина вызывала увеличение значения Xcp с 167,5±4,0 мс до 217,4±25,2 мс (P<0,05), снижению систолического АД – с 95,2±6,2 мм.рт.ст. до 84,2±8,4 мм.рт.ст., диастолического – с 73,3±3,7 мм.рт.ст. до 65,27±7,6 мм.рт.ст. При этом наблюдалось снижение значения AMo (P<0,01), увеличение значение ΔX. Электрическая стимуляция правого вагуса на фоне действия галламина приводила к повышению значения Xcp с 198,5±8,7 мс до 286,3±27,7 мс (P<0,05), понижению ДАД с 62,7±7,7 мм.рт.ст. до 45,7±9,9 мм.рт.ст., САД с 83,4±6,9 мм.рт.ст. до 70,3±8,98 мм.рт.ст. Электрическая стимуляция правого вагуса на фоне действия селективного блокатора M_3-ХР приводила к брадикардии.

Дозозависимое влияние карбахолина на сократимость миокарда предсердий и желудочков крыс мы изучали в диапазоне концентраций 10^{-5} – 10^{-9}М. После добавления карбахолина 10^{-5} М сила сокращения миокарда предсердий снижалась с 0,280757±0,069024 g до 0,222947±0,055694 g (p<0,01), миокарда желудочков с 0,276514±0,058016g до 0,195407±0,048672 g (p<0,001) В остальных концентрациях карбахолин не вызывал существенных изменений силы сокращения миокарда предсердий и желудочков взрослых крыс. На фоне действия различных доз неселективного блокатора М-ХР (10^{-6} – 10^{-3} М) добавляли карбахолин (10^{-5} М), поскольку именно данная доза агониста вызывала достоверный отрицательный инотропный эффект. Карбахолин на фоне атропина приводил к снижению силы сокращения миокарда предсердий и желудочков.

Селективная блокада М-ХР пирензипином, галламином, 4-DAMP не отменяла отрицательный инотропный эффект карбахолина (10^{-5} М) на миокард предсердий и желудочков взрослых крыс.

Исследование адренергической регуляции сердечной деятельности новорожденных крысят

Внутривенное введение неселективного блокатора α-адренорецепторов фентоламина новорожденным крысятам не приводило к выраженным изменениям частоты сердцебиений. Внутривенное болюсное введение блокатора β-АР обзидана новорожденных крысятам к 15 минуте приводило к плавному увеличению величины Хср с 300,2±11,2 мс до 440,8±37,3 мс ($p<0,05$). Был проведен анализ экспериментальных результатов с селективной блокадой α_1-АР празозином и избирательной блокадой α_2-АР йохимбином у новорожденных животных. Блокада α_1-адренорецептров празозином новорожденных крысят не приводила к выраженным изменениям ЧСС. Внутривенное болюсное введение блокатора α_2-адренорецепторов йохимбина новорожденным крысятам приводило к плавному увеличению значений Хср с 160,8±3,2 мс до 183,2±8,3 мс ($p<0,05$). Показатель Мо характеризущий гуморальный канал регуляции, увеличивался с 159,6±3,1 мс до 177,2±7,2 мс ($p<0,05$). Остальные показатели параметров вариабельности сердечного ритма не изменялись. Для выявления роли подтипов α_1-адренорецепторов в хронотропии новорожденных крысят проведены эксперименты селективной блокадой α_{1A}- α_{1B}- α_{1D}-АР. Введение селективного блокатора α_{1A}-АР WB 4101 новорожденным крысятам приводило к снижению значения Хср с 135±2,7 мс до 121±4,2 мс ($p<0,05$) (Рисунок 3). Наблюдалось достоверное снижение значения АМо. Остальные показатели вариабельности сердечного ритма не изменялись. Внутривенное болюсное введение блокатора α_{1B}-АР хлороэтилклонидина новорожденным крысятам не приводило к существенным изменениям значений Хср. Внутривенное введение селективного блокатора α_{1D}-АР BMY 7378 1 недельным крысятам приводило к брадикардии. Через 30 минут после введения селективного блокатора α_{1D}-АР длительность среднего кардиоинтервала возрастала с 155,2±4,1 мс до 180,7±7,9 мс ($p<0,05$).



(*-P<0,05; **-P<0,01)

Рисунок 3 – Влияние введения WB 4101 на хронотропию сердца крыс

Для выявления роли адренорецепторов в формировании возрастных механизмов регуляции хронотропии и инотропии сердца были проведены эксперименты с введением различных агонистов адренорецепторов. Внутривенное болюсное введение норадреналина новорожденным крысятам приводило к учащению работы сердца. Через 1 минуту после введения агониста АР значение Хср снижалось с 133,7±0,7 мс до 127,6±0,48 мс ($p<0,01$). Введение агониста α-АР фенилэфрина новорожденным крысятам приводило к увеличению Хср с 130,2±2,66 мс до 142,3±3,51 мс ($p<0,05$). Внутривенное болюсное введение агониста β-АР изопротеренола новорожденным крысятам не приводило к достоверным изменениям частоты сердцебиений. К 5 минуте после инъекции изопротеренола Хср снижалось с 177,7±7,9 мс до 163,3±8,4 мс и составило 9%.

Влияние норадреналина, фенилэфрина и изопртеренола на сократимость миокарда новорожденных крыс изучали в концентрациях 10^{-5} – 10^{-9} М. Введение агонистов разных типов адренорецепторов оказывало разнонаправленный эффект на сократимость миокарда как предсердий, так и желудочков 1 недельных крыс.

Для выявления возрастных особенностей адренергических механизмов хронотропии сердца были проведены эксперименты с введением данных агонистов на фоне блокады If и на фоне блокады $I_{Ca,L}$. Внутривенное болюсное введение агониста адренорецептров НА на фоне блокады If новорожденным крысятам не вызывало достоверных изменений частоты сердцебаений. Внутривенное болюсное введение новорожденным крысятам неселективного агониста АР на фоне блокады Са-токов L-типа снижало значение Хср с 126,4±1,6 мс до 118,3±8,2 мс ($p<0,01$). Введение агониста α-АР фенилэфрина на фоне действия ZD-7288 новорожденным крысятам не приводило к существенным изменениям ЧСС и показателей вариационной пульсограммы. Введение агониста α-АР на фоне блокады $I_{Ca,L}$ вызывало лишь тенденцию к урежению работы сердца у 1-но недельных крысят. Введение агониста α-АР на фоне действия верапамила приводило к активации парасимпатического отдела ВНС. После инъекции изопротеренола на фоне блокады HCN наблюдалось недостоверное уменьшение значений Хср. Изопротеренол на фоне верапамила у 1 недельных крысят снижал значения Хср с 155,3±10,8 мс до 106,6±3,33мс ($p<0,01$). После введения агониста на фоне верапамила наблюдалось снижение значений ИВР ($p<0,05$), Амо ($p<0,05$), ИН ($p<0,05$), ВПР ($p<0,05$) и указывало на повышение тонуса парасимпатического канала регуляции.

Влияние блокады If на инотропию миокарда новорожденных крысят

После введения ZD7288 наблюдалось увеличение силы сокращения миокарда предсердий с 0,05705±0,02559 g до 0,08467±0,03032 g ($p\leq0,01$) Добавление в перфузируемый раствор ZD7288 через 1 минуту увеличивало сократимость изолированного миокарда правого желудочка с 0,03522±0,00716 g до 0,03513±0,007 g, через 7 минут до 0,03616±0,00721 g ($p\leq0,05$). Максимальное

увеличение силы сокращения миокарда желудочков новорожденных крысят до 0,03953±0,00752 g (p≤0,01), наблюдалось на 21 минуте эксперимента (Таблица 1).

Исследование холинергической регуляции сердечной деятельности новорожденных крысят

С целью выявления роли М-ХР в регуляции работы сердца были проделаны серии экспериментов с селективной и неселективной блокадой различных подтипов М-ХР. Атропин не вызывал существенных изменений параметров вариационной пульсограммы новорожденных крысят. Введение животным пирензепина приводило к плавному достоверному увеличению значения Хср к 15 минуте с 187,3±5,91 мс до 205,1±4,8 мс (P<0,05). Изменение показателей вариационной пульсограммы говорит о снижении активности парасимпатического канала регуляции. Значение АМо уменьшалось с 61,14±2,5 % до 41,14±6,49 % (P<0,01), ΔХ возрастало с 3,57±0,2 мс до 4,71±0,36 мс (P<0,01). При внутривенном болюсном введении блокатора M_2-ХР галламина через 15 минут наблюдалось некоторое увеличение значения Хср с 172,4±10,71 мс до 182,5±12,63 мс. При селективной блокаде M_3-холинорецепторов 4-DAMP новорожденных крысят значение Хср к 30 секунде после введения препарата повышалось с 241,5±6,7 мс до 332,1±15,6 мс (P<0,01). Через 1 минуту действия 4-DAMP Хср имело значение 264,4±8,6 мс (P<0,05). На 30 секунде значение Амо уменьшалось с 51,56±3,0 % до 38,44±5,63% (P<0,05), значение ΔХ повышалось с 4,89±0,39 мс до 60,78±28,9 мс (P<0,05).

При электрической стимуляции вагуса до блокады М-ХР новорожденных животных была зафиксирована брадикардия (P<0,05), увеличение значений ΔХ (P<0,01), уменьшение значений АМо (P<0,05). Электрическая стимуляция вагуса на фоне атропина не изменяла значения Хср. Не наблюдалось и изменений параметров вариационной пульсограммы. Электрическая стимуляция правого вагуса на фоне действия пирензепина у 1-но недельных крысят вызывала достоверную брадикардию. При электрической стимуляции правого вагуса на фоне действия галламина наблюдалось урежение сердечной деятельности, значение Хср увеличивалось с 149,8±7,5 мс до 318,4±35,9 мс (P<0,01), ΔХ с 4,7±0,7 мс до 71,7±25,7 мс (P<0,05). Величина Амо снижалась с 51,3±4,8 % до 22,67±0,4 % (P<0,01). Электрическая стимуляция правого вагуса на фоне действия 4-DAMP также приводила к увеличению значения Хср (P<0,05).

Дозозависимое влияние карбахолина на сократимость миокарда предсердий и желудочков новорожденных крыс мы изучали в диапазоне концентраций 10^{-5} – 10^{-9}М. Карбахолин – 10^{-5} М уменьшал силу сокращения миокарда предсердий новорожденных крысят с 0,067249±0,024253 g до 0,065602±0,024059 g, миокарда желудочков с 0,1269±0,0387 g до 0,1113±0,0343 g (p<0,01). Карбахолин в других концентрациях не приводил к достоверным изменениям силы сокращения полосок миокарда предсердий и желудочков новрожденных крысят.

Карбахолин на фоне атропина всех концентраций (10^{-6} – 10^{-3} М) приводил к достоверному снижению силы сокращения миокарда предсердий и желудочков.

Селективная блокада М-ХР пирензипином, галламином, 4-DAMP также не отменяла отрицательный инотропный эффект карбахолина (10^{-5} М) на миокард предсердий и желудочков новорожденных крысят.

Исследование адренергической регуляции сердечной деятельности крыс в начале формирования адренергической иннервации

Внутривенное введение блокатора α-АР фентоламина 3 недельным крысятам не вызывало у них достоверных изменений частоты сердечных сокращений. Внутривенное болюсное введение блокатора β-АР обзидана приводило к увеличению Хср с 133±5,6 мс до 164±16,8мс, что составила 20% от исходных значений. Был проведен сравнительный анализ результатов экспериментов с введением селективного блокатора α_1-АР празозина и блокатора α_2-АР йохимбина. Внутривенное болюсное введение празозина 3-х недельным крысятам приводило к увеличению значений Хср на 12 %. В серии экспериментов с блокадой α_2-адренорецепторов через 15 минут после введения йохимбина наблюдалось повышение значений Хср с 122,5±0,7 мс до 136,5±3,5 мс ($p<0,01$). К 30 минуте после инъекции йохимбина значение Хср составило 131±2 мс ($p<0,05$). Изменение значений показателей вариационной пульсограммы указывало на увеличение активности парасимпатического отдела ВНС.

Для выявления роли подтипов α_1-адренорецепторов в хронотропии сердца 3-х недельных крысят проведены эксперименты селективной блокадой α_{1A}- α_{1B}- α_{1D}-АР. Блокада α_{1A}-АР у 3-х недельных крысят увеличивала значение Хср с 126,6±7,5 мс 154,5±11,3 мс ($p<0,05$). Введение блокатора α_{1B}-АР хлорэтилклонидина животным 3-х недельного возраста не приводило к существенным изменениям ЧСС и показателей вариационной пульсограммы. Селективный блокатор α_{1D}-АР BMY 7378 приводил к значительной брадикардии ($p<0,05$). При этом, увеличивались значения ΔХ ($p<0,05$), снижались значения Амо ($p<0,01$).

При внутривенном введении норадреналина 3-х недельным крысятам у них не наблюдалось достоверных изменений параметров вариационной пульсограммы. Максимальное уменьшение значений Хср с 123,6±3,1 мс до 118,7±2,8 мс наблюдалось через 1 минуту после введения норадреналина. Внутривенное болюсное введение фенилэфрина 3 недельным животным приводило к достоверной брадикардии. Сразу после введения агониста у них наблюдалось максимальное увеличение значений Хср с 131,3±3,9 мс до 150,8±6,4 мс ($p<0,05$). Через 1 минуту значения Хср восстанавливались. При этом наблюдалось достоверное снижение значений ИВР, ИН, ВПР, Амо, ПАПР, что говорит о повышения активности парасимпатического канала регуляции. После введения неселективного агониста β-АР наблюдалось уменьшение значений Хср с 153±5,8 мс до 126,6±4,64 мс ($p<0,01$). К 5 минуте после инъекции изопротеренола значения Мо снижались с 152,7±5,6 мс до 127,8±4,96 мс ($p<0,01$).

Влияние норадреналина, фенлэфрина, изопротеренола на сократимость миокарда 3 недельных крыс изучали в концентрациях 10^{-5} – 10^{-9} М. Введение

агонистов разных адренорецепторов оказывало разнонаправленный эффект на сократимость миокарда как предсердий, так и желудочков 3 недельных крыс.

Внутривенное введение норадреналина на фоне действия блокады HCN 21 дневным крысятам вызывало достоверную тахикардию. После введения норадреналина на фоне действия блокатора наблюдалось уменьшение значений Xcp с 152±4,98 мс до 137,62±4,03 мс ($p<0,05$). Значения ΔX увеличивались с 5,62±0,6 мс до 20,9±4,7 мс ($p<0,05$), δ с 1,6±0,3 мс до 33,5±12,6 мс ($p<0,05$), Значения ИВР, ИН, ВПР уменьшались. Подобная динамика праметров вариабельности сердечного ритма говорит об увеличении тонуса парасимпатического отдела ВНС. Внутривенное введение агониста адренорецепторов при действии верапамила 21 дневным крысятам приводило к достоверной двухфазной тахикардии. Через 1 минуту после введения норадреналина Xcp снижалось с 199±10,7 мс до 138,7±12,5 мс ($p<0,01$), затем его значение восстанавливалось. К 10 минуте после инъекции норадреналина на фоне блокады $I_{Ca,L}$ значения Xcp снова снижались до 167±8,5 мс ($p<0,05$), а к 30 минуте до 156,28±11,44 мс ($p<0,05$).

Внутривенное введение фенилэфрина на фоне блокады HCN 21 дневным крысятам не приводило к существенным изменениям хронотропии сердца. После введения агониста α-АР на фоне действия верапамила значение Xcp повышалось с 164±12,01 мс до 219,4±17,5 мс ($p<0,05$). Через 3 минуты после инъекции агониста α-адренорецепторов на фоне блокады $I_{Ca,L}$ значение Xcp снижалось до 133,85±1,96 мс ($p<0,05$). Тахикардия в ходе эксперимента сохранялась до 10 минуты наблюдений ($p<0,05$). Брадикардия сопровождалось снижением значений ИВР ($p<0,05$), ПАПР ($p<0,01$), Амо ($p<0,01$), ВПР ($p<0,01$). Данные изменения говорят об увеличении активности парасимпатического канала регуляции. Тахикардия сопровождалась повышением симпатических регуляторных влияний, достоверно уменьшалось значение Мо ($p<0,05$), значения ПАПР ($p<0,05$), АМо ($p<0,05$) увеличивались.

После внутривенного введения изопротеренола на фоне действия блокатора If ZD-7288 наблюдалось кратковременное недостоверное учащение работы сердца крысят 3-х недельного возраста. После внутривенного болюсного введения неспецифического агониста β-АР изопротеренола на фоне блокады потенциалзависимых кальциевых токов L-типа у животных 3-х недельного возраста наблюдалось учащение работы сердца, значение Xcp снижалось с 118,7±5,95 мс до 97,3±4,01 мс ($p<0,05$).

Влияние блокады If на инотропию миокарда 3-х недельных крыс

Через 1 минуту после добавления блокатора HCN каналов сила сокращения миокарда правого предсердия снижалась с 0,256±0,137 g до 0,255±0,135 g ($p\leq0,01$), через 7 минут до 0,249±0,133 g ($p\leq0,05$). Через 14 минут эксперимента сила сокращения миокарда правого предсердия плавно уменьшалась до 0,2397±0,13019 g ($p\leq0,05$). К 21 минуте после добавления ZD7288 наблюдалось понижение силы сокращения миокарда предсердия до 0,22415±0,1298 g ($p\leq0,01$).

Блокада HCN каналов приводила к ослаблению силы сокращения миокарда правого желудочка 21 дневных животных. Сила сокращения миокарда желудочков снижалась с 0,088±0,019 до 0,072±0,014 g ($p \leq 0,01$) (Таблица 1).

Исследование холинергической регуляции сердечной деятельности 3-х недельных крыс

С целью выявления роли М-ХР в регуляции работы сердца 21 дневных животных были проделаны эксперименты с селективной и неселективной блокадой М-ХР, а также с электрической стимуляцией блуждающих нервов на фоне действия блокаторов М-ХР.

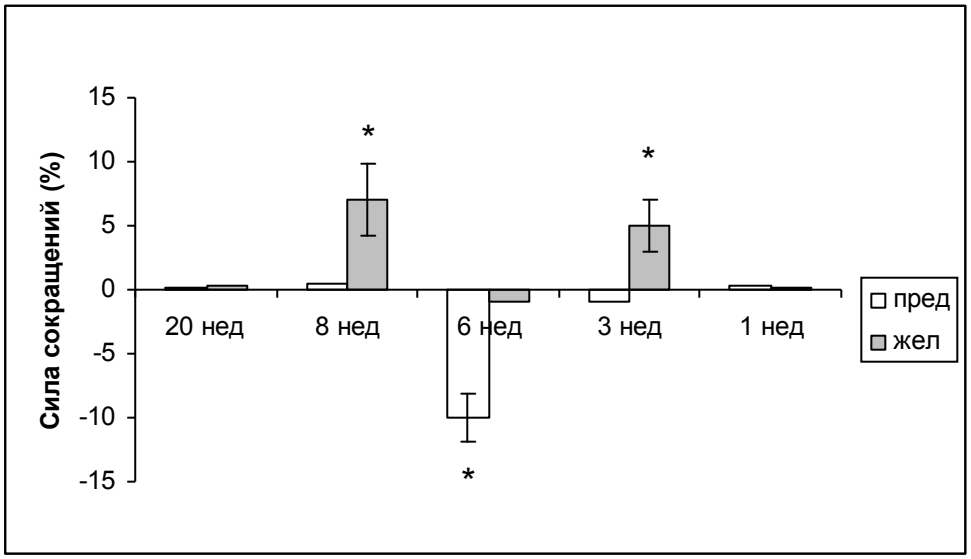
Атропин на 1 минуте вызывал некоторое снижение значений Хср с 133,0±5,6 мс до 123,0±9,6 мс, Амо с 30,0±1,99 % до 25,8±2,2 % ($P<0,01$). Болюсное внутривенное введение 3-х недельным животным селективного блокатора M_1-ХР пирензепина не приводило к существенным изменениям частоты сердечных сокращений. Через 15 минут после введения препарата значения Хср снижались с 148,3±12,6 мс до 144,7±14,4 мс. Галламин на 15 минуте несколько снижал значение Хср с 144,5±10,64 мс до 136,1±8,96 мс. При этом наблюдалось небольшое увеличение значений АМо с 50,57±1,21 % до 58,57±1,78 % ($P<0,01$). При избирательной блокаде M_3-холинорецепторов препаратом 4-DAMP у 3-х недельных крыс значение Хср незначительно изменялось с 132,8±3,5 мс до 125,3±4,8 мс.

Стимуляция правого вагуса интактных 3 недельных крысят приводила к достоверному урежению частоты сердечных сокращений ($P<0,01$). Значение ΔХ увеличивалось ($P<0,05$), АМо уменьшалось ($P<0,01$). Стимуляция вагуса на фоне атропина не приводила к урежению сердечной деятельности и изменению значений других параметров вариационной пульсограммы. Электрическая стимуляция вагуса на фоне пирензепина увеличивала значения Хср с 172,2±7,6 мс до 413,4±71,8 мс ($P<0,05$), ΔХ с 4,75±0,57 мс до 160,5±51,53 мс, снижала значение АМо с 61,0±3,57 % до 21,0±4,8 % ($P<0,01$). Стимуляция вагуса на фоне галламина повышала значения Хср с 251,0±4,6 мс до 366,7±39,3 мс ($P<0,05$), ΔХ с 27,7±9,8 мс до 114,7±58,1 мс. При этом значения АМо снижались с 31,33±1,41 % до 22,67±3,2 % ($P<0,05$). Электрическая стимуляция вагуса на фоне 4-DAMP вызывала увеличение Хср с 135,5±1,6 мс до 296,5±48,97 мс ($P<0,05$), ΔХ с 6,75±2,08 мс до 69,5±16,13 мс ($P<0,05$), уменьшение значений Амо с 52,5±4,68 % до 27,5±4,47 % ($P<0,05$).

Дозозависимое влияние карбахолина на сократимость миокарда предсердий и желудочков крыс 3-х недельного возраста мы изучали в диапазоне концентраций 10^{-5} – 10^{-9}М. Карбахолин в концентрации 10^{-5} М снижал силу сокращения миокарда правого предсердия с 0,1847±0,059 g до 0,121994±0,041111 g ($p<0,01$), миокарда правого желудочка с 0,1216±0,024 g до 0,076±0,0165 g ($p<0,01$). Добавление карбахолина в концентрации 10^{-6} М уменьшало силу сокращения миокарда правого предсердия с 0,1546±0,048 g до 0,1498±0,04872 g ($p<0,05$) и не вызывало изменения параметров сокращения миокарда правого

желудочка. Добавление карбахолина в других концентрациях не вызывало изменений силы сокращения миокарда правого предсердия и желудочка 21 дневных животных.

На фоне действия различных доз неселективного блокатора М-ХР атропина (10^{-6} – 10^{-3} М) в рабочий раствор добавляли карбахолин (10^{-5} М). Карбахолин на фоне всех изученных концентраций атропина достоверно снижал силу сокращения миокарда предсердий и желудочков 3 недельных крысят. Галламин в концентрации 10^{-6} М усиливал сокращения миокарда желудочков с 0,15884 ±0,0887 g до 0,162±0,089 g ($p<0,05$) 3 недельных крысят (Рисунок 4). Селективная блокада М-ХР пирензипином, галламином, 4-DAMP не отменяла отрицательный инотропный эффект карбахолина (10^{-5} М) на миокард предсердий и желудочков 21 дневных крысят.



(*-P<0,05)

Рисунок 4 – Влияние галламина на силу сокращения миокарда предсердий и желудочков крыс

Исследование регуляции сердечной деятельности крыс при завершении формирования адренергической иннервации

Исследование адренергической регуляции сердечной деятельности 6-ти недельных крыс

Для полного представления о значении β- и α-адренорецепторов в регуляции функций сердца 6-ти недельных крыс были проведены эксперименты с блокадой α-адренорецепторов фентоламином и β-адренорецепторов обзиданом. Блокатор α-АР не приводил к достоверным изменениям хронотропии 6 недельных крыс. Введение обзидана крысам 6-ти недельного возраста через 15 минут приводило к увеличению значений Хср с 168±8,5мс до 226±6,8мс ($p<0,001$).

Был проведен сравнительный анализ результатов экспериментов с введением селективного блокатора α_1-АР празозина и избирательного блокатора

α_2-АР йохимбина 6-ти недельным крысам. Блокатор α_1-АР увеличивал значение Хср с 152,5±3,5 мс до 209,5±9,7 мс ($p<0,001$). После внутривенного болюсного введения йохимбина не наблюдалось значительных изменений частоты сердечных сокращений.

Для выявления роли подтипов α_1-адренорецепторов в хронотропии 6-ти недельных крыс проведены эксперименты селективной блокадой α_{1A}- α_{1B}- α_{1D}-АР. При блокаде α_{1A}-АР значение Хср повышалось с 144±10,7 мс до 193,2±16,3 мс ($p<0,05$). Через 30 минут после внутривенного введения селективного блокатора α_{1B}-АР Хср повышалось с 153±9,0 мс до 177±5,0 мс ($p<0,05$). После инъекции блокатора α_{1D}-АР значение Хср повышалось с 155,2±7,3 мс до 196,7±12,0 мс ($p<0,05$).

Сразу после введения норадреналина наблюдалось резкое уменьшение значений Хср с 143±4,7 мс до 124,1±2,3 мс ($p<0,01$), через 15 минут оно восстанавливалось до 144,85±5,36 мс. Мо снижалось с 142,14±4,5 мс до 123±2,2 мс ($p<0,01$). Значения ИВР, ИН, ВПР, АМо, ПАПР изменялись недостоверно. При внутривенной инъекции фенилэфрина крысам 6-ти недельного возраста наблюдалась достоверная динамика параметров вариабельности сердечного ритма. Брадикардия была более выраженной – 116 % ($p<0,01$), чем у 20 недельных крыс – на 60% ($p<0,01$). К 3 минуте после внутривенного болюсного введения агониста β-адренорецепторов изопротеренола 6-ти недельным крысам наблюдалось уменьшение значений Хср с 183,1±13,41 мс до 139±7,4 мс ($p<0,05$). При этом наблюдалось уменьшение значений Мо с 183,0±13,39 мс до 139±7,3 мс ($p<0,05$). Другие параметры вариационной пульсограммы изменялись недостоверно.

Влияние норадреналина, фенилэфрина, изопротеренола на сократимость миокарда 6 недельных крыс изучали концентрациях 10^{-5} – 10^{-9} М. Введение агонистов разных типов адренорецепторов оказывало разнонаправленный эффект на сократимость миокарда как предсердий, так и желудочков 6 недельных крыс.

Введение норадреналина на фоне блокады HCN 6 недельным крысятам не вызывало достоверных изменений частоты сердечных сокращений. При внутривенном болюсном введении норадреналина на фоне действия блокатора $I_{Ca,L}$ не наблюдалось значительных изменений показателей работы сердца.

Внутривенное болюсное введение неселективного агониста всех α-АР на фоне блокады HCN 42 дневным крысам вызывало брадикардию – 57 % ($p<0,01$). После введения фенилэфрина на фоне блокады $I_{Ca,L}$ у 6 недельных крыс было зафиксировано достоверное урежение ЧСС. Значение Хср после введения фенилэфрина увеличивалось с 146,6±2,6 мс до 225,4±15,2 мс ($p<0,01$). При этом снижались значения ИН ($p<0,001$), Амо ($p<0,001$), ВПР ($p<0,001$), ИВР ($p<0,001$), ПАПР ($p<0,001$) и увеличивались значения δ($p<0,01$), Мо ($p<0,05$), ΔХ($p<0,01$).

Введение неселективного агониста β-АР изопротеренола на фоне блокады HCN каналов 42 дневным крысам вызывало несущественное снижение значений Хср с 189,14±14,75 мс до 179,42±14,84 мс. Через 3 минуты после введения изопротеренола на фоне действия блокатора $I_{Ca,L}$ верапамила у крыс 6-ти недельного возраста наблюдалось изменение значений Хср с 141,3±4,5 мс до

124,7±4,0 мс ($p<0,05$), через 15 минут до 127,85±2,77 мс ($p<0,05$). Также уменьшались значения ИВР ($p<0,05$), ВПР ($p<0,05$), увеличивалась величина ΔX ($p<0,05$), что указывает на активацию парасимпатического отдела регуляции работы сердца. Дальнейшее учащение сердечного ритма приводило к повышению значений Mo ($p<0,05$) и увеличение значений ИН ($p<0,01$), ВПР ($p<0,05$), ПАПР ($p<0,05$). Эти изменения свидетельствуют о повышении активности симпатического отдела ВНС.

Влияние блокады If на инотропию миокарда 6-ти недельных крыс

Через 1 минуту после блокады If ZD7288 сила сокращения изолированных полосок миокарда предсердий несколько увеличивалась с 0,151803±0,034102 g до 0,157949±0,035443 g. К 7 минуте сила сокращения миокарда предсердий повысилась до 0,1649±0,03632 g ($p<0,05$), на 21 минуте до 0,169924±0,034347 g ($p<0,05$). Сила сокращения миокарда правого желудочка достоверно повышалась через 7 минут после добавления в перфузируемый раствор ZD7288 с 0,068751±0,026909 g до 0,0800461±0,031674 g ($p\leq0,05$). На заключительной 21 минуте величина силы сокращения полосок миокарда желудочков составляла 0,086±0,033 g ($p\leq0,05$). Таким образом, блокада If увеличивала силу сокращения миокарда как предсердий, так и желудочков 42 дневных крыс (Таблица 1).

Влияние блокады If на инотропию миокарда 8-ми недельных крыс

Добавление блокатора If ZD7288 увеличивало силу сокращения миокарда правого предсердия с 0,233±0,052 g до 0,30145±0,06636 g ($p\leq0,05$). Блокада If приводила к усилению сокращений миокарда правого желудочка 8 недельных крыс. Сила сокращения миокарда желудочков повышалась с 0,1074±0,009 g с до 0,13272±0,0129 g ($p\leq0,05$). Таким образом, эксперименты с введением селективного блокатора If ZD7288 зафиксировали усиление сокращения миокарда желудочков 8 недельных крыс (Таблица 1).

Исследование холинергической регуляции сердечной деятельности 6-ти недельных крыс

Блокада М-ХР атропином не приводила к существенным изменениям показателей вариабельности сердечного ритма. Пирензепин на 5 минуте снижал значения Xcp со 168,3±8,35 мс до 152,6±6,38 мс. При внутривенном болюсном введении селективного блокатора M_2-ХР галламина не наблюдалось существенных изменений параметров сердечно-сосудистой системы. При селективной блокаде M_3-ХР препаратом 4-DAMP значение Xcp у 6-ти недельных животных снижалось к 1 минуте на 3 %, с 151,3±7,0 мс до 146,9±6,4 мс. Показатели вариационной пульсограммы существенно не менялись.

Электрическая стимуляция вагуса до инъекции блокаторов М-ХР приводила к брадикардии. Систолическое АД снижалось с 97,8±5,02 мм.рт.ст. до 77,2±4,8

мм.рт.ст. (P<0,01), ДАД – с 75,9±4,7 мм.рт.ст. до 47,7±6,3 мм.рт.ст. (P<0,01). При стимуляции правого вагуса на фоне действия атропина не наблюдалось существенных изменений параметров сердечно-сосудистой системы. При электрической стимуляции вагуса на фоне действия пирензепина значения Хср повышались с 166,5±8,4 мс до 407,3±61,8 мс (P<0,01). САД снижалось с 86,3±2,7 мм.рт.ст. до 62,4±1,4 мм.рт.ст. (P<0,001), ДАД с 76,9±3,5 мм.рт.ст. до 49,9±2,2 мм.рт.ст. (P<0,001). Значение Амо снижалось с 48,0±5,5 % до 22,0±3,09 % (P<0,01), значение ΔХ увеличивалось с 16,9±10,1 мс до 109,0±33,7 мс. Стимуляция вагуса на фоне галламина повышала значение Хср с 192,4±10,0 мс до 315,7±42,9 мс (P<0,05), значение ΔХ с 7,14±1,61 мс до 333,3±127,9 мс (P<0,05), снижала значение АМо с 42,6±3,5 % до 23,4±5,96 % (P<0,05). Стимуляция правого вагуса электрическими стимулами на фоне препарата 4-DAMP приводила к увеличению значений Хср с 150,6±5,3 мс до 245,0±9,3 мс (P<0,001), ΔХ с 4,4±0,4 мс до 39,7±16,9 мс (P<0,01), снижению значения Амо с 50,0±3,9 % до 25,4±2,5 % (P<0,001). САД снижалось с 98,6±6,8 мм.рт.ст. до 84,8±5,96 мм.рт.ст., ДАД с 72,63±7,82 мм.рт.ст. до 52,3±5,55 мм.рт.ст. (P<0,01).

Дозозависимое влияние карбахолина на сократимость миокарда предсердий и желудочков 6-ти недельных крыс мы изучали в диапазоне концентраций 10^{-5} – 10^{-9}М. Карбахолин – 10^{-5} М уменьшал силу сокращения миокарда предсердий (p<0,001). Снижение силы сокращения миокарда желудочков наблюдалось при добавлении карбахолина в концентрации 10^{-5} М (p<0,001), 10^{-8} М (p<0,01). Карбахолин в других концентрациях не вызывал изменений параметров сократимости миокарда предсердий и желудочков.

На фоне действия различных доз неселективного блокатора М-ХР атропина (10^{-6} – 10^{-3} М) добавляли стойкий агонист холинорецепторов карбахолин (10^{-5} М). Карбахолин на фоне всех концентраций атропина достоверно снижал силу сокращения миокарда предсердий и желудочков 6 недельных крысят. Пирензипин – 10^{-6} М на 9 минуте снижал силу сокращения миокарда желудочков 6 недельных крысят с 0,107±0,0278 g 0,103±0,026 g (p<0,05). Галламин в концентрации 10^{-6} М снижал силу сокращения миокарда предсердий с 0,2436±0,04967 g до 0,2213±0,044 g (p<0,05) (Рисунок 4). Селективная блокада М-ХР пирензипином, галламином, 4-DAMP не отменяла отрицательный инотропный эффект карбахолина (10^{-5} М) на миокард предсердий и желудочков 42 дневных крысят.

Исследование холинергической регуляции сердечной деятельности 8-ми недельных крыс

При внутривенном болюсном введении неселективного блокатора мускариновых холинорецепторов атропина не наблюдалось достоверных изменений значений Хср. При избирательной блокаде M_1-ХР пирензепином наблюдалось некоторое снижение значения Хср с 155,9±2,9 мс до 147,4±4,3 мс. Артериальное давление также снижалось незначительно. Наблюдалось повышение значения АМо с 51,1±3,02% до 60,9±2,9 % (P<0,05) и снижение ΔХ с 5,7±0,4 мс до 3,9±0,14 мс (P<0,01). При введении галламина наблюдалось некоторое снижение значения Хср с 166,6±14,7 мс до 151,5±9,71 мс. При

внутривенном болюсном введении селективного блокатора M_3-ХР 4-DAMP наблюдалось некоторое снижение значения Хср с 163,1±7,6 мс до 151,5±4,07 мс к концу 1 минуты эксперимента. Параметры вариабельности сердечного ритма существенно не менялись. Достоверное снижение САД ($P<0,01$) и ДАД ($P<0,01$) было зафиксировано через 30 секунд после введении 4-DAMP.

Электрическая стимуляция блуждающего нерва до введения блокаторов М-ХР вызывала у животных данной возрастной группы достоверную брадикардию. Электрическая стимуляция вагуса на фоне действия блокатора мускариновых холинорецепторов атропина не приводила к изменениям значений Хср, артериального давления и других показателей вариабельности ритма сердца. Стимуляция вагуса на фоне блокады M_1-холинорецепторов вызывала брадикардию. Хср увеличивалось с 149,8±2,9 мс до 265,2±25,9 мс ($P<0,01$). Также снижалось САД с 78,4±3,4 мм.рт.ст. до 62,2±4,14 мм.рт.ст. ($P<0,01$), ДАД с 65,4±3,4 мм.рт.ст. до 47,7±4,4 мм.рт.ст. ($P<0,01$). Стимуляция правого вагуса на фоне болюсного введения блокатора M_2-ХР галламина также приводила к увеличению значения Хср с 155,1±10,4 мс до 211,4±20,6 мс ($P<0,05$), уменьшению АМо с 47,7±1,5 % до 30,6±3,3 % ($P<0,001$). Электрическая стимуляция правого блуждающего нерва на фоне действия 4-DAMP приводила к увеличению значения Хср с 171,6±13,2 мс до 290,7±50,5 мс ($P<0,05$), ΔХ с 6,9±1,14 мс до 77,9±51,6 мс и снижению САД с 70,7±7,5 мм.рт.ст. до 53,7±4,12 мм.рт.ст. ($P<0,05$). При этом значение АМо снижалось с 52,9±2,5 % до 29,4±3,01 % ($P<0,001$).

Дозозависимое влияние карбахолина на сократимость миокарда предсердий и желудочков крыс мы изучали в диапазоне концентраций 10^{-5} – 10^{-9}М. Карбахолин – 10^{-5} М на 1 минуте снижал силу сокращения миокарда предсердий с 0,2336±0,1125 g до до 0,1616±0,0854 g ($p<0,05$), миокарда желудочков с 0,12224±0,03696 g до 0,0764±0,026005g ($p<0,01$). Добавление карбахолина в концентрации 10^{-7} М к 7 минуте приводило к усилению сокращения миокарда предсердий с 1,096±0,174 g до 1,1395±0,1837 g ($p<0,05$), к 14 минуте до 1,1314±0,1791 g ($p<0,05$). Карбахолин – 10^{-8} М достоверно снижал силу сокращения миокарда предсердий с 1,055±0,16417 g до 1,019±0,1633 g ($p<0,01$). Добавление карбахолина в перфузируемый раствор в концентрации до 10^{-9} М усиливало сокращение миокарда желудочков с 0,2207±0,0378 g до 0,23277±0,0398 g ($p<0,05$). Карбахолин в других концентрациях не вызывал существенных изменений параметров сократимости миокарда предсердий и желудочков крыс 8 недельного возраста.

На фоне действия различных доз неселективного блокатора М-ХР атропина (10^{-6} – 10^{-3} М) добавляли стойкий агонист холинорецепторов карбахолин (10^{-5} М). Карбахолин на фоне всех концентраций атропина достоверно снижал силу сокращения миокарда предсердий и желудочков 8 недельных крысят. Пирензепин и 4-DAMP не оказывали влияния на силу сокращения миокарда предсердий и желудочков крыс 8-ми недельного возраста. Галламин не изменял силу сокращения миокарда предсердий, но увеличивал силу сокращения миокарда желудочков с 0,4141±0,1809 g до 0,4425±0,1896 g ($p<0,05$) g (Рисунок 4). Селективная блокада М-ХР пирензипином, галламином, 4-DAMP не отменяла

отрицательный инотропный эффект карбахолина (10^{-5} М) на миокард предсердий и желудочков 8 недельных крыс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что в организме млекопитающих и человека с возрастом происходит изменение активности симпатического и парасимпатического отделов ВНС. Многие современные исследователи связывают возрастные изменения деятельности сердца человека и животных именно с перестройкой рецепторных систем в сердце. Поэтому, настоящее исследование было посвящено изучению роли адренергической иннервации в становлении рецепторно-эффекторной системы регуляции сердца крыс. По классическим представлениям в вегетативной регуляции сердца участвуют два типа рецепторов: β-АР и М2-ХР. Выполняя антагонистические функции, они являются главными регуляторами функциональных параметров сердца [Myslivecek J. Et al., 2008]. Однако, известно, что в сердце присутствуют и другие типы адренорецепторов и мускариновых холинорецепторов. Нашей задачей было выявление роли разных подтипов адренорецпторов и мускариновых холинорецепторов в становлении вегетативной регуляции сердечной деятельности. Нами были выбраны экспериментальные животные с различными уровнями симпатической иннервации: 1) новорожденных крысят, у которых отсутствует симпатическая иннервация сердца, 2) крысята 3 недельного возраста – у них симпатическая иннервация сердца начинает формироваться, 3) 6 недельных животных, у которых заканчивается формирование симпатической иннервации сердца, 4) 20 недельные крысы – сложившиеся механизмы регуляции сердечной деятельности, характерные для взрослого животного.

С целью выявления роли различных адренорецепторов в механизмах регуляции работы сердца были проведены исследования влияния стимуляции и блокаде различных типов и подтипов данных рецепторов. Было показано, что норадреналин вызывает достоверное учащение сердечной деятельности у всех групп животных, за исключением 3-недельных крысят. Фенилэфрин приводит к урежению работы сердца во всех исследованных возрастных группах животных. Изопротеренол вызывает достоверное учащение сердечной деятельности у всех групп животных, за исключением 1-но недельных крысят. Инотропная реакция сердца на введение агонистов была не столь однозначной. Мы наблюдали разнонаправленную реакцию силы сокращения миокарда предсердий и желудочков на одни и те же концентрации норадреналина, фенилэфрина и изопротеренола, как у взрослых крыс, так и у развивающихся животных. По всей видимости, инотропная реакция на адренергические воздействия может быть как положительной, так и отрицательной и зависит от исходных функциональных особенностей миокарда.

Весьма интересным было проведение сравнительного анализа влияния блокады α- и β-адренорецепторов в начале и в конце периода формирования симпатической регуляции сердца. Показано, что блокада β-АР приводила к урежению работы сердца во всех исследованных возрастных группах животных, а

неселективная блокада α-АР фентоламином не оказывала существенного влияния на сердечный ритм. Однако, при избирательной блокаде α_1- и α_2-адренорецепторов мы получили интересные результаты. При блокаде α_1-адренорецепторов брадикардия с возрастом увеличивалась, а при блокаде α_2-адренорецепторов, наоборот, уменьшалась. На основании полученных результатов, можно сделать вывод, что адренергическая регуляция хронотропии сердца крыс осуществляется с участием α_1-АР и α_2-АР. Можно предположить, что с возрастом изменятся экспрессия и, как следствие, синаптическая локализация различных типов α-АР в сердце. Другим возможным объяснением полученных нами результатов являются особенности систем вторичных посредников, активируемых при взаимодействии лиганда с различными α-АР. Взаимодействие катехоловых аминов с α_1-АР активирует систему вторичных посредников, включающих инозитолтрифосфат и диацилглицерол, активация α_2-АР модулирует активность биохимического каскада аденилатциклаза/циклический аденозинмонофосфат. Несомненно, формирование симпатической иннервации сердца в постнатальном онтогенезе оказывает влияние на жизнедеятельность адренорецепторов.

В связи с постсинаптической локализацией α_1-АР мы решили изучить влияние селективной блокады всех подтипов α_1-АР на хронотропию сердца крыс. Исследования влияния блокады α_{1B}-адренорецепторов на сердечную деятельность крыс при формировании адренергической иннервации, выявили, что с возрастом наблюдалось увеличение выраженности брадикардии после введения хлороэтилклонидина. На основании полученных результатов, можно сделать вывод, что α_{1B}-АР участвуют в регуляции ритма сердца крыс после формирования симпатической регуляции сердечной деятельности. Несомненно, формирование симпатической иннервации сердца в постнатальном онтогенезе оказывает влияние на жизнедеятельность самих адренорецепторов. Полученные результаты могут быть связаны с существованием определенных возрастных различий в экспрессии, плотности, локализации и характеристиках ионных каналов в сердце. Полученные нами результаты, свидетельствуют о том, что α_{1D}-адренорецепторы имеют серьезное функциональное значение для адренергической регуляции ритма сердца на всех этапах постнатального онтогенеза крыс, хотя в литературе функциональная роль этого подтипа в сердце является спорной. Были получены результаты, подтверждающие гипотезу о существенном отличии адренергической регуляции сердечной деятельности у новорожденных крысят. Только в неонатальном периоде развития селективная блокада α_{1A}-АР приводила не к урежению сердечной деятельности, что наблюдалось во всех прочих возрастных группах животных, а к учащению работы сердца. Полученные результаты опровергают гипотезу о том, что адренергическая регуляция сердца крыс осуществляется только при участии β-АР. Возможны несколько механизмов противоположного эффекта блокады α_{1A}-АР на сердечную деятельность крыс разного возраста. Во-первых, и данная гипотеза проверяется наиболее интенсивно, мембранные рецепторы могут связываться с различными G-белками, экспрессия которых имеет возрастную зависимость. Во-вторых, следует

учитывать наличие возрастных особенностей синтеза различных внутриклеточных ферментов. Известно, что более отдаленным по времени эффектом стимуляции α_1-АР, является активация протеинканазы С. Кроме того, активация протеинкиназы С индуцируется диацилглицеролом, одним из вторичных посредников адренергической стимуляции. Запускающим механизмом возрастных различий реакции хронотропии сердца после селективной блокады α_{1A}-АР следует считать резкое увеличение высвобождения норадреналина и, возможно, и нейропептида Y, основного комедиатором симпатического отдела ВНС. Увеличение выброса норадреналина и нейропептида Y связано с формированием адренергической иннервации сердца на изученных нами этапах постнатального онтогенеза.

В литературе неоднократно отмечалась особая роль If токов для функций проводящей системы сердца. Ранее, нами было показано наличие существенных возрастных особенностей хронотропной реакции сердца на блокаду If [Зефиров Т.Л. и др., 2001]. Функциональное значение If в рабочих кардиомиоцитах, которые обладают стабильным мембранным потенциалом покоя не известно. Исследования по экспрессии HCN каналов указывают на присутствие всех четырех подтипов этих каналов в кардиомиоцитах желудочков [Cerbai E., Mugelli A., 2006; Fenske S. Et. al., 2011a; Mistrik P. Et. al., 2005; Schweizer P.A. et. al., 2009; Stillitano F. Et. al., 2008]. Для выявления роли данных токов в функциях рабочих кардиомиоцитов были проведены исследования по изучению блокады If на инотропию миокарда при формировании симпатической регуляции сердца крыс. Выявлено, что блокада If ведет к увеличению сократительной активности миокарда, как в предсердиях, так и в желудочках. Особый интерес представляет реакция рабочего миокарда предсердий и желудочков у 3-недельных животных. У них блокада If вызывала противоположный эффект, что может быть связано с началом формирования симпатической иннервации сердца в данном периоде постнатального онтогенеза. С целью изучения влияния блокады If на параметры электрической активности рабочих кардиомиоцитов мы исследовали действие ZD7288 на длительность потенциала действия рабочего миокард предсердий и желудочоков крысы. Основной эффект блокатора If ZD7288 в рабочем миокарде предсердий и желудочков крыс выражался в замедлении фазы реполяризации потенциала действия. Поскольку скорость реполяризации в рабочем миокарде крысы определяется в основном калиевыми токами, мы решили проверить возможность реализации наблюдаемых эффектов ZD7288 за счет его возможного действия на ток входящего выпрямления I_{K1}, на токи задержанного выпрямления, которые в миокарде крысы представлены ультрабыстрым током I_{Kur} и транзиторным током I_{to}. В экспериментах с регистрацией ионных токов методом patch-clamp было показано, что ZD7288 не оказывал достоверного влияния ни на один из перечисленных калиевых токов. С другой стороны, в кардиомиоцитах желудочков было показано наличие небольшого медленно активирующегося тока входящего направления, а ZD7288 достоверно снижал данный ток.

В настоящее время считается, что деполяризация в атипичных кардиомиоцитах, контролирующих хронотропию сердца, в основном связана с двумя типами ионных токов. Первые это – If, вторые – I_{CaL}. Было выявлено, что

именно If является важнейшим эффектором адренергической регуляции сердца крыс непосредственно с момента рождения. Полученные результаты указывают на то, что I_{CaL} не участвуют в адренергической регуляции хронотропии сердца новорожденных крысят, у которых признаки симпатической регуляции отсутствуют.

Считается, что регуляция функции сердца парасимпатическим отделом вегетативной нервной системы осуществляется при активации M_2-ХР. Для выявления роли разных подтипов мускариновых холинорецепторов в регуляции функций развивающегося сердца были проведены исследования с неселективной и селективной блокадой подтипов М-ХР. Результаты исследований по изучению холинергической регуляции сердца крыс показали, наличие положительной хронотропной реакции на блокаду третьего подтипов М-ХР у взрослых крыс. Возможно, что тормозное влияние вагуса у взрослых крыс осуществляется с участием именно M_3-холинорецепторов сердца. Результаты экспериментов на 1-недельных крысятах выявили у них урежение работы сердца при блокаде первого и третьего подтипов М-ХР. Возможно, что нечетные М-ХР в отсутствии симпатических регуляторных влияний в данном возрасте играют роль «ускорителей» сердечного ритма. В то же время мы не наблюдали изменений силы сокращения миокарда предсердий и желудочков взрослых и новорожденных крыс при введении селективных блокаторов M_1-, M_2-, M_3-ХР. При введении селективных блокаторов подтипов М-ХР мы не выявили достоверных изменений сердечного ритма у животных 3, 6 и 8 недельного возраста. Инотропная реакция сердца крыс данного возраста была разнообразной. При введении галламина наблюдалось увеличение сократимости миокарда предсердий крыс 3 недельного возраста. У 6-ти недельных крыс наблюдалось уменьшение силы сокращения полосок миокарда желудочков на введение блокатора M_1-ХР и уменьшение сократимости миокарда предсердий при блокаде M_2-ХР. У 8-ми недельных крыс наблюдалось увеличение силы сокращения миокарда желудочков на блокаду M_2-ХР. При этом карбахолин во всех исследованных возрастных группах вызывал отрицательный инотропный эффект на фоне селективной и неселективной блокады М-ХР. Таким образом, нами было показано, что блокада разных подтипов М-ХР приводит к существенным хронотропным ответам. Инотропные ответы в ответ на блокаду разных подтипов М-ХР были не столь явными. Кратковременное влияние блокаторов, применяемое в наших экспериментах вызывает изменение реакции частоты сердцебиений. Возможно, для получения инотропных ответов необходимы другие, например, длительные экспериментальные воздействия. Механизм регуляции хронотропии сердца парасимпатическим отделом вегетативной нервной системы является достаточно сложным. Ацетилхолин, выделяющийся из постганглионарных нервных волокон взаимодействует с мускариновыми холинорецепторами, которые могут активировать Gq/G11, Gi/Go белки. М2-ХР могут напрямик активировать I_{KACh}, что также приводит к замедлению синусового ритма. У крыс 3-х, 6-ти, 8-ми недельного возраста, при формировании симпатической иннервации сердца, хронотропной реакции на введение селективных блокаторов М-ХР не наблюдалось. При этом у них выявлено наличие инотропного эффекта в ответ на

блокаду первого и второго подтипов М-ХР. Причем увеличение сократительной активности миокарда при введении блокатора M_2-ХР легко объясняется связыванием М-ХР с Gi/o белком [Hendriks-Balk M.C. et al., 2008]. M_1-, M_3- и M_5-ХР могут участвовать в увеличении внутриклеточного Ca^{2+} [Wang Z. Et al., 2004], поэтому логичным является отрицательный инотропный эффект в ответ на введение блокатора M_1-ХР – пирензепина. Противоположные хронотропные и инотропные эффекты в ответ на селективную блокаду подтипов мускариновых холинорецепторов можно объяснить особенностями активации сигнальных путей. Во-первых, один М-ХР может связываться с различными G белками. Сейчас существует убедительные свидетельства того, что рекомбинантные M_1-, M_3- и M_5-ХР в культуре клеток могут взаимодействовать как Gs, так и Gi, белками [Eglen R.M, Nahorski S.R., 2000]. Во-вторых, четные и нечетные подтипы М-ХР могут связываться с одним и тем же G белком[Wang Z. Et al., 2004].

Таким образом, нами показано, что в регуляции функций сердца участвуют разные типы и подтипы адренорецепторов и М-ХР. Функциональные свойства рецепторов зависят от уровня сформированности симпатической иннервации сердца крысы. Выявлено, что не только классические β_1-АР и M_2-ХР участвуют в регуляции функций сердца. Напротив, у крысы нами выявлено, что, именно М3-холинорецепторы и подтипы альфа-АР участвуют в формировании возрастных особенностей механизмов регуляции сердечной деятельности. Нами выявлено, что такие эффекторы как HCN каналы и Ca каналы L-типа имеют существенные различия функциональной активности в осуществлении адренергической регуляции развивающегося сердца. Было выявлено, что именно If является важнейшим эффектором симпатической регуляции сердца крыс с момента рождения. Кроме того, в нашей работе была показана важная роль токов, активируемых при гиперполяризации в регуляции функций рабочих кардиомиоцитов.

Таким образом, возможно, что функциональные свойства рецепторов могут быть модифицированы путем изменения количество сайтов связывания на мембранах, изменением общей численности сайтов связывания и активацией различных эффекторов присутствующих в кардиомиоцитах. Эти события могут способствовать приспособлению сердца к изменению уровня медиаторов, стимулирующих рецепторы на разных этапах формирования адренергической иннервации сердца, более точным способом обеспечивая гомеостаз кардиомиоцитов.

ВЫВОДЫ

1. Положительный хронотропный ответ на стимуляцию АР норадреналином и изопротеренолом зависит от степени формирования адренергической иннервации сердца крыс. Фэнилэфрин приводит к урежению сердечной деятельности на всех этапах формирования адренергической иннервации.
2. Стимуляция разных типов адренорецепторов оказывает разнонаправленный эффект на сократимость миокарда.

3. Динамика хронотропии сердца крыс при блокаде разных адренорецепторов зависит от степени сформированности адренергической иннервации.
4. Направленность хронотропной реакции при селективной блокаде подтипов α_1-АР зависит от формирования адренергической иннервации сердца.
5. If участвуют в регуляции инотропии сердца крыс. Направленность инотропного эффекта на блокаду If связана с формированием адренергической иннервации.
6. Блокада If вызывает достоверное увеличение длительности фазы реполяризации и не оказывает влияния на потенциал покоя и скорость переднего фронта потенциала действия рабочих кардиомиоцитов крыс.
7. ZD7288 селективно ингибирует ток If, не оказывая воздействия на калиевые токи, определяющие скорость реполяризации.
8. HCN каналы является важнейшим эффектором адренергической регуляции сердца крыс с момента рождения.
9. I_{CaL} не участвуют в адренергической регуляции хронотропии сердца новорожденных крысят.
10. На всех этапах формирования адренергической иннервации сердца отрицательный инотропный эффект карбахолина проявляется только в высокой концентрации.
11. Направленность хронотропной реакции при селективной блокаде M_1-, M_2- и M_3-ХР зависит от зрелости адренергической иннервации сердца крыс.
12. Селективная блокада М-ХР не препятствует развитию брадикардии при электрической стимуляции вагуса на всех этапах формирования адренергической иннервации сердца крыс.
13. Динамика сократимости миокарда при неселективной блокаде М-ХР и селективной блокаде M_1- и M_2-ХР имеет возрастную зависимость. Блокада M_3-ХР не оказывает влияния на сократимость миокарда крыс всех возрастных групп.
14. Отрицательный инотропный эффект карбахолина не снимается селективной и неселективной блокадой М-ХР.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации:

1. **Зиятдинова Н.И.** Парасимпатическая нервная система модулирует эффект блокады каналов, активируемых гиперполяризацией / **Н.И.Зиятдинова**, Т.Л.Зефиров // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – №1. – С. 11-13. ***
2. **Зефиров Т.Л.** Блокады каналов, активируемых гиперполяризацией, изменяет эффект стимуляции β-адренорецепторов /Т.Л.Зефиров, **Н.И.Зиятдинова**, А.А.Гайнуллин, А.Л.Зефиров// **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – №5. – С. 492-495. ***
3. **Зиятдинова Н.И**. Возрастные особенности влияния блокады α-адренорецепторов на сердечную деятельность крыс / **Н.И.Зиятдинова**, А.Л.Зефиров, Т.Л.Зефиров// **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2002. - № 6, - С. 616-618. ***

4. **Зиятдинова Н.И** Адренергическая модуляция влияния блокад токов активируемых при гиперполяризации на сердечную деятельность новорожденнх крыс / **Н.И. Зиятдинова**, Т.Л. Зефиров // Сборник тезисов Российского национального конгресса кардиологов. – Санкт-Петербург. – 2002. – С. 149.

5. **Зиятдинова Н.И.** Вегетативный контроль сердечной деятельности включает модуляцию каналов, активируемых при гиперполяризации in vivo / **Н.И. Зиятдинова**, А.Л. Зефиров, Ф.Г. Ситдиков, Т.Л. Зефиров// **Российский физиологический журнал им. Сеченова. –Т. 89. – №2. – 2003. – С. 154-160 ***

6. **Зиятдинова Н.И.** Каналы активируемые при гиперполяризации модулируются отделами вегетативной нервной системы / **Н.И. Зиятдинова**, Т.Л. Зефиров // Архив клинической и экспериментальной медицины. – Т. 12. – №1. – 2003. – С. 37

7. **Зиятдинова Н.И.** Активация парасимпатикуса модулирует влияние аденозина на сердце крыс / **Н.И. Зиятдинова**, А.А. Гайнуллин, Т.Л. Зефиров // Сборник тезисов III Всероссийской конференции «Механизмы функционирования висцеральных систем». – Санкт-Петербург. – 2003. – С. 120

8. Zefrov T.L. Effects of blockade of hyperpolarization-activated ion currents (Ih) on autonomic control of the heart in rats: age-related peculiarities / T.L. Zefrov, **N.I. Ziatdinova**, A.L. Zefirov// **Neurophysiology. – 2003. – 35 (b) . – №6. – P. 415-421 ***

9. **Ziatdinova N.I.** Role of hyperpolarization activated currents (Ih) in the developmenatl changes of the heart reaction in vivo (Возрастные особенности реакция сердца на блокаду I (h) / **N.I. Ziatdinova**, T.L. Zefrov // «Signal transduction in cardio-vascular system», workshop in cardiovascular physiology. – Warsaw. – 2004. – P. 100.

10. **Зиятдинова Н.И.** Стимуляция блуждающего нерва изменяет отрицательное хронотропное и гипотензивное действие аденозина / **Н.И.Зиятдинова**, А.А.Гайнуллин, А.У.Зиганшин, Т.Л.Зефиров // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2004. – №5, – С. 486-488. ***

11. Зефиров Т.Л. Влияние стимуляции блуждающих нервов на сердце и артериальное давление (АД) крыс при блокаде различных подтипов М-холинорецепторов (М-ХР) / Т.Л. Зефиров, Л.Р. Сайфутдинова, **Н.И. Зиятдинова** // Симпозиум по сравнительной электрокардологии. – Сыктывкар. – 2004. – С. 25-26.

12. Зефиров Т.Л. Возрастные особенности реакции сердца крыс на последовательную ваготомию при блокаде токов, активируемых при гиперполяризации(Ih) / Т.Л. Зефиров, **Н.И.Зиятдинова** // **Морфологические ведомости. – 2004. – №1-2. – С. 41.***

13. **Зиятдинова Н.И.** Механизмы модуляции холинергической регуляции сердца крыс / **Н.И. Зиятдинова**, Е.А. Мизяйкина, Т.Л. Зефиров// **Российский физиологический журнал им. Сеченова. – 2004. – Т. 90 – №8. – С. 431-432.***

14. Сайфутдинова Л.Р. М3-холинорецепторы (М3-ХР) участвуют в регуляции сердечной деятельности крыс / Сайфутдинова Л.Р., **Зиятдинова Н.И.,** Зефиров Т.Л. // **Российский физиологический журнал им. Сеченова. – 2004. – Т. 90 – №8. – С. 430-431.***

15. **Зиятдинова Н.И.** Подтипы М-холинорецептров в регуляции работы сердца новорожденных крыс / **Н.И. Зиятдинова**, Т.Л. Зефиров, Л.Р. Сайфутдинова // Нейронауки: теоретические и клинические аспекты. – Т. 1. – №1. – 2005. – С. 43.
16. Зефиров Т.Л. Эволюция третьего подтипа М-холинорецептров в регуляции работы сердца крыс в онтогенезе / Т.Л. Зефиров, Л.Р. Сайфутдинова, А.А. Гайнуллин, **Н.И. Зиятдинова** // Нейронауки: теоретические и клинические аспекты. – 2005. – Т.1. – №1.– С. 42.
17. Зефиров Т.Л. Влияние внутривенного введения 4-DAMP на сердечную деятельность крыс разного возраста / Т.Л. Зефиров, Л.Р. Сайфутдинова, А.А. Гайнуллин, **Н.И. Зиятдинова** // **Бюллетень Сибирской медицины. – 2005. – Приложение 1. - С. 6, 113***
18. Зефиров Т.Л. Становление парасимпатической регуляции сердца крыс / Т.Л. Зефиров, Л.Р. Сайфутдинова, **Н.И. Зиятдинова** // Научные труды I Съезда физиологов СНГ. – 2005. – С.76-77.
19. **Зиятдинова Н.И.** Особенности вегетативной регуляции сердца новорожденных крысят / **Н.И. Зиятдинова**, Л.Р. Сайфутдинова, Т.Л. Зефиров // Научные труды I Съезда физиологов СНГ. – 2005. – С.191.
20. Гайнуллин А.А. Влияние введения аденозина на сердечно-сосудистую систему крыс разного возраста / А.А. Гайнуллин, **Н.И. Зиятдинова**, Т.Л. Зефиров // Научные труды I Съезда физиологов СНГ. – 2005. – С.84-85.
21. Зефиров Т.Л. Влияние селективной блокады разных подтипов М-холинорецепторов на сердечную деятельность и артериальное давление крыс / Т.Л.Зефиров, **Н.И.Зиятдинова**, Л.Р.Сайфутдинова, А.Л.Зефиров // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – № 6. – С. 615-618.***
22. Зефиров Т.Л. Блокада токов активируемых при гиперполяризации (If) уменьшает сократительную активность миокарда предсердий и желудочков крыс 3-х недельного возраста (in vitro) / Т.Л. Зефиров, **Н.И. Зиятдинова**, А.В. Гибина // «Растущий организм – адаптация к физической и умственной нагрузке», Материалы Всероссийской конференции. – Казань. – 2006. – С. 42-43.
23. Zefirov T.L. The role of different subtypes of M-cholinoreceptors in the regulation of rats cardiovascular system in postnatal ontogenesis. / T.L. Zefirov, A.A. Gainullin, **N.I. Ziatdinova** // VIII конференция Международного общества нейробиологии беспозвоночных. – Казань. – 2006. – С. 37.
24. **Ziatdinova N.I.** Autonomic modulation of the heart activity by hyperpolarization activated currents is age-dependent / **N.I. Ziatdinova**, A.E. Gibina, T.L. Zefirov // VIII конференция Международного общества нейробиологии беспозвоночных. – Казань. – 2006. – С. 39.
25. Зефиров Т.Л. Возрастные особенности механизмов регуляции сердечной деятельности / Зефиров Т.Л., **Зиятдинова Н.И**.// Электрокардиология: история, достижения и перспективы развития, материалы Всероссийской научно-практической конференции. – Казань. – 2006. – С. 46-49.
26. **Зиятдинова Н.И.** Формирование “Акцентированного антагонизма” симпато-парасимпатических регуляторных взаимодействий в сердце крыс / **Н.И. Зиятдинова**, А.Е. Гибина, М.А.Х. Салман, Т.Л. Зефиров // Нейронауки: теоретические и клинические аспекты. – 2007. – № 1. – С.14

27. Гибина А.Е. Регуляция сердечной деятельности крыс в раннем постнатальном онтогенезе. /А.Е. Гибина, М.А.Х. Салман, Т.Л. Зефиров, **Н.И. Зиятдинова** // Нейронауки: теоретические и клинические аспекты. – 2007. – № 1. – С.14

28. Зефиров Т.Л. Возрастные особенности инотропии миокрада предсердий и желудочков на блокаду токов, активируемых гиперполяризацией I(h). / Т.Л. Зефиров А.В.Гибина, **Н.И. Зиятдинова** // Тезисы XX съезда физиологов России. – Москва. – 2007. – С. 238.

29. **Зиятдинова Н.И.** Особенности "Акцентированного антагонизма" вегетативной регуляции сердечной деятельности новорожденных и взрослых крыс / **Н.И. Зиятдинова**, А.А.Гайнуллин Т.Л. Зефиров // Тезисы XX съезда физиологов России. – Москва. – 2007. – С. 241.

30. Зефиров Т.Л. М3-холинорецепторы участвуют в постнатальном развитии холинергической регуляции работы сердца крыс / Т.Л.Зефиров, А.Е. Гибина, М.А.Х. Салман, **Н.И. Зиятдинова**, А.Л.Зефиров // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – №8. – С. 135.***

31. Зефиров Т.Л. Возрастные особенности сократительной активности миокарда крыс при блокаде токов, активируемых гиперполяризацией / Т.Л. Зефиров, А.Е. Гибина, А.М. Сергеева, **Н.И. Зиятдинова**, А.Л.Зефиров // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – №9. – С. 244. ***

32. **Зиятдинова Н.И.** Формирование механизмов регуляции сердечной деятельности новорожденных крысят / **Н.И. Зиятдинова**, А.Е. Гибина, М.А.Х. Салман, Т.Л. Зефиров // V Всероссийская конференция с международным участием "Механизмы функционирования висцеральных систем". – Санкт-Петербург. – 2007. – С. 134.

33. Салман М.А.Х Возрастные особенности симпатопарасимпатических взаимодействий в сердце крыс / М.А.Х. Салман, **Н.И. Зиятдинова**, А.М. Сергеева, А.А. Гайнуллин, Т.Л. Зефиров // Четвёртая всероссийская школа-конференция по физиологии кровообращения. – Москва. – 2008. – С. 86.

34. Зефиров Т.Л. Разнонаправленный эффект блокады токов активируемых гиперполяризацией на хронотропию и инотропию миокарда крыс / Т.Л. Зефиров, А.М. Сергеева, **Н.И. Зиятдинова**, А.Л. Зефиров // Четвёртая всероссийская школа-конференция по физиологии кровообращения. – Москва. – 2008. – С. 33.

35. **Зиятдинова Н.И.** Вегетативная регуляция сердца новорожденных крыс / **Н.И. Зиятдинова**, А.М. Сергеева, М.А.Х. Салман, Т.Л. Зефиров // Нейронауки: теоретические и клинические аспекты. – 2008. – № 1. – С.26-27.

36. Зефиров Т.Л. Влияние блокады (If) хронотропную и инотропную функции сердца / Т.Л. Зефиров, А.М. Сергеева, Салман М.А.Х., **Н.И. Зиятдинова** // Нейронауки: теоретические и клинические аспекты. – 2008. – № 1. – С.25.

37. **Зиятдинова Н.И.** Роль α- и β-адренорецепторов в регуляции сердечной деятельности новорожденных крысят / **Н.И. Зиятдинова**, М.А. Салман, А.М. Сергеева, Т.Л. Зефиров // VI Сибирский физиологический съезд. – Барнаул. – 2008. – С. 14.

38. Сергеева А.М. Особенности сократимости миокарда новорожденных крысят при блокаде If препаратом ZD 7288 / А.М. Сергеева, **Н.И Зиятдинова**, Т.Л. Зефиров // VI Сибирский физиологический съезд. – Барнаул. – 2008. – С. 43.
39. Зефиров Т.Л Уровни и факторы модулирующие регуляцию сердечной деятельности крыс / Т.Л. Зефиров, А.М. Сергеева, М.А.Х. Салман, Ф.Ф. Габитов, **Н.И. Зиятдинова** // IX Всероссийская конференция «Физиологические механизмы адаптации растущего организма». – Казань – 2008. – С. 53-54.
40. **Зиятдинова Н.И.** Особенности влияния блокады If токов на сердечную деятельность в постнатальном онтогенезе / **Зиятдинова Н.И.**, Сергеева А.М., Салман М.А., Зефиров Т.Л. // Международная конференция, посвященная 65-юбилею института возрастной физиологии. – Москва. – 2009. – С 61-62.
41. Зефиров Т.Л. Особенности влияния селективной и неселективной блокады М-холинорецепторов на сердечную деятельность крыс раннего постнатального онтогенеза / Т.Л. Зефиров, А.М. Сергеева, М.А. Салман, **Н.И. Зиятдинова** //VII Всероссийская конференция с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем», посвященная 160-летию со дня рождения И.П. Павлова. - Санкт-Петербург. – 2009. – С. 170.
42. **Зиятдинова Н.И.** Блокада α_{1D}-АР вызывает урежение сердечной деятельности крыс разного возраста / **Н.И. Зиятдинова**, О.А. Колмакова, М.А.Х. Салман, Т.Л. Зефиров // Материалы X юбилейной Всероссийской научной конференции с международным участием «Физиологические механизмы адаптации растущего организма». - Казань. – 2010. – С. 80.
43. **Зиятдинова Н.И.** Роль различных М-холинорецепторов в регуляции на сердечной деятельности крыс на разных этапах постнатального онтогенеза / **Н.И. Зиятдинова**, А.А. Гайнуллин, А.М. Сергеева, Т.Л Зефиров // Тезисы докладов XXI Съезда Физиологического общества им. И.П. Павлова. - Калуга. – 2010. – С. 232.
44. Зефиров Т.Л. Возрастные особенности влияния блокады подтипов α-адренорецепторов на сердечную деятельность крыс / Т.Л. Зефиров, М.А.Х. Салман, Л.М. Саляхиева, **Н.И. Зиятдинова**// Тезисы докладов XXI Съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. - Калуга. – 2010. – С. 231
45. Сергеева А.М. Дозозависимое действие карбахолина на силу сокращения миокарда крыс в постнатальном онтогенезе. /А.М. Сергеева, **Н.И. Зиятдинова**, Л.И. Хисамиева, Т.Л. Зефиров // **Вестник ТГГПУ. – №1(23). – 2011. – С. 78-82.***
46. **Зиятдинова Н.И.** Дозозависимое действие неселективной блокады мускариновых холинорецепторов на силу сокращения миокарда крыс в постнатальном онтогенезе / **Н.И. Зиятдинова**, А.М. Сергеева, Р.Е. Дементьева, Т.Л. Зефиров // **Вестник ТГГПУ, – №3(25). – 2011. – С. 69-73.***
47. Зефиров Т.Л. Сравнительный анализ влияния блокады a1- и a2-адренорецепторов на сердечную деятельность крыс в постнатальном онтогенезе / Т.Л. Зефиров, **Н.И. Зиятдинова**, Л.И. Хисамиева, А.Л. Зефиров // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 151. – № 6. – С. 607-610.***

48. **Зиятдинова Н.И.** Селективная блокада a_{1A}-адренорецепторов вызывает противоположные изменения хронотропии сердца крыс разного возраста / **Н.И. Зиятдинова**, А.Л. Зефиров, Т.Л. Зефиров// **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины . – 2011. – Т. 152. – № 7. – С. 22-25.***

49. **Зиятдинова Н.И.** Влияние блокады If на функции миокарда развивающихся крыс / **Н.И. Зиятдинова**, А.М. Сергеева, Т.Л. Зефиров // Научные труды III съезда физиологов СНГ. – Ялта. – Украина. – 2011. – С. 137.

50. Зефиров Т.Л. Роль различных типов и подтипов α-адренорецепторов в регуляции хроноторопии сердца на этапах постнатального онтогенеза. /Т.Л. Зефиров, Л.И. Хисамиева, **Н.И. Зиятдинова** // Научные труды III съезда физиологов СНГ. – Ялта. – 2011. – С. 136.

51. Хисамиева Л.И. Влияние введения фенилэфрина на фоне ZD 7288 на хронотропию сердца крыс в постнатальном онтогенезе / Л.И. Хисамиева, Р.Е. Дементьева, В.В. Белоусова, **Н.И. Зиятдинова**, Т.Л. Зефиров // Механизмы адаптации растущего организма к физической и умственной нагрузке: материалы XI Всероссийской с международным участием научной школы-конференции. – Казань. – 2012. – С. 162-163.

52. Дементьева Р.Е. Механизмы урежения сердечной деятельности новорожденных крыс / Р.Е. Дементьева, Л.И. Хисамиева, Л.И. Фасхутдинов, **Н.И. Зиятдинова**, Т.Л. Зефиров // Физиология кровообращения: V Всероссийская с международным участием школа-конференция. – Москва. – 2012. – С. 51-52.

53. Сергеева А.М. Дозозависимый эффект карбахолина и атропина на инотропию миокарда крыс / А.М. Сергеева, **Н.И. Зиятдинова**, Р.Е. Дементьева, Л.И. Хисамиева, Т.Л. Зефиров // Физиология кровообращения: V Всероссийская с международным участием школа-конференция. – Москва. – 2012. – С.146-147.

54. Хисамиева Л.И. Возрастные особенности реакции сердца крыс на блокаду α_{1B}-адренорецепторов / Л.И. Хисамиева, Р.Е. Дементьева, **Н.И. Зиятдинова**, Т.Л. Зефиров // Физиология кровообращения: V Всероссийская с международным участием школа-конференция. – Москва. – 2012. – С. 175-176.

55. **Зиятдинова Н.И**. Особенности влияния блокады M_1-, M_2- и M_3-холинорецепторов на хронотропную функцию сердца крыс в неонатальном периоде / **Н.И. Зиятдинова**, А.М. Сергеева, Р.Е. Дементьева, Т.Л. Зефиров// **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 154. – № 7. – С. – 4-6.***

56. **Зиятдинова Н.И.** Блокада разных подтипов a_1-адренорецепторов оказывает противоположный эффект на хронотропию сердца новорожденных крысят / **Н.И. Зиятдинова**, Р.Е. Дементьева, Л.И. Фасхутдинов, Т.Л. Зефиров // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 154. – № 8. – С. 144-146.***

57. **Зиятдинова Н.И.** Возрастные особенности реакции серпдца крыс на селективную блокаду α_{1B}-адренорецепторов / **Н.И. Зиятдинова**, Л.И.Хисамиева, Т.Л. Зефиров // Университетская клиника. – 2012. – Т. 8. – № 2. – С. 150-153.

58. **Зиятдинова Н.И.** Влияние блокады α_{1D}-адренорецепторов на хронотропию сердца крыс разного возраста / **Н.И. Зиятдинова**, Л.И. Фасхутдинов, Т.Л.

Зефиров // Нейронауки: теоретические и клинические аспекты. – 2012. – Т. 8. – № 2. – С. 32-35.
59. Zefirov T.L. Age-related peculiarities of inotropic response of rat myocardium to selective block of M1-cholinoreceptors / T.L. Zefirov, **N.I. Ziyatdinova**, A.L. Zefirov// **Bulletin of Experimental Biology and Medicine.– 2013. – V. 155. – № 6. - P. 708-710.***
60. **Ziyatdinova N.I.** Age-related peculiarities of adrenergic regulation of cardiac chronotropic action after If blockage / **N.I. Ziyatdinova**, R.E. Dement'eva, L.I. Khisamieva, T.L. Zefirov // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2013. – V. 156. – № 1. – P. 1-3.***
61. **Зиятдинова Н.И.** Роль различных α-адренорецепторов в регуляции развивающегося сердца / **Н.И. Зиятдинова**, Л.И. Хисамиева, Р.Е. Дементьева, Т.Л. Зефиров // XXII съезд физиологического общества имени И.П. Павлова. – Волгоград. – 2013. – С. 185.
62. Zefirov T.L. Effect of α2-adrenoceptor stimulation on cardiac activity in rats /T.L. Zefirov, **N.I. Ziyatdinova**, L.I. Khisamieva A.L. Zefirov // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine – V. 157. – № 2. – 2014. – P. 154-157.***
63. Абрамочкин Д.В. Изменения электрической активности рабочего миокарда, вызванные подавлением тока If / Д.В. Абрамочкин, Л.И. Фасхутдинов, N. Baxter, Т.С. Филатова, **Н.И. Зиятдинова** // Материалы XII международной научной школы-конференции. – Казань. - 2014. – С. 12-13
64. Фасхутдинов Л.И. Роль IF токов в регуляции сердечной деятельности /Л.И. Фасхутдинов, **Н.И. Зиятдинова**, Т.Л. Зефиров // Материалы XII международной научной школы-конференции. – Казань. – 2014. – С. 109-110
65. Хабибрахманов И.И. Возрастная динамика холинергической регуляции функций сердца / И.И. Хабибрахманов, **Н.И. Зиятдинова**, Т.Л. Зефиров // Материалы XII международной научной школы-конференции. – Казань. – 2014. – С. 112
66. **Зиятдинова Н.И.** Роль If в регуляции функций сердца / **Н.И. Зиятдинова**, И.И. Хабибрахманов, Р.Е.Дементьева, Т.Л. Зефиров // IV съезд физиологов СНГ. - Дагомыс. – 2014. – С. 102
67. Зефиров Т.Л. Различные подтипы М-холинорецепторов в регуляции работы развивающегося сердца / Т.Л. Зефиров, Л.И. Хисамиева, Л.И. Фасхутдинов, **Зиятдинова Н.И**. // IV съезд физиологов СНГ. – Дагомыс. – 2014. – С. 101-102.
68. Зефиров Т.Л. Влияние селективной блокады подтипов a_2–адренорецепторов на сердечно–сосудистую систему крыс / Т.Л.Зефиров, Л.И.Хисамиева, **Н.И.Зиятдинова**, А.Л.Зефиров// **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 158. – № 10. – С. 406-408.***
69. Абрамочкин Д.В. Изменения электрической активности рабочего миокарда при подавлении тока If / Д.В. Абрамочкин, Л.И. Фасхутдинов, Т.С. Филатова, **Н.И. Зиятдинова** // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2014. – Т. 158. – № 11. – С. 545-548.***

*** - публикакции в ведущих рецензируемых научных журналах, согласно перечню Высшей аттестационной комиссии Минобрнауки РФ.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АР	адренорецепторы
М-ХР	мускариновые холинорецепторы
ВНС	вегетативная нервная система
РКА	протеинкиназа А
АС	аденилатциклаза
НА	норадреналин
ПД	потенциал действия
с	секунда
цАМФ	циклический аденозинмонофосфат
ЧСС	частота сердечных сокращений
g	грамм
GPCR	G-белок связанные рецепторы
$I_{Ca,L}$	токи Ca^{2+}-каналов L-типа
If	токи, активируемые гиперполяризацией
I_K	калиевый ток
I_{Na}	натриевый ток
LTCCs	L-тип Ca^{2+}-каналов
HCN	нуклеотид зависимые каналы, активируемые гиперполяризацией
n	количество животных
PLC	фосфолипаза С
Хср	средний кардиоинтервал
Мо	мода
Амо	амплитуды моды
ΔХ	вариационный размах
δ	среднее квадратическое отклонение
ИН	индекс напряжения
ИВР	индекс вегетативного равновесия
ВПР	вегетативный показатель ритма
ПАПР	показатель адекватности процессов регуляции
F	сила сокращения
САД	систолическое артериальное давление
ДАД	диастолическое артериальное давление