

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 591.112.1

Влияние пробенецида на проаритмические эффекты активации альфа-1-адренорецепторов в атриовентрикулярном узле сердца крысы

Я.А. Воронина^{1, *} , В.С. Кузьмин^{1, 2}

¹Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²Научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, Россия, 121552, г. Москва, ул. Академика Чазова, д. 15а

*e-mail: voronina.yana.2014@post.bio.msu.ru

В ткани сердца присутствуют адренорецепторы (АР) не только бета-типа, но и альфа-типа (α -АР). Оба типа АР принимают участие в регуляции электрической активности кардиомиоцитов различных отделов сердца, включая кардиомиоциты атриовентрикулярного узла (АВУ). Смещение баланса передачи адренергических сигналов в сторону α_1 -АР способствует появлению нарушений проведения возбуждения в различных отделах сердца и возникновению аритмий. Поскольку активация α_1 -АР усиливает анионную проводимость, цель настоящей работы заключалась в изучении влияния блокады хлорных каналов на α -адренергические нарушения АВУ-проведения возбуждения. Для этого оценивали время проведения в АВУ, рефрактерность АВУ и характер нарушений проведения в АВУ с помощью методики изолированного по Лангендорфу сердца крысы (самцы Wistar, 250 ± 30 г) с регистрацией предсердной и желудочковой электрограмм. В качестве агониста α_1 -АР использовали фенилэфрин (ФЭ, $10 \mu\text{M}$), в качестве блокатора анионной (хлорной) проводимости использовали пробенецид ($100 \mu\text{M}$). Установили, что активация α_1 -АР их агонистом ФЭ приводит к статистически значимому увеличению длительности атриовентрикулярной задержки ($N = 10$, $p < 0,001$) и эффективного рефрактерного периода (ЭРП) на $9,8\% \pm 1,2\%$, ($N = 10$, $p < 0,001$) в АВУ. При частоте стимуляции, близкой к ЭРП, ФЭ индуцирует блоки проведения в АВУ и осцилляции длительности задержки в АВУ ($N = 10$). При нестационарном характере проведения возбуждения в АВУ на фоне ФЭ пробенецид статистически значимо уменьшает величину осцилляций длительности задержки в АВУ. Кроме того, ЭРП при действии ФЭ на фоне пробенецида оказывается более коротким (107 ± 4 мс – ФЭ на фоне пробенецида, $114,2 \pm 5,35$ мс – ФЭ), то есть возвращается к значениям, характерным для нормальных условий. В итоге пробенецид способствует поддержанию проведения в АВУ на фоне активации α_1 -АР. Подавление пробенецидом проаритмических эффектов активации α_1 -АР в АВУ указывает на вовлеченность хлорных ионных каналов и анионных переносчиков в формирование аритмий в АВУ.

Ключевые слова: α_1 -адренорецепторы, атриовентрикулярный узел, атриовентрикулярные блоки, пробенецид, хлорные каналы, аритмия

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-4-7

Введение

Нарушения функционирования атриовентрикулярного узла (АВУ) сердца, представляющие собой избыточную задержку, блокаду или изменение естественной последовательности передачи волны возбуждения от предсердия к желудочковой проводящей системе, широко распространены, отягчают и осложняют течение других сердечно-сосудистых патологий, в том числе таких, для

которых характерны гипертрофические изменения миокарда [1]. Нарушения проведения возбуждения в АВУ служат причиной формирования аритмий различного типа. Блокады в АВУ встречаются у 40% лиц пожилого возраста и приводят к ухудшению гемодинамики, кровоснабжения органов, включая само сердце. Пациенты с нарушениями АВУ подвержены значительному риску аритмий, включая фибрилляцию [2], а также

рisku внезапной сердечной смерти [3]. Фармакологическая терапия блокад проведения в АВУ или аритмий не является эффективной [4], поскольку АВУ является крайне сложно организованной структурой, а молекулярные и тканевые механизмы дисфункции миокарда АВУ установлены лишь частично.

Электрофизиологические свойства АВУ находятся под тесным контролем вегетативной нервной системы; ее дисфункция часто приводит к аритмиям и блокадам проведения в АВУ. Быстрая регуляция биоэлектрической активности миокардиальной ткани АВУ, как и других отделов сердца, симпатическим отделом вегетативной нервной системы в норме реализуется преимущественно посредством β_1 -адренорецепторов (β_1 -АР). Однако в миокарде помимо β_1 -АР присутствуют адренорецепторы α_1 -типа (α_1 -АР) [5]. Установлено, что стимуляция α -АР сердца вызывает разнообразные нарушения проведения в АВУ [6, 7], поэтому α_1 -АР кардиомиоцитов АВУ вовлечены в формирование нарушений ритма сердца. Стимуляция α -АР и их внутриклеточных сигнальных путей приводит не только к изменению биоэлектрической активности, но и к ремоделированию кардиомиоцитов [8]. Развитие сердечно-сосудистых патологий – например, гипертрофической перестройки миокарда – сопровождается изменением соотношения экспрессируемых подтипов адренорецепторов [9]. Аритмии и блокады в АВУ часто сопровождают гипертрофические изменения в сердце [1].

В гладкомышечных клетках активация α_1 -АР приводит к деполяризации и сократительным ответам за счет целого спектра внутриклеточных механизмов. К таким механизмам относятся стимуляция трансмембранного анионного транспорта, усиление хлорной проводимости и активация хлорных ионных каналов, в том числе – трансмембранного регулятора муковисцидоза (CFTR, Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) [10–13]. Механизмы реализации эффектов активации α_1 -АР в АВУ не исследованы, однако известно, что, как и в гладкомышечных клетках, в миокарде экспрессируется значительное количество хлорных каналов и анионных транспортеров [14–16]. Одним из механизмов нарушения проведения в АВУ при стимуляции α_1 -АР может являться усиление анионной проводимости за счет активации хлорных каналов кардиомиоцитов АВУ. В таком случае подавление хлорной/анионной проводимости может предотвращать дисфункции АВУ, вызванные стимуляцией α_1 -АР.

В данной работе исследуются эффекты стимуляции α_1 -АР АВУ, роль анионного/хлорного трансмембранного транспорта в регуляции электрофизиологических свойств АВУ при стимуляции α_1 -АР, а также возможность модуляции аритмогенного действия стимуляции α_1 -АР в АВУ.

Материалы и методы

Работа выполнена с использованием препаратов изолированного сердца крысы (самцы стока Wistar, 2–4 мес., 250 ± 30 г). В ходе экспериментов были соблюдены все актуальные требования этических норм работы с лабораторными животными в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (№ 123, Страсбург, 18 марта 1986 г.). Исследование одобрено этическим комитетом Научно-исследовательского института экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова Национального медицинского исследовательского центра кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России (№ ЛЭС/01.11.23). Перед экспериментами животных содержали в виварии течение 2 нед. в стандартных условиях при световом режиме 12:12 с доступом к воде и пище *ad libitum*.

В экспериментах использовали изолированное сердце крысы, ретроградно перфузируемое (по Лангендорфу) при постоянном перфузионном давлении (80 мм рт. ст.). После предварительной анестезии (3,5% изофлюрана в смеси с кислородом) и гепаринизации (1000 ед./кг, внутривенно) крыс декапитировали, вскрывали грудную клетку и извлекали сердце, которое помещали в ванночку с холодным перфузионным раствором (4°C) и отмывали от крови. Затем препарат сердца крысы через аорту фиксировали на канюле и осуществляли ретроградную перфузию при 37°C; для перфузии использовали раствор Кребса-Хензеля следующего состава (в мМ): NaCl – 118,5, KCl – 4,7, CaCl₂ – 2,5, NaHCO₃ – 25, KH₂PO₄ – 1,2, MgSO₄ – 1,2, глюкоза – 11. Перфузионный раствор непрерывно насыщали карбогеном (90% O₂, 5% CO₂) для оксигенации и стабилизации pH (7,4). Во всех экспериментах в препаратах изолированного сердца коронарный проток составлял не менее 10 мл/мин.

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

После 10 мин адаптации изолированного сердца определяли длительность интервалов между возбуждениями предсердий и величину атрио-

вентрикулярной задержки (AB3) при естественном «синусном» ритме. Затем биполярные стимулирующие электроды, подключенные к аналоговому изолятору и генератору импульсов (Нейробиолаб, DL360, Россия), размещали на границе правого предсердия и предсердной перегородки, предварительно разрушив синоатриальный узел путем удаления миокарда межвенной области правого предсердия. С постоянными межстимульными интервалами (S1S1) наносили возбуждающие стимулы (2 мс, 2–6 В), вызывающие возбуждение предсердий с частотой на 10% больше «синусного» ритма (180 ± 20 мс).

Оценивали следующие функциональные характеристики АВУ: длительность (1) и величину осцилляций (2) АВЗ при антероградном (предсердно-желудочковом) режиме проведения возбуждения, длительность эффективного рефрактерного периода (ЭРП) АВУ (3), значение «точки Венкебаха» (ТВ) (4), а также встречаемость блоков проведения в АВУ (5). Использовали следующий протокол: каждые 30 с уменьшали длительность S1S1 от «синусового» ритма на 10 мс вплоть до 110 мс, далее S1S1 уменьшали с шагом 5 мс, а начиная с величины S1S1 = 100 мс – с шагом 2 мс вплоть до ЭРП.

Длительность ЭРП определяли как наибольший S1S1, при котором возбуждение желудочков происходит в ответ лишь на каждый второй очередной возбуждающий стимул. Для каждого значения S1S1 величину АВЗ определяли как разницу между моментом возникновения предсердного и желудочкового кардиоцикла. Блок проведения в АВУ определяли по отсутствию возбуждения желудочков после очередного стимула. Встречаемость блоков проведения в АВУ рассчитывали для каждого препарата как отношение количества блоков проведения в АВУ к общему количеству кардиоциклов при длительности межстимульных интервалов, соответствующих ТВ. Значение ТВ определяли как S1S1, при котором возникает хотя бы единичный блок проведения в АВУ в течение 30 с. Величину осцилляций АВЗ (ΔAB , т.е. разброс между самыми короткими и самыми длинными АВЗ) рассчитывали по формуле, приведенной ниже:

$$\Delta AB = \frac{AB_{n-1} - AB_{n+1}}{S1S1_{TB}} \cdot 100,$$

где AB_{n-1} – длительность АВЗ (наибольшая) в цикле, предшествующем блоку проведения в АВУ, AB_{n+1} – длительность АВЗ (наименьшая) в цикле, последующем блоку проведения в АВУ, $S1S1_{TB}$ – величина межстимульных интервалов в ТВ (рис. 1А).

После определения функциональных характеристик АВУ в контрольных условиях ($N = 20$) устанавливали «исходную» частоту стимуляции на 20 мин, затем определяли функциональные харак-

теристики либо в присутствии 0,1–10 μ М агониста α_1 -АР фенилэфрина (ФЭ, группа 1, $N = 10$), либо в присутствии 100 μ М блокатора анионной проводимости сульфонилсодержащего производного бензойной кислоты пробенецида (ПРБ, группа 2, $N = 10$). Затем у части препаратов группы 1 проводили регистрацию функциональных характеристик АВУ при одновременном действии 10 μ М ФЭ и 100 μ М ПРБ ($N = 6$), а часть препаратов ($N = 4$) использовали в качестве временного контроля.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). После предварительной проверки нормальности распределения в группах с помощью теста Шапиро-Вилка статистически значимые различия между группами выявляли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением апостериорных тестов для множественных сравнений в группах с повторными или независимыми значениями, а также внесением поправки Даннета. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего за исключением репрезентативных записей.

Результаты и обсуждение

Длительность антероградной АВЗ зависит сложным образом от S1S1. В наших экспериментах при спонтанном «синусном» ритме (210 ± 15 мс), наблюдаемом в ИС, длительность АВЗ составляет 55 ± 8 мс; в условиях навязываемого ритма при S1S1 = 180 мс, что эквивалентно частоте сердечных сокращений (ЧСС) 330 уд./мин, т.е. ЧСС, наблюдаемой *in vivo* у крыс, лишенных модуляции со стороны вегетативной нервной системы, величина АВЗ составляет 47 ± 8 мс (рис. 1Б, В). При S1S1 = 120 и 110 мс, что соответствует максимальной наблюдаемой ЧСС у крыс (500–550 уд./мин), длительность АВЗ увеличивается до 60 ± 7 мс и 65 ± 8 мс соответственно.

Величина ЭРП в наших экспериментах в контрольных условиях составила 104 ± 11 мс. Важно отметить, что в контрольных условиях ЭРП и ТВ совпадают в большей части экспериментов, то есть для АВУ крыс не характерны осцилляции длительности АВЗ, предшествующие формированию блоков проведения: в контрольных условиях осцилляции длительности АВЗ наблюдаются у 10% препаратов.

Стимуляция α_1 -АР агонистом ФЭ в концентрации 0,1–1 μ М не приводит к заметным изменениям длительности АВЗ ($p > 0,1$) либо ЭРП ($p > 0,1$). Однако при действии ФЭ в концентрации 10 μ М наблюдается статистически значимое увеличение длительности АВЗ при всех значениях S1S1: при S1S1 = 180 мс увеличение АВЗ составляет $40 \pm 5\%$ (от 47,2 мс до 66,1 мс, $p < 0,001$); при S1S1 = 120 мс увеличение АВЗ, вызванное

ФЭ, оказывается более выраженным и составляет $57 \pm 10\%$ (от 51 мс до 79 мс, $p < 0,001$, рис. 1Б, В). Таким образом, влияние ФЭ на АВЗ пропорционально частоте активации АВУ в экспериментальных условиях и, вероятно, эффект активации α_1 -АР зависит от ЧСС животных *in vivo*. Иными словами, ФЭ демонстрирует т.н. «прямую ритмо-зависимость», характерную для некоторых соединений, влияющих на электрофизиологические свойства миокарда.

ФЭ ($10 \mu\text{M}$) вызывает увеличение ЭРП на $9,8\% \pm 1,2\%$ ($p < 0,001$). ФЭ также приводит к небольшому увеличению значения ТВ. Важно, что при действии ФЭ ($10 \mu\text{M}$), в отличие от контрольных экспериментов, во всех случаях наблюдали осцилляции длительности АВЗ при S1S1, близких к ЭРП. Величина осцилляций АВЗ при действии ФЭ составляла $27 \pm 6\%$ (рис. 3В). Встречаемость блоков проведения в АВУ при действии ФЭ составила $22,5 \pm 7\%$.

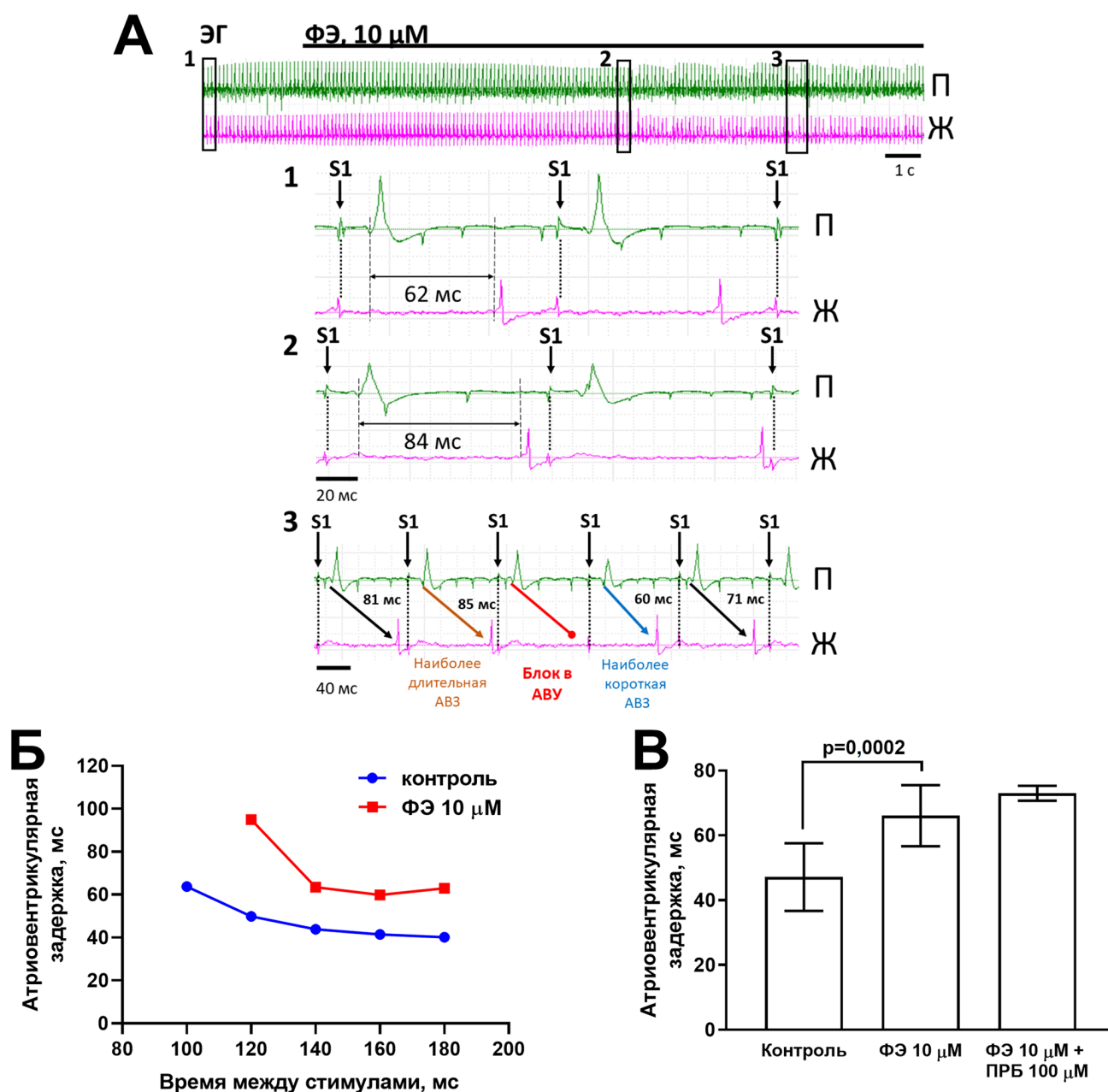


Рис. 1. Влияние стимуляции α_1 -АР на длительность атриовентрикулярной задержки (АВЗ) в контроле и на фоне ПРБ. **А.** Электрограммы (ЭГ), регистрируемые при действии агониста α_1 -АР (ФЭ, $10 \mu\text{M}$). S1 – моменты нанесения возбуждающих стимулов и артефакты электрической стимуляции. 1 – ЭГ предсердия (П) и желудочка (Ж) в контроле (при длительности интервала между возбуждающими стимулами 150 мс, длительность АВЗ составляет 62 мс); 2 – ЭГ через 20 с действия ФЭ (длительность АВЗ составляет 84 мс); 3 – блок в атриовентрикулярном узле (АВУ) и альтернации длительности. При длительности межстимульных интервалов, соответствующей точке Венкебаха, кардиоцикл, предшествующий блоку проведения в АВУ, имеет наибольшую величину АВЗ, а кардиоцикл, следующий после блока проведения в АВУ, имеет наименьшую величину АВЗ при данной частоте стимуляции. **Б.** Репрезентативный пример увеличения длительности АВЗ при действии ФЭ при разных S1S1. **В.** Влияние пробенецида (ПРБ, $100 \mu\text{M}$) на увеличение АВЗ, вызванное ФЭ при S1S1 = 180 мс.

Таким образом, активация α_1 -АР в АВУ крыс вызывает негативный дромоторпный эффект: увеличивает длительность АВЗ, его рефрактерность, способствует возникновению нестационарных режимов проведения и блоков проведения возбуждения — вероятно, за счет усиления функциональной гетерогенности ткани — а также снижает диапазон ЧСС, в котором АВУ способен передавать возбуждение к желудочковой проводящей системе. Эти эффекты могут рассматриваться как проаритмические, поскольку способствуют возникновению аритмий по типу re-entry в АВУ. Физиологическое значение «прямой ритмозависимости» влияния α_1 -АР на АВЗ может быть связано с необходимостью поддержания длительности диастолы и увеличением времени наполнения желудочков, которое оказывается сниженным при высокой ЧСС и активации симпатического отдела вегетативной нервной системы.

ПРБ (100 μ M) не оказывает влияния на АВЗ в контрольных условиях и не изменяет увеличение АВЗ, вызываемое ФЭ (рис. 1В). Однако ПРБ (100 μ M) подавляет увеличение ЭРП в АВУ, вызванное стимуляцией α_1 -АР (рис. 2А, Б). При действии ФЭ (10 μ M) на фоне ПРБ (100 μ M) длительность ЭРП составляет 107 ± 4 мс, что статистически значимо меньше ($p < 0,05$), чем при самостоятельном действии ФЭ и близко к длительности ЭРП в контрольных условиях. Возвращая длительность ЭРП к контрольным значениям, ПРБ способствует сохранению проведения возбуждения в АВУ, активации желудочков в физиологическом диапазоне, предотвращению блоков проведения в АВУ при высоких значениях ЧСС на фоне стимуляции α_1 -АР.

ПРБ (100 μ M) не вызывает изменения ТВ, а также не приводит к изменению ТВ на фоне действия ФЭ (рис. 3Г). ПРБ (100 μ M) не оказывает влияния на встречаемость блоков проведения в АВУ, вызванных ФЭ ($p > 0,1$). ПРБ (100 μ M) значительно уменьшает амплитуду осцилляций дли-

тельности АВЗ, вызванных ФЭ (от 26 ± 3 до $17 \pm 2\%$, $N = 3$, в тех экспериментах, где они сохраняются; рис. 3А–В).

В нашей работе впервые детально изучены эффекты стимуляции α_1 -АР в АВУ и показано, что эти эффекты являются аритмогенными. Следует отметить, что проаритмические эффекты стимуляции α_1 -АР характерны не только для АВУ. Активация α_1 -АР вызывает подавление проведения волны возбуждения и функциональную невозбудимость в миокарде предсердной перегородки [17], миокардиальных обкладках легочных [18] и полых вен, а также в других структурах сердца, способных, в тех или иных условиях, к автоматической активности. В работах, ранее проведенных в нашей лаборатории, показано, что активация α_1 -АР у крыс приводит к формированию блоков проведения возбуждения в миокарде торакальных вен и способствует формированию аритмий по типу re-entry [19]. Как указано выше, аритмогенные эффекты α_1 -АР могут усиливаться при ремоделировании миокарда. Смещение баланса передачи адренергических сигналов от преимущественно β -адренергических к α_1 -адренергическим путям, которое, например, может происходить при гипертрофических изменениях в сердце, вероятно, способствует появлению аритмий в АВУ. Несомненно, электрофизиологические механизмы наблюдаемых в АВУ феноменов при стимуляции α_1 -АР многообразны. Однако, как указано выше, один из механизмов может быть связан с изменением анионной/хлорной трансмембранной проводимости в АВУ.

Профиль экспрессии ионных каналов и переносчиков в АВУ отличается от такового в рабочем миокарде камер сердца, поскольку клеточные предшественники и эмбриональное происхождение этих структур различны [20]. Известно, что АВУ является крайне гетерогенной структурой [21]. Вероятно, соотношение хлорных транспортеров NKCC1 и KCC2, отвечающих за внутриклеточную концентрацию ионов хлора

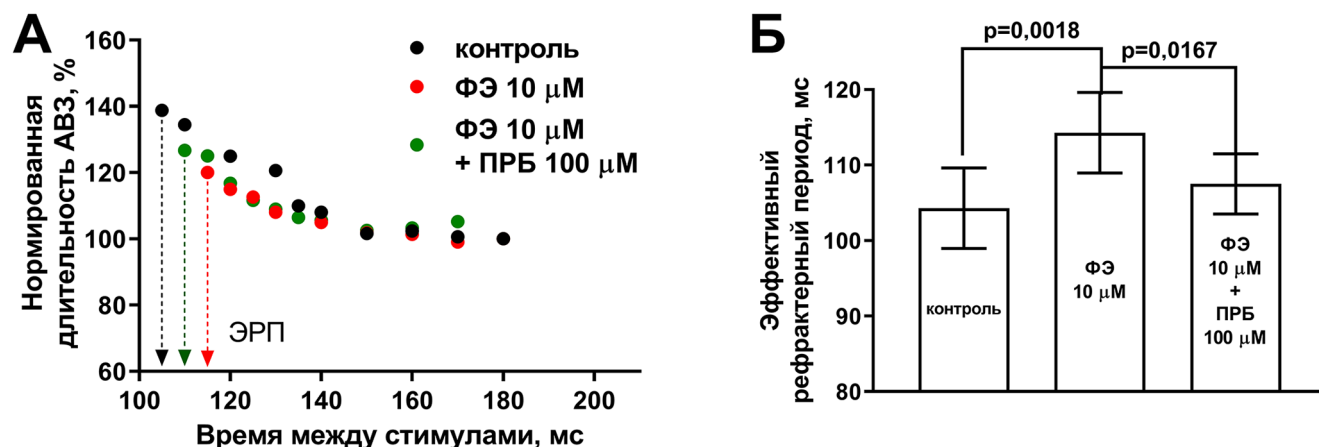


Рис. 2. Влияние пробенецида (ПРБ) на увеличение длительности эффективного рефрактерного периода (ЭРП) атриовентрикулярного узла (АВУ), вызванное стимуляцией α_1 -АР фенилэфрином (ФЭ, 10 μ M). А. Репрезентативный пример. Б. Величина ЭРП АВУ в контроле, при действии ФЭ и при действии ФЭ на фоне ПРБ.

и хлорный равновесный потенциал, различно в центральной и периферической частях АВУ и отличается от такового в рабочем миокарде. В центральной части АВУ, по аналогии с миокардом синоатриального узла, хлорный равновесный потенциал может быть положительнее, а на периферии отрицательнее потенциала покоя. Поэтому активация анионных/хлорных переносчиков может приводить в разных участках АВУ как к гиперполяризации, так и к деполяризации [16].

Вследствие гетерогенности небольшие или разнонаправленные изменения мембранного потенциала в отдельных участках АВУ могут приводить к нарушению проведения в АВУ [22]: невозбудимости в центральной части или невозможности передачи возбуждения на границе ткани АВУ и ткани желудочковой проводящей системы.

Показано, что α_1 -АР регулируют хлорную проводимость в гладкомышечных клетках за счет модуляции мембранных хлорных каналов CFTR. Установлено, что CFTR играют важную роль в регуляции сократимости гладкомышечных клеток и тонуса сосудов [12, 13]. В настоящее время показано, что CFTR экспрессируются и являются функционально активными в кардиомиоцитах [23], в том числе в кардиомиоцитах сердца крысы [24]. Физиологическая роль CFTR в миокарде установ-

лена не до конца, однако предполагается, что эти хлорные каналы определяют скорость сокращения кардиомиоцитов [25], примембранную концентрацию Ca^{2+} , участвуют в регуляции pH, объема кардиомиоцитов, секреции кардиомиоцитами АТФ [24, 26, 27].

CFTR известен как цАМФ-зависимый хлорный канал [28]. Однако CFTR проницаем также для бикарбонат-анионов [24]. Хорошо известна регуляция CFTR со стороны β_1 - и β_2 -АР, а также протеинкиназы А [29, 30]. Внутриклеточные сигнальные пути α_1 -АР также вовлечены в регуляцию CFTR: показано, что протеинкиназа С усиливает проводимость CFTR, модулируя нуклеотид-связывающий домен канала [31], а Ca^{2+} -зависимые тирозинкиназы, ингибируя протеинфосфатазу 2А, предотвращают снижение проводимости CFTR [24]. Поэтому CFTR является подходящей мишенью среди хлорных каналов, которая может опосредовать эффекты стимуляции α -АР в АВУ.

Для целого ряда липофильных производных бензойной кислоты показано блокирующее действие на анионную и хлорную проводимость в электровозбудимых тканях. В экспериментальных работах в качестве блокатора хлорных каналов широко используется 5-нитро-2-(3-фенилпропиламино)бензойная кислота (NPPB, 5-nitro-

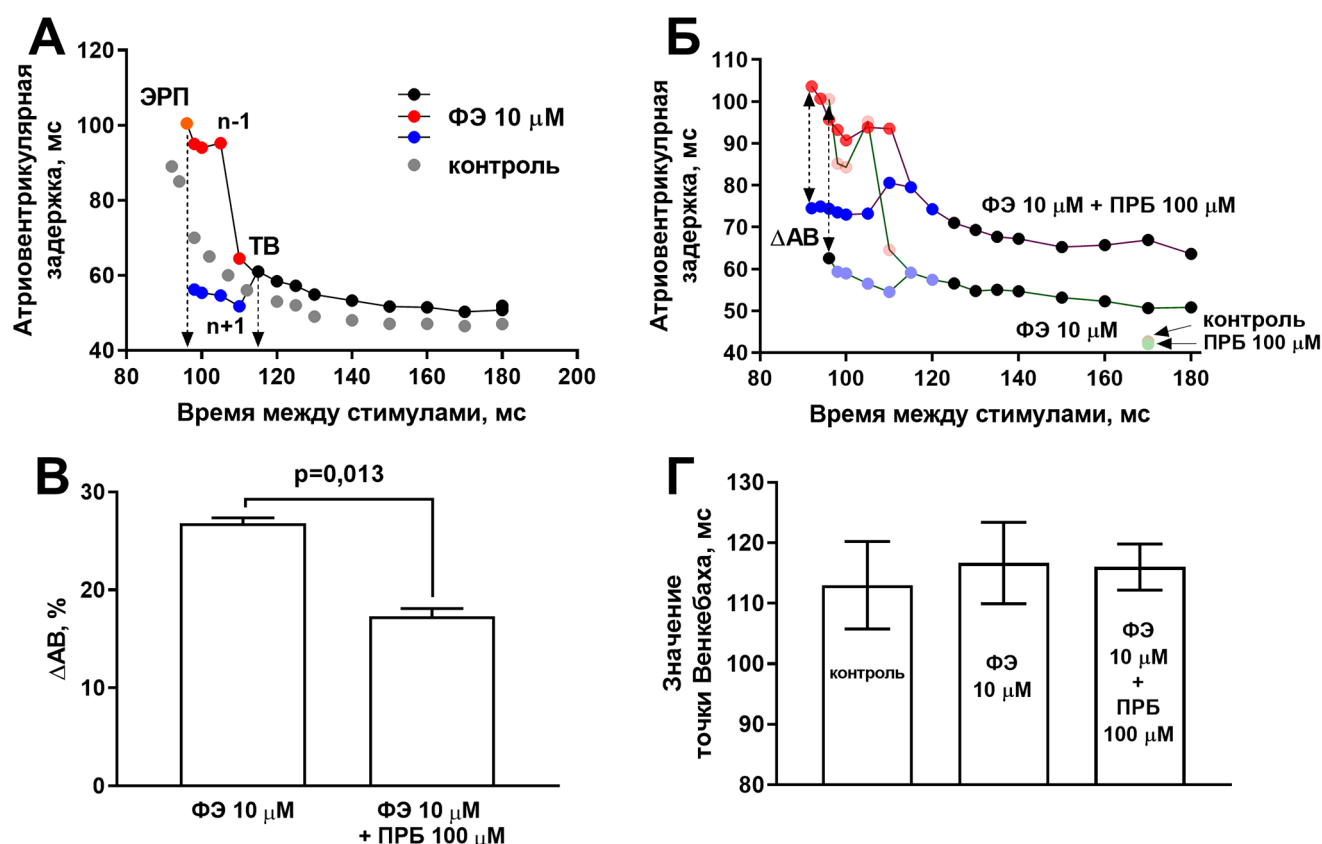


Рис. 3. Влияние пробенецида (ПРБ) на периоду Венкебаха и осцилляции длительности атриовентрикулярной задержки (ABZ), вызванные стимуляцией α_1 -АР фенилэфрином (ФЭ, 10 μM). **А.** Кривая рефрактерности атриовентрикулярного узла при действии ФЭ; ЭРП – эффективный рефрактерный период; ТВ – точка Венкебаха. **Б.** Кривая рефрактерности атриовентрикулярного узла при действии ФЭ и ФЭ на фоне ПРБ (100 μM). **В.** Влияние ПРБ на увеличение ΔAB (величина осцилляций ABZ), вызванное ФЭ. **Г.** Влияние ПРБ на увеличение значения TB, вызванное ФЭ.

2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid) [32]. Как указано выше, ПРБ также является производным бензойной кислоты, широко применяемым в фармакологии. Изначально предполагалось, что действие ПРБ связано с ингибированием трансмембранных переносчиков органических анионов, что определило его использование как агента, пролонгирующего и потенцирующего действие антибиотиков [33], а также подавляющего реабсорбцию мочевой кислоты [34]. В настоящее время установлено, что мишенями ПРБ, помимо трансмембранных переносчиков органических анионов, являются некоторые АТФ-связывающие транспортные («кассетные») белки, паннексины [35], $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменник (SLC26A4, пендрин) [36]; установлено также, что ПРБ активирует TRPV2 [37] и является блокатором хлорных каналов [38, 39]. В нескольких работах подтверждено, что ПРБ блокирует CFTR [40, 41].

Несомненным преимуществом ПРБ перед другими соединениями, подавляющими хлорную проводимость, является его доказанная более 70 лет назад эффективность и безопасность [42], что открывает возможность фармакологического использования соединения при установлении новых клинически значимых эффектов.

В наших экспериментах впервые показано, что ПРБ подавляет увеличение ЭРП в АВУ, а также уменьшает величину осцилляций АВЗ, вызванных стимуляцией α_1 -АР. Осцилляции длительности АВЗ обусловлены электрофизиологической гетерогенностью ткани АВУ и отражают, помимо прочего, переключение проводящих путей с разными свойствами в АВУ. Величина ΔAB характеризует вероятность того, что АВУ может стать источником аритмий. Уменьшая амплитуду осцилляций, ПРБ, вероятно, снижает функциональную гетерогенность ткани АВУ, увеличенную при стимуляции

α -АР, а также способствует поддержанию активности «быстрых» внутриузловых проводящих путей. Эти эффекты ПРБ можно рассматривать как антиаритмические.

Важно, что эффекты ПРБ отсутствуют в контрольных условиях и проявляются только при действии ФЭ. Можно предположить, что влияние ПРБ на функциональные показатели АВУ связано с подавлением анионной/хлорной проводимости, увеличение которой вызвано стимуляцией α_1 -АР. Учитывая известные мишени сигнальных путей α_1 -АР в кардиомиоцитах, а также мишени ПРБ, можно предположить, что одним из ключевых звеньев, определяющих наблюдаемые эффекты, является канал CFTR.

Вероятно, *in vivo* влияние ПРБ на электрофизиологические свойства АВУ проявляется либо в условиях чрезмерной активности симпатического отдела вегетативной нервной системы, либо в патологически ремоделированном миокарде, в котором уровень экспрессии α_1 -АР и роль внутриклеточных сигнальных путей этих рецепторов повышена. Такой механизм действия позволяет рассматривать ПРБ в качестве безопасного средства, потенциально предотвращающего возникновение аритмий АВУ.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект №22-15-00189). Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены этической комиссией Научно-исследовательского института экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова Национального медицинского исследовательского центра кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России (№ ЛЭС/01.11.23). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bignolais O., Quang K. Le, Naud P., El Harchi A., Briec F., Piron J., Bourge A., Leoni A.L., Charpentier F., Demolombe S. Early ion-channel remodeling and arrhythmias precede hypertrophy in a mouse model of complete atrioventricular block. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2011;51(5):713–721.
2. Zhao X., Sun C., Cao M., Li H. Atrioventricular block can be used as a risk predictor of clinical atrial fibrillation. *Clin. Cardiol.* 2019; 42(4): 452–458.
3. Lee S., Wellens H.J.J., Josephson M.E. Paroxysmal atrioventricular block. *Hear. Rhythm.* 2009;6(8):1229–1234.
4. Kashou A.H., Kashou H.E. *Rhythm, Atrioventricular Block*. StatPearls Publishing; 2018. 324 pp.
5. O'Connell T.D., Jensen B.C., Baker A.J., Simpson P.C. Cardiac α_1 -adrenergic receptors: Novel aspects of expression, signaling mechanisms, physiologic function, and clinical importance. *Pharmacol. Rev.* 2014;66(1):308–333.
6. Takata K., Adachi Y.U., Suzuki K., Obata Y., Sato S., Nishiwaki K. Dexmedetomidine-induced atrioven-

tricular block followed by cardiac arrest during atrial pacing: A case report and review of the literature. *J. Anesth.* 2014;28(1):116–120.

7. Spiers J.P., Harron D.W.G., Wilson R., Allen J.D. UK-52,046 (a novel α_1 -adrenoceptor antagonist) and the role of α -adrenoceptor stimulation and blockade on atrioventricular conduction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1990;16(5):824–830.

8. Cotecchia S., del Vescovo C.D., Colella M., Caso S., Diviani D. The α_1 -adrenergic receptors in cardiac hypertrophy: Signaling mechanisms and functional implications. *Cellular Signalling.* 2015;27(10):1984–1993.

9. Одношивкина Ю.Г., Петров А.М. Роль нейромодуляционного соединения в симпатической регуляции сердца. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2021;107(4–5):474–491.

10. Gould D.J., Hill C.E. α -Adrenoceptor activation of a chloride conductance in rat iris arterioles. *Am. J. Physiol. — Hear. Circ. Physiol.* 1996;271(40):2469–2476.

11. Lamb F.S., Kooy N.W., Lewis S.J. Role of Cl^- channels in α -adrenoceptor-mediated vasoconstriction in the anesthetized rat. *Eur. J. Pharmacol.* 2000;401(3):403–412.
12. Robert R., Thoreau V., Norez C., Cantereau A., Kitzis A., Mettey Y., Rogier C., Becq F. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel by β -adrenergic agonists and vasoactive intestinal peptide in rat smooth muscle cells and its role in vasorelaxation. *J. Biol. Chem.* 2004;279(20):21160–21168.
13. Robert R., Norez C., Becq F. Disruption of CFTR chloride channel alters mechanical properties and cAMP-dependent Cl^- transport of mouse aortic smooth muscle cells. *J. Physiol.* 2005;568(2):483–495.
14. Adkins G.B., Curtis M.J. Potential role of cardiac chloride channels and transporters as novel therapeutic targets. *Pharmacol. Ther.* 2015;145:67–75.
15. Duan D.D. Phenomics of cardiac chloride channels. *Compr. Physiol.* 2013; 3(2): 667–692.
16. Hume J.R., Duan D., Collier M.L., Yamazaki J., Horowitz B. Anion transport in heart. *Physiol. Rev.* 2000;80(1):31–81.
17. Pustovit K.B., Samoilova D.V., Abramochkin D.V., Filatova T.S., Kuzmin V.S. $\alpha 1$ -adrenergic receptors accompanied by GATA4 expression are related to proarrhythmic conduction and automaticity in rat interatrial septum. *J. Physiol. Biochem.* 2022;78(4):793–805.
18. Egorov Y.V., Kuzmin V.S., Glukhov A.V., Rosenshtaukh L.V. Electrophysiological characteristics, rhythm, disturbances and conduction discontinuities under autonomic stimulation in the rat pulmonary vein myocardium. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2015;26(10):1130–1139.
19. Ivanova A.D., Filatova T.S., Abramochkin D. V., Atkinson A., Dobrzynski H., Kokaeva Z.G., Merzlyak E.M., Pustovit K.B., Kuzmin V.S. Attenuation of inward rectifier potassium current contributes to the $\alpha 1$ -adrenergic receptor-induced proarrhythmicity in the caval vein myocardium. *Acta Physiol.* 2021;231(4): e13597.
20. Kuzmin V.S., Kamensky A.A. The molecular and cellular mechanisms of heart pacemaker development in vertebrates. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2021;76(4):147–164.
21. Saeed Y., Temple I.P., Borbas Z., Atkinson A., Yanni J., Maczewski M., Mackiewicz U., Aly M., Logantha S.J.R.J., Garratt C.J., Dobrzynski H. Structural and functional remodeling of the atrioventricular node with aging in rats: The role of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated and ryanodine 2 channels. *Hear. Rhythm.* 2018;15(5):752–760.
22. Markowitz S.M., Lerman B.B. A contemporary view of atrioventricular nodal physiology. *J. Interv. Card. Electrophysiol.* 2018;52(3):271–279.
23. Yajima T., Tsutsumi-sakai R., Hagiwara N. Vessels functional activity of the CFTR Cl^- channel in human myocardium. *Hear. Vessel.* 1997;12(6):255–261.
24. Wang Y., Zhao J., Cai Y., Ballard H.J. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent bicarbonate entry controls rat cardiomyocyte ATP release via pannexin1 through mitochondrial signalling and caspase activation. *Acta Physiol.* 2020;230(1):e13495.
25. Sellers Z.M., De Arcangelis V., Xiang Y., Best P.M. Cardiomyocytes with disrupted CFTR function require CaMKII and Ca^{2+} -activated Cl^- channel activity to maintain contraction rate. *J. Physiol.* 2010;588(13):2417–2429.
26. James A.F. Enigmatic variations: The many facets of CFTR function in the heart. *Acta Physiol.* 2020;230(1):e13525.
27. Uramoto H., Okada T., Okada Y. Protective role of cardiac CFTR activation upon early reperfusion against myocardial infarction. *Cell. Physiol. Biochem.* 2012;30(4):1023–1038.
28. Bahinski A., Nairn A.C., Greengard P., Gadsby D.C. Chloride conductance regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase in cardiac myocytes. *Nature.* 1989;340(6236):718–721.
29. Mutlu G.M., Adir Y., Jameel M., Akhmedov A.T., Welch L., Dumasius V., Fan J.M., Zabner J., Koenig C., Lewis E.R., Balagani R., Traver G., Sznajder J.I., Factor P. Interdependency of β -adrenergic receptors and CFTR in regulation of alveolar active Na^+ transport. *Circ. Res.* 2005;96(9):999–1005.
30. Vijftigschild L.A.W., Berkers G., Dekkers J.F., et al. 2-Adrenergic receptor agonists activate CFTR in intestinal organoids and subjects with cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 2016;48(3):768–779.
31. Chappe V., Hinkson D.A., Zhu T., Chang X.B., Riordan J.R., Hanrahan J.W. Phosphorylation of protein kinase C sites in NBD1 and the R domain control CFTR channel activation by PKA. *J. Physiol.* 2003;548(1):39–52.
32. Ramteke V.D., Tandan S.K., Kumar D., Aruna Devi R., Shukla M.K., Ravi Prakash V. Increased hyperalgesia by 5-nitro-2, 3-(phenylpropylamino)-benzoic acid (NPPB), a chloride channel blocker in crush injury-induced neuropathic pain in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2009;91(3):417–422.
33. Burnell J.M., Kirby W.M. Effectiveness of a new compound, benemid, in elevating serum penicillin concentrations. *J. Clin. Invest.* 1951;30(7):697–700.
34. Talbott J.H., Bishop C., Norcross B.M., Lockie L.M. The clinical and metabolic effects of benemid in patients with gout. *Trans. Assoc. Am. Physicians.* 1951;64:372–377.
35. Silverman W., Locovei S., Dahl G. Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am. J. Physiol. – Cell Physiol.* 2008;295(3):761–767.
36. Barone S., Xu J., Zahedi K., Brooks M., Soleimani M. Probenecid pre-treatment downregulates the kidney $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger (Pendrin) and potentiates hydrochlorothiazide-induced diuresis. *Front. Physiol.* 2018;9:849.
37. Bang S., Kim K.Y., Yoo S., Lee S.H., Hwang S.W. Transient receptor potential V2 expressed in sensory neurons is activated by probenecid. *Neurosci. Lett.* 2007;425(2):120–125.
38. Cloutier M.M. Probenecid affects chloride secretion in canine tracheal epithelium. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987;135(6):1329–1333.
39. Diena T., Melani R., Caci E., Pedemonte N., Sondo E., Zegarra-Moran O., Galletta L.J.V. Block of CFTR-dependent chloride currents by inhibitors of multidrug resistance-associated proteins. *Eur. J. Pharmacol.* 2007;560(2–3):127–131.
40. Hanssens L.S., Duchateau J., Casimir G.J. Cfr protein: Not just a chloride channel? *Cells.* 2021;10(11):2844.
41. Sheppard D.N., Welsh M.J. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiological Rev.* 1999;79(1 Suppl.):23–45.
42. McKinney S.E., Peck H.M., Bochey J.M., Byham B.B., Schuchardt G.S., Beyer K.H. Benemid, p-(DI-n-propylsulfamyl)-benzoic acid; toxicologic properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1951;102(3):208–214.

Поступила в редакцию 04.07.2023

После доработки 28.11.2023

Принята в печать 29.11.2023

RESEARCH ARTICLE

The effect of probenecid on α_1 -adrenoceptor stimulation induced proarrhythmic conduction in the atrioventricular node of rat heart

Y.A. Voronina^{1, *} , V.S. Kuzmin^{1, 2} ¹*Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1–12, Moscow, Russia 119234;*²*Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Centre of Cardiology, Academician Chazov str. 15a, Moscow, Russia 121552***e-mail: voronina.yana.2014@post.bio.msu.ru*

Cardiac tissue contains adrenergic receptors (AR) not only of the beta type, but also of the alpha type (α -AR). Both types of ARs play significant role in regulation of cardiomyocytes electrophysiology in different parts of the heart, including the atrioventricular node (AVN). An augmentation of α_1 -AR mediated component of adrenergic signaling results in impaired conduction of excitation in the heart and onset of various rhythm disturbances including AVN-associated arrhythmias. The activation of α_1 -AR facilitates anionic transmembrane transport causing electrophysiological changes in myocytes. Current study is aimed to the investigation of the effects of anion/chloride blockade on α_1 -AR-mediated proarrhythmic alteration of AVN functioning. Functional characteristics of AVN including AVN conduction time, AVN refractoriness and the AVN conduction alterations were examined via recording of surface electrograms in Langendorff-perfused isolated rat heart (Wistar, 250 ± 30 g). Phenylephrine was used as α_1 -AR agonist. Probenecid demonstrating anion/chloride transmembrane conductance blocking activity was used to modify Phe-induced α_1 -AR-mediated effects in AVN. The activation of α_1 -AR by Phe results in a significant increase in the duration of AV intervals ($N = 10$, $p < 0.001$) and effective refractory period (ERP) in the AVN (by $9.8\% \pm 1.2\%$, $n = 10$, $p < 0.001$). Also, Phe induces AV-blocks of conduction and oscillations in atrioventricular delay ($N = 10$) at the stimulation rates close to ERP. Probenecid significantly reduces the magnitude of AVD oscillations during non-stationary conduction in the AV node. In addition, probenecid attenuates ERP prolongation caused by Phe (107 ± 4 ms, $N = 6$) and 114.2 ± 5.35 ms ($N = 10$) in presence of only Phe and Phe with probenecid, respectively, returning its values toward typical for normal conditions. In conclusion, probenecid maintains physiological mode of AVN conduction when α_1 -AR are stimulated. This also suggests that chloride ion channels and anion carriers may contribute to the α_1 -AR-mediated AVN arrhythmias.

Key words: α_1 -adrenergic receptors, atrioventricular node, atrioventricular blocks, probenecid, chloride channels, arrhythmia

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 22-15-00189.

Сведения об авторах

Воронина Яна Алексеевна — ассистент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: voronina.yana.2014@post.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6624-7805>

Кузьмин Владислав Стефанович — докт. биол. наук, доц. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: ku290381@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3075-4834>