

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*



**Филатова Татьяна Сергеевна**

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК СЕРДЦА  
ПТИЦ НА ПРИМЕРЕ ЯПОНСКОГО ПЕРЕПЕЛА (*COTURNIX JAPONICA*)**

Специальность – 03.03.01 – Физиология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук, доцент  
Денис Валерьевич Абрамочкин

Москва – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ .....	2
1. ВВЕДЕНИЕ .....	7
1.1. Актуальность темы .....	7
1.2. Задачи исследования .....	9
1.3. Научная новизна исследования .....	9
1.4. Научно-практическая значимость .....	10
1.5. Методология .....	11
1.6. Степень достоверности данных .....	11
1.7. Публикации .....	11
1.8. Апробация результатов .....	11
1.9. Положения, выносимые на защиту .....	12
1.10. Личный вклад автора .....	12
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
2.1. Систематическое положение и эволюционное происхождение птиц .....	13
2.2. Предпосылки для формирования особенностей анатомии и физиологии птиц .....	14
2.2.1. Развитие гомойотермии и приобретение способности к полету .....	14
2.2.2. Изменения в геноме птиц .....	17
2.2.3. Изменения физиологии птиц, связанные с одомашниванием .....	19
2.3. Особенности строения и функционирования дыхательной системы птиц .....	19
2.4. Особенности строения сердечно-сосудистой системы птиц .....	21
2.4.1. Анатомическое строение сердца птиц .....	21
2.4.1.1. Строение камер и клапанов сердца птиц .....	21
2.4.1.2. Коронарная система сердца птиц .....	25
2.4.1.3. Ультраструктура миокарда птиц .....	26
2.4.1.4. Электромеханическое сопряжение и структура СПР в сердце птиц .....	28
2.4.1.5. Проводящая система сердца птиц .....	29
2.5. Особенности физиологии сердца птиц .....	32
2.5.1. Параметры работы и производительность сердца птиц .....	32

2.5.1.1.	Частота сокращения и ударный объем сердца птиц.....	34
2.5.1.2.	Давление в системном и легочном круге кровообращения у птиц.....	38
2.5.2.	Электрофизиологические особенности работы сердца птиц.....	40
2.5.2.1.	Распространение электрического возбуждения в сердце птиц и конфигурация электрокардиограммы.....	40
2.5.2.2.	Конфигурация электрической активности миокарда птиц.....	43
2.5.2.3.	Ионные токи, формирующие электрическую активность сердца птиц .....	45
2.6.	Электрофизиологический фенотип миокарда и проблема поиска модельных объектов в экспериментальной кардиологии.....	46
3.	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	49
3.1.	Объект исследования .....	49
3.2.	Электрокардиография наркотизированного перепела <i>in vivo</i> .....	49
3.2.1.	Регистрация электрокардиограммы <i>in vivo</i> .....	49
3.2.2.	Введение агонистов и антагонистов рецепторов медиаторов автономной нервной системы японскому перепелу .....	50
3.3.	Внутриклеточная регистрация потенциалов действия в многоклеточных препаратах миокарда перепела .....	51
3.3.1.	Выделение препаратов миокарда японского перепела.....	51
3.3.2.	Дизайн экспериментальной установки и регистрация потенциалов действия в изолированных препаратах миокарда перепела.....	51
3.3.3.	Анализ потенциалов действия .....	53
3.4.	Регистрация биоэлектрической активности методом оптического картирования.....	53
3.5.	Регистрация ионных токов в изолированных кардиомиоцитах перепела.....	54
3.5.1.	Выделение изолированных кардиомиоцитов перепела.....	54
3.5.2.	Регистрация ионных токов в изолированных кардиомиоцитах перепела методом пэчк-кламп	55
3.5.3.	Анализ ионных токов, зарегистрированных в изолированных кардиомиоцитах перепела .....	56
3.6.	Оценка емкости кальциевых депо СПР в изолированных кардиомиоцитах перепела	57

3.7.	Оценка уровня экспрессии ионных каналов в рабочем миокарде перепела методом количественной ПЦР в реальном времени .....	58
3.8.	Определение белков ионных каналов в миокарде перепела методом вестерн-блоттинга	60
3.9.	Иммуноцитохимическое окрашивание изолированных кардиомиоцитов перепела....	62
3.10.	Визуализация катехоламин-содержащих симпатических волокон в миокарде перепела	63
3.11.	Статистическая обработка данных .....	64
3.12.	Реактивы.....	65
4.	РЕЗУЛЬТАТЫ .....	66
4.1.	Электрическая активность сердца перепела <i>in vivo</i> .....	66
4.1.1.	Характеристики электрокардиограммы перепела в базальных условиях .....	66
4.1.2.	Электрокардиограмма перепела в условиях максимальной симпатической нагрузки	67
4.2.	Адренергическая иннервация миокарда японского перепела .....	68
4.3.	Конфигурация электрической активности изолированных тканевых препаратов миокарда перепела .....	69
4.3.1.	Потенциал покоя в рабочем миокарде перепела.....	69
4.3.2.	Конфигурация потенциалов действия в рабочем миокарде перепела .....	69
4.4.	Морфологические характеристики изолированных кардиомиоцитов перепела .....	71
4.5.	Ионные токи в рабочем миокарде перепела.....	72
4.5.1.	Реполяризирующие калиевые токи задержанного выпрямления.....	72
4.5.1.1.	Быстрый калиевый ток задержанного выпрямления $I_{Kr}$ .....	72
4.5.1.2.	Вклад тока $I_{Kr}$ в формирование электрической активности рабочего миокарда перепела	73
4.5.1.3.	Медленный калиевый ток задержанного выпрямления $I_{Ks}$ .....	74
4.5.1.4.	Вклад тока $I_{Ks}$ в формирование электрической активности рабочего миокарда перепела	76
4.5.1.5.	Чувствительность токов задержанного выпрямления в миокарде перепела к блокаторам.....	77
4.5.2.	Транзиторный выходящий калиевый ток $I_{to}$ .....	77

4.5.2.1.	Транзиторный выходящий ток в изолированных кардиомиоцитах перепела .....	77
4.5.2.2.	Вклад тока $I_{to}$ в формирование электрической активности рабочего миокарда перепела	78
4.5.3.	Молекулярные корреляты основных реполяризирующих калиевых токов в рабочем миокарде перепела .....	79
4.5.3.1.	Экспрессия мРНК основных каналов, переносящих токи $I_{Kr}$ (Kv11.1), $I_{Ks}$ (Kv7.1) и $I_{to}$ (Kv4.3)	79
4.5.3.2.	Иммуноцитохимическое окрашивание изолированных кардиомиоцитов перепела	81
4.5.3.3.	Вестерн-блоттинг каналов Kv11.1, Kv7.1 и Kv4.3.....	81
4.5.4.	Калиевые токи входящего выпрямления .....	83
4.5.4.1.	Фоновый калиевый ток входящего выпрямления $I_{K1}$ .....	83
4.5.4.2.	Ацетилхолинзависимый ток входящего выпрямления $I_{KACH}$ .....	84
4.5.4.3.	Вклад ацетилхолинзависимого тока $I_{KACH}$ в формирование электрической активности миокарда перепела .....	85
4.5.5.	Кальциевые токи .....	86
4.5.6.	Быстрый натриевый ток $I_{Na}$ .....	88
4.6.	Круговорот ионов $Ca^{2+}$ в рабочем миокарде перепела.....	90
4.6.1.	Содержание $Ca^{2+}$ в СПР изолированных кардиомиоцитов.....	90
4.6.2.	Взаимодействие между сарколеммальными $Ca^{2+}$ каналами и $Ca^{2+}$ депо СПР .....	91
4.7.	Характеристики пейсмекерного миокарда японского перепела .....	92
4.7.1.	Определение местоположения водителя ритма в сердце перепела методом оптического картирования .....	92
4.7.2.	Характеристики биоэлектрической активности пейсмекерного миокарда перепела ..	93
4.7.3.	Ионные токи в изолированных пейсмекерных кардиомиоцитах перепела.....	95
4.7.3.1.	Изолированные пейсмекерные кардиомиоциты.....	95
4.7.3.2.	Активируемый гиперполяризацией «funny»-ток $I_f$ в пейсмекерных кардиомиоцитах перепела	95
4.7.3.3.	Фоновый ток входящего выпрямления $I_{K1}$ в пейсмекерных кардиомиоцитах перепела	95

4.7.3.4.	Реполаризующие калиевые токи в пейсмекерных кардиомиоцитах перепела.....	97
5.	ОБСУЖДЕНИЕ.....	99
5.1.	Функционирование сердца перепела <i>in vivo</i> .....	99
5.2.	Морфология и ультраструктура кардиомиоцитов японского перепела .....	100
5.3.	Базовые параметры электрической активности миокарда перепела.....	101
5.3.1.	Потенциал покоя .....	101
5.3.2.	Конфигурация потенциалов действия.....	102
5.4.	Паттерн реполяризующих калиевых токов в миокарде перепела и электрофизиологический фенотип сердца.....	104
5.4.1.	Калиевые токи задержанного выпрямления.....	104
5.4.2.	Транзиторный выходящий ток $I_{to}$ в миокарде перепела.....	106
5.4.3.	Молекулярные корреляты основных реполяризующих калиевых токов в миокарде перепела .....	109
5.5.	Калиевые токи входящего выпрямления в миокарде перепела.....	111
5.6.	Быстрый натриевый ток в миокарде перепела .....	113
5.7.	Круговорот $Ca^{2+}$ в миокарде перепела .....	115
5.7.1.	Сарколеммальные $Ca^{2+}$ каналы.....	115
5.7.2.	$Ca^{2+}$ депо СПР в миокарде перепела .....	117
5.7.3.	Взаимодействие сарколеммальных $Ca^{2+}$ каналов и рианодиновых рецепторов.....	119
5.8.	Электрофизиологические характеристики пейсмекерного миокарда перепела .....	121
5.8.1.	Местоположение водителя ритма сердца птиц.....	121
5.8.2.	Электрическая активность и электрофизиологический фенотип пейсмекерного миокарда перепела .....	121
6.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	124
7.	ВЫВОДЫ .....	126
8.	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	128

## 1. ВВЕДЕНИЕ

### 1.1. Актуальность темы

На сегодняшний день патологии сердечно-сосудистой системы и, в частности, патологии сердечной функции, являются одной из лидирующих причин смертей среди взрослого населения (Heron, 2019; Lippi, Plebani, 2013). Это подчеркивает важность исследований, направленных на поиск новых механизмов регуляции миокарда и способов купирования известных патологий сердца. Наряду с традиционно используемыми в физиологических исследованиях видами млекопитающих, в последние годы в экспериментальной физиологии сердца в силу тех или иных преимуществ находят применение модельные объекты из других таксономических групп, эволюционно более далеких от человека, – например, данио-рерио (*Danio rerio*) (Vornanen, Hassinen, 2016). Однако, при значительном видовом разнообразии представленных в литературе модельных животных, нельзя выделить «идеальный экспериментальный объект», который покрывал бы потребности большей части исследований в области физиологии сердца. Несмотря на большое разнообразие задач и методов в данной области, можно выделить главные признаки, которыми должен обладать желаемый модельный организм:

- схожесть физиологических параметров (таких как температура тела; набор ионных токов в миокарде; механизмы регуляции сердечной функции) с таковыми у человека;
- экономическая целесообразность;
- простота содержания животного и манипуляций с ним.

Так, сердце уже упомянутого данио-рерио, несмотря на легкость содержания животного и моделирования различных наследственных патологий миокарда, значительно отличается от сердца млекопитающих как с анатомической точки зрения (двухкамерное сердце, отсутствие коронарных сосудов), так и с физиологической (отсутствие постоянной температуры тела, неполный набор реполяризирующих калиевых токов, экспрессируемых миокардом). Миокард крысы, мыши и морской свинки, несмотря на частое использование в физиологических исследованиях и простоту моделирования различных патологических состояний, отличается от человеческого миокарда по набору ионных токов, обеспечивающих реполяризацию сердца и являющихся основной мишенью большинства противоаритмических препаратов, – что делает невозможным использование данных животных при поиске новых противоаритмических лекарств (Janse, Opthof, Kléber, 1998; Nerbonne, 2000). С точки зрения физиологии и патофизиологии миокарда, наибольшее сходство с сердцем человека прослеживается у миокарда собаки, кролика и свиньи – однако, ввиду относительно крупных размеров и сложности содержания, повсеместное использование данных животных в

физиологических лабораториях невозможно (Arlock и др., 2017; Cui и др., 2011; Li и др., 1996a; Nerbonne, 2000; Shibata и др., 1989; Tsuji и др., 2000). Таким образом, на сегодняшний день в экспериментальной физиологии сердца нет известных модельных организмов, которые удовлетворяли бы всем перечисленным выше требованиям, и поиск новых видов экспериментальных животных представляется актуальной задачей.

Проведенные ранее исследования дают представление об электрофизиологических характеристиках миокарда большинства таксономических групп позвоночных животных, включая рыб (Haverinen, Vornanen, 2009a; Haworth и др., 2014), амфибий (Abramochkin, Kuzmin, 2018; Giles и др., 1989; Momose, Giles, Szabo, 1984), рептилий (Abramochkin, Matchkov, Wang, 2020; Warren и др., 2010a). Однако, сердце птиц с точки зрения физиологии и электрофизиологии на сегодняшний день изучено слабо, несмотря на то, что птицы, как группа животных, независимо от млекопитающих в ходе эволюции приобретая гомойотермность и четырехкамерное сердце с полной межжелудочковой перегородкой (Hicks, Wang, 2012), представляют большой интерес для фундаментальных сравнительно-физиологических исследований. Первые попытки описать электрическую активность сердца птиц были предприняты около 50 лет назад (Parrano, 1972; Parrano, 1976). Значительная часть работ в этой области с применением современных методов исследования была выполнена на эмбрионах птиц. Так, например, есть сведения о наборе деполяризующих кальциевых токов, обеспечивающих вход ионов кальция, необходимых для сокращения миокарда (Creazzo, Burch, Godt, 2004); а также показано, что реполяризация миокарда эмбрионов курицы опосредуется калиевыми токами задержанного выпрямления, характерными также для человеческого миокарда (Nouchi и др., 2011; Satoh, 1995a) – однако, эти же исследования показывают, что в ходе раннего онтогенеза электрическая активность миокарда и профиль слагающих ее ионных токов может значительно меняться, и данные сведения могут быть неприменимы к физиологии взрослого организма.

Сведения же об электрофизиологическом фенотипе сердца взрослых птиц весьма отрывочны. Значительная работа в этой области была проделана группой В.И. Прошевой, которая показала, что электрофизиологические параметры электрической активности рабочего миокарда взрослой курицы сравнимы с таковыми у млекопитающих сходных размеров (Prosheva, Kaseva, 2016). Однако, исследования других групп также показали возможные отличия в наборе деполяризующих кальциевых токов (Bogdanov и др., 1995), а также в строении натриевых каналов (Vornanen, Hassinen, Haverinen, 2011) между миокардом птиц и млекопитающих.

Кроме того, нельзя не отметить, что, несмотря на очевидные анатомические сходства между сердцами птиц и млекопитающих, сердца птиц характеризуются более высокими значениями



сердечного выброса и артериального давления (Grubb, 1983; Ruben, 1995). Однако, при этом кардиомиоциты птиц более сходны по своей морфологии и ультраструктуре с таковыми у пойкилотермных позвоночных (рыбы, амфибии, рептилии), для сердец которых характерны более низкая частота и сила сокращений (Dzialowski, Crossley, 2015; Shiels, Galli, 2014).

**Таким образом, целью данной работы являлось изучение электрофизиологических характеристик миокарда птиц на примере японского перепела (*Coturnix japonica*), а также последующая оценка перспектив использования миокарда птиц в качестве модельного объекта в физиологических исследованиях.**

### **1.2. Задачи исследования**

1. Изучить функционирование сердца японского перепела (*Coturnix japonica*) *in vivo* с помощью метода электрокардиографии.
2. Зарегистрировать и охарактеризовать электрическую активность тканевых препаратов предсердного и желудочкового рабочего миокарда японского перепела.
3. Описать основные реполяризующие ионные токи в изолированных предсердных и желудочковых рабочих кардиомиоцитах перепела с использованием метода пэтч-кламп и оценить их вклад в формирование электрической активности миокарда. Сопоставить их набор с таковым в миокарде человека и экспериментальных животных, наиболее часто используемых в кардиологических исследованиях.
4. Используя молекулярно-биологические и иммунохимические методы, установить молекулярную природу каналов, опосредующих основные реполяризующие токи в рабочем миокарде перепела.
5. Зарегистрировать и описать основные токи входящего выпрямления в кардиомиоцитах перепела.
6. Изучить вход  $\text{Ca}^{2+}$  и емкость кальциевого депо саркоплазматического ретикулума в рабочем миокарде перепела, а также оценить взаимодействие между этими источниками кальция в миокарде перепела.
7. Выявить местоположение водителя ритма сердца перепела и охарактеризовать его электрическую активность.

### **1.3. Научная новизна исследования**

1. В данной работе впервые была характеризована и сопоставлена конфигурация электрической активности рабочего миокарда предсердий и желудочков взрослой птицы на примере японского перепела.

2. Впервые было показано участие быстрого и медленного реполяризующих калиевых токов задержанного выпрямления ( $I_{Kr}$  и  $I_{Ks}$ , соответственно) в реполяризации миокарда взрослой птицы.

3. Впервые были зарегистрированы и охарактеризованы основные реполярирующие калиевые токи в изолированных рабочих кардиомиоцитах взрослой птицы.

4. В данной работе впервые было продемонстрировано присутствие транзитного выходящего тока  $I_o$  и его вклад в раннюю реполяризацию в рабочем миокарде взрослой птицы.

5. Впервые были описаны калиевые токи входящего выпрямления в рабочем миокарде желудочек и предсердий птицы.

6. Впервые было показано отсутствие «быстрого» кальциевого тока T-типа в рабочих кардиомиоцитах взрослой птицы.

7. Данная работа впервые демонстрирует наличие взаимодействия между кальциевыми каналами на сарколемме и мембране саркоплазматического ретикулума в изолированных рабочих кардиомиоцитах взрослой птицы.

8. Впервые была оценена емкость кальциевого депо саркоплазматического ретикулума в рабочем миокарде взрослой птицы.

9. Впервые с помощью метода оптического картирования было показано местоположение водителя ритма в сердце взрослой птицы.

10. Впервые были охарактеризованы электрическая активность и электрофизиологический фенотип пейсмекерного миокарда взрослой птицы.

#### **1.4. Научно-практическая значимость**

Результаты данной работы развивают современные представления о физиологии птиц. Современная и классическая физиология зачастую обходят вниманием данный класс животных, считая их эволюционно далекой сестринской группой и предпочитая в качестве объектов исследования млекопитающих, амфибий и рыб. Данная работа демонстрирует, что, несмотря на отличное от млекопитающих эволюционное происхождение птиц, за счет конвергенции электрофизиологический фенотип миокарда птиц оказался весьма сходен с таковым у млекопитающих. Это расширяет наши представления об эволюции группы архозавров, к которой относятся птицы, и их переходе от пойкилотермии к гомойотермии, а также делает птиц потенциально пригодной экспериментальной моделью для исследований новых кардиотропных препаратов.

Помимо этого, данная работа демонстрирует, что несмотря на отсутствие в миокарде птиц поперечных (T-) трубочек, характерных для кардиомиоцитов млекопитающих, кальциевые депо саркоплазматического ретикулула принимают участие в сокращениях миокарда птиц и взаимодействуют с кальциевыми каналами, расположенными на сарколемме птичьих кардиомиоцитов, обеспечивая необходимую силу и частоту сердечных сокращений. Механизм данного взаимодействия подлежит дальнейшему, более подробному изучению, и в будущем может лечь в основу терапии таких заболеваний как сердечная недостаточность.

### **1.5. Методология**

В данной работе изучение конфигурации электрической активности и оценку влияния на нее тех или иных соединений проводили с использованием метода внутриклеточной регистрации электрической активности острыми стеклянными микроэлектродами в перфузируемых тканевых препаратах миокарда перепела. Генерацию и распространение электрического возбуждения изучали с в тканевых препаратах правого предсердия перепела с помощью метода оптического картирования. Ионные токи изучали в изолированных кардиомиоцитах перепела методом пэтч-кламп в конфигурации whole-cell. Для изучения транскрипции и трансляции генов порообразующих субъединиц ионных каналов в миокарде перепела использовали, соответственно, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и вестерн-блоттинг.

### **1.6. Степень достоверности данных**

Полученные в ходе работы данные достоверны, воспроизводимы и получены с использованием целесообразных современных экспериментальных методик. Обзор литературы и обсуждение подготовлены с использованием актуальных научных источников.

### **1.7. Публикации**

По материалам данного диссертационного исследования опубликованы 5 печатных работ: 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science или Scopus, а также 2 тезиса докладов на всероссийских и международных конференциях.

### **1.8. Апробация результатов**

Результаты настоящей диссертационной работы были представлены на Ежегодной Всероссийской научно-практической конференции «Кардиология на марше 2021» и 61-ой сессии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России (Москва, Россия, 2021); на международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, Россия, 2021); на международной конференции «Ломоносовские чтения – 2021», секция «Биология» (Москва, Россия, 2021); на международной молодежной онлайн-конференции «Future Physiology 2020» (Великобритания, 2020); на VII Всероссийской с международным

участием школе-конференции по физиологии и патологии кровообращения (Москва, Россия, 2020); на Третьей молодежной школе-конференции «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций» (Звенигород, Россия, 2019).

Диссертационная работа апробирована на заседании кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова 20 сентября 2021 года.

### **1.9. Положения, выносимые на защиту**

1. Реполаризация рабочего миокарда взрослого перепела обеспечивается следующими токами: транзиторный выходящий калиевый ток  $I_{to}$ , быстрый и медленный калиевые токи задержанного выпрямления  $I_{Kr}$  и  $I_{Ks}$ .

2. В рабочем миокарде перепела экспрессируются и транслируются белки Kv11.1, Kv7.1 и Kv4.3, являющиеся потенциальными молекулярными коррелятами каналов, опосредующих токи  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ , и  $I_{to}$ .

3. Основным током входящего выпрямления в миокарде взрослого японского перепела является фоновый ток входящего выпрямления  $I_{K1}$ . Функциональный ацетилхолинзависимый ток  $I_{KACH}$ , активируемый ацетилхолином и его аналогами, присутствует только в предсердном миокарде перепела. Конститутивно активный ток  $I_{KACH}$  отсутствует в рабочем миокарде перепела.

4. Вход  $Ca^{2+}$  в клетки рабочего миокарда взрослого японского перепела обеспечивается кальциевым током L-типа ( $I_{CaL}$ ), тогда как кальциевый ток T-типа ( $I_{CaT}$ ) в рабочем миокарде отсутствует.

5. Емкость кальциевых депо в саркоплазматическом ретикулуме рабочего миокарда птиц сопоставима с таковой у холоднокровных позвоночных животных и значительно превышает таковую у млекопитающих.

6. Несмотря на отсутствие T-трубочек и архаичную ультраструктуру кардиомиоцитов птиц, сарколеммальные кальциевые каналы взаимодействуют с рианодиновыми рецепторами на мембране саркоплазматического ретикулума.

### **1.10. Личный вклад автора**

Личный вклад соискателя, Филатовой Т.С., присутствует на всех этапах выполнения настоящей работы: планировании экспериментов, уходе за животными, проведении электрофизиологических экспериментов, статистической обработке и обобщении результатов, подготовке публикаций, представлении работ на российских и международных конференциях.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### **2.1. Систематическое положение и эволюционное происхождение птиц**

К классу Птиц (*Aves*) относят теплокровных диапсид, покрытых перьями и обладающих определенными анатомическими особенностями – такими как видоизменение передних конечностей и наличие киля у большинства представителей данной группы (Padian, Chiappe, 2007). Наиболее древние останки первых представителей группы птиц относят к периоду 150 млн лет назад, однако геномные исследования свидетельствуют о том, что птицы отделились от прочих представителей группы архозавров более 200 млн лет назад (Chatterjee, 2015). Несмотря на значительные ароморфозы, отделившие птиц от их предшественников, – такие, как развитие полной межжелудочковой перегородки и способность поддерживать постоянную температуру тела, – некоторые исследователи относят птиц ввиду их эволюционной близости к кладе архозавров к подклассу Птицы класса Рептилии (Stephenson, Adams, Vaccarezza, 2017). Последний общий предок млекопитающих и птиц жил около 300 млн лет назад – таким образом, основные эволюционные изменения, отделившие эти две группы животных от предковых видов пресмыкающихся, произошли в них независимо (Burt и др., 1999; Kemp, 1988).

На сегодняшний день известны три основные гипотезы происхождения птиц, однако единой точки зрения на родственные связи птиц с существующими и вымершими группами пресмыкающихся и, соответственно, на их точное систематическое положение, не существует. Первая, наиболее старая гипотеза, предполагает происхождение птиц от отряда текодонтов (*Thecodontia*) – парафилетической группы мелких рептилий, относящихся к одним из наиболее древних представителей группы архозавров (Heilmann, 1926); однако, учитывая новые палеонтологические и молекулярные данные, вероятность такого сценария крайне низка (Padian, Chiappe, 2007). Крокодиломорфная гипотеза, основанная на сравнительном анализе костей черепа и других особенностей анатомии, позиционирует птиц как сестринскую группу по отношению к прочим представителям отряда Крокодилы (*Crocodylia*) и имеет под собой несколько больше оснований – по меньшей мере потому, что отряд Крокодилов является монофилетической группой, в отличие от отряда Текодонтов (Walker, 1972). Наиболее перспективной на сегодняшний день является так называемая «тероподная» гипотеза, полагающая птиц сестринской группой по отношению к подотряду тероподных динозавров (*Theropodia*), анатомические сходства которых с ныне живущими представителями птиц были отмечены еще в начале прошлого века (Ostrom, 1975). Эта гипотеза подкрепляется как сравнительно-анатомическими данными, так и кладистическим анализом, а также относительно недавними находками оперенных представителей теропод (Gauthier, Padian, 1985; Курочкин, 2006).

Как бы то ни было, каждая из перечисленных гипотез происхождения птиц определяет их как представителей группы архозавров, единственными оставшимися представителями которой помимо птиц на сегодняшний день являются крокодилы (рис. 1).

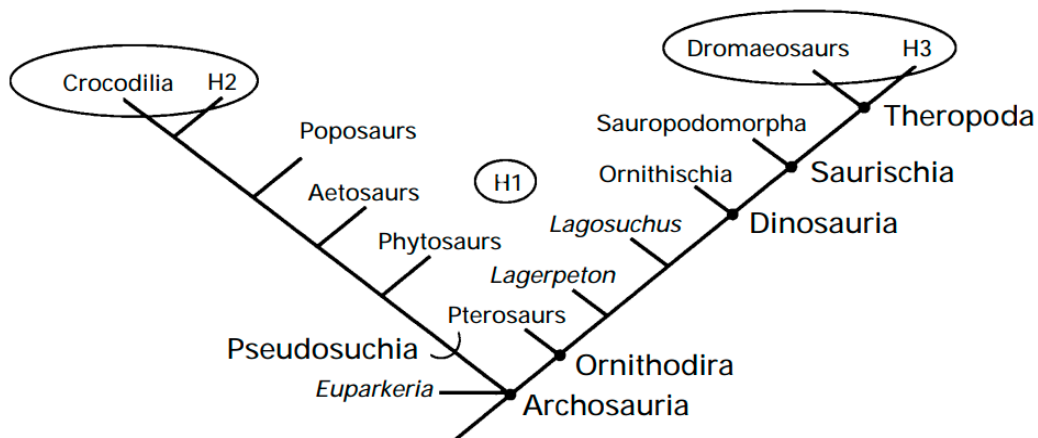


Рис. 1. Происхождение и систематическое положение птиц согласно трем основным гипотезам: H1 – текодонтной, H2 – крокодилomorphicной, H3 – тероподной. По (Padian, Chiappe, 2007).

## **2.2. Предпосылки для формирования особенностей анатомии и физиологии птиц**

### **2.2.1. Развитие гомойотермии и приобретение способности к полету**

Несмотря на большое число сестринских групп, образовавшихся после отделения птиц от тероподных динозавров, все ныне живущие птицы относятся к подклассу Верхохвостых или Новых птиц (Neornithes) (Padian, Chiappe, 2007). Физиология птиц во многих аспектах отличается как от физиологии рептилий и, в частности, ближайшей родственной группы, крокодилов, так и от физиологии конвергентно эволюционировавших млекопитающих. Ключевые особенности функционирования организма птиц связаны с теплокровностью и приспособлением к полету – несмотря на то, что некоторые группы птиц – например, инфракласс Бескилевых птиц (Paleognathae) – вторично потеряли способность к полету (Torres, Norell, Clarke, 2020).

Стоит отметить, что, вопреки упрощенному общепринятому представлению, далеко не все птицы (а также млекопитающие) являются абсолютно теплокровными (или гомойотермными) организмами. Несмотря на то, что в покое температура тела птиц выше, чем температура тела млекопитающих со сходной массой тела, для многих из них в той или иной степени характерна гетеротермия – флуктуация температуры тела в зависимости от условий окружающей среды, суточных или годовых циклов, физиологического состояния и т.д. (Prinzinger, Preßmar, Schleucher, 1991). Многие виды птиц демонстрируют экстремальное снижение базового уровня метаболизма и, соответственно, температуры тела (изменение температуры может

достигать 30°C и более) вплоть до впадения в торпор в ответ на снижение температуры окружающей среды (McKechnie, Lovegrove, 2002).

Гомойотермия независимо появилась в ходе эволюции у птиц и млекопитающих (Kemp, 1988), вследствие чего механизмы теплопродукции в этих группах животных различаются. Тем не менее, направление естественного отбора, обусловившее развитие теплокровности в этих группах, по всей видимости, было общим, и включало такие факторы как отбор по способности к высокому уровню аэробных нагрузок (Bennett, Ruben, 1979), высокому уровню способности к терморегуляции (Crompton, Taylor, Jagger, 1978), более сложные механизмы поддержания позы (Carrier, 1987), а также увеличенный размер мозга (Hulbert, 1980). Принимая во внимание относительно постоянное соотношение максимального и минимального уровней потребления кислорода у физически активных представителей гомойотермных и пойкилотермных наземных позвоночных, первоначальным преимуществом высокой интенсивности метаболизма был повышенный уровень физической активности у предков млекопитающих и птиц. Поскольку локомоция и прочая активность наземных тетрапод гораздо более энергозатратна по сравнению с таковой у водных позвоночных, улучшение ее энергетического обеспечения дало птицам и млекопитающим серьезное преимущество перед рептилиями, как в скорости, так и в выносливости (Bennett, Ruben, 1979), тогда как терморегуляторные преимущества интенсивного метаболизма были вторичны (Ruben, 1995). Другая точка зрения полагает движущим фактором появления гомойотермии появление у птиц и млекопитающих заботы о потомстве: увеличение вклада животных в выращивание потомства требует больших энергетических затрат (Koteja, 2000).

Развитие гомойотермии как у птиц, так и у млекопитающих, в общих чертах, потребовало двух условий: увеличения теплопродукции и снижения излучения тепла в окружающую среду. Наиболее явно различается теплоизолирующее покрытие: мех у млекопитающих, перья у птиц, при том, что представители обеих групп дополнительно для теплоизоляции накапливают подкожный жир, что нехарактерно для холоднокровных позвоночных (Ruben, 1995). Теплопродукция коррелирует с базовым уровнем метаболизма, который в свою очередь определяется метаболической активностью органов животного, тогда как максимальной теплопродукция и аэробная активность определяются возможностями сердечно-сосудистой системы и скелетных мышц. У современных представителей групп птиц и млекопитающих увеличение базового уровня метаболизма обеспечивается за счет большей относительной массы внутренних органов, а также большей высокой удельной интенсивности базового метаболизма и потребления кислорода тканями внутренних органов и скелетными мышцами (Bennett, 1972; Brand и др., 1991; Daan, Masman, Groenewold, 1990). На клеточном уровне увеличение интенсивности метаболизма и аэробного синтеза АТФ у млекопитающих и птиц

достигается увеличением плотности митохондрий и площади митохондриальных мембран (Else, Hulbert, 1985), увеличением масс-специфичной активности митохондриальных ферментов (Hulbert, Else, 1989).

При более высоком базовом уровне метаболизма и температуре тела птиц как группы в целом (Clarke, Pörtner, 2010), на молекулярном уровне механизмы поддержания температуры тела у птиц отличаются от таковых у млекопитающих. Речь идет о так называемом недрожательном термогенезе, обеспечивающем поддержание температуры тела в термонеutralной зоне; при сильном снижении температуры птицы задействуют термогенез дрожания за счет сокращений антагонистических летательных мышц (West, 2015). У большинства плацентарных млекопитающих это происходит за счет генерации тепла при разобщении электрон-транспортной цепи митохондрий при участии белка UCP1; особую роль в этом играет бурая жировая ткань (Cannon, Nedergaard, 2004; Oelkrug, Polymeropoulos, Jastroch, 2015). Однако, несмотря на то, что гомойотермия птиц и, в частности, переход к гомойотермии в ходе онтогенеза связаны с увеличением степени разобщения митохондриальных электрон-транспортных цепей (Walter, Seebacher, 2009), птицы не имеют ни бурой жировой ткани, ни белка UCP1 – и следовательно, задействуют другие механизмы недрожательного термогенеза (Mezentseva, Kumaratilake, Newman, 2008; Newman, 2011). У птиц описан ортолог белка UCP1 – avUCP (Emre и др., 2007), – однако, его роль в теплопродукции крайне спорна (Walter, Seebacher, 2009). Ключевая роль в разобщении митохондриальной электрон-транспортной цепи, по-видимому, принадлежит имеющемуся у птиц ортологу адениннуклеотид-транслоказы, расположенному на внутренней митохондриальной мембране и экспрессируемому в больших количествах в скелетной мускулатуре (Toyomizu и др., 2002; Walter, Seebacher, 2009). Другой предполагаемый механизм термогенеза в организме птиц включает разобщение круговорота  $Ca^{2+}$  в скелетных мышцах при участии сарколипина, связывающегося с  $Ca^{2+}$ -АТФазой SERCA на мембране саркоплазматического ретикулума и снижающего эффективность работы SERCA с увеличением выделения тепловой энергии (Asahi и др., 2003; Maurya и др., 2015). Это хорошо согласуется с тем, что птицы, при наиболее высоком базовом уровне метаболизма среди позвоночных, имеют также наибольшую массу скелетных мышц по сравнению с другими амниотами сходных размеров – в частности, за счет гиперплазии летательных мышц (Newman, 2011), тогда как птицы, вторично потерявшие способность летать характеризуются более низкими значениями уровня метаболизма и температуры тела (Calder, Dawson, 1978; Clarke, Rothery, 2008). Однако, несмотря на то, что данный механизм термогенеза играет важную роль даже у имеющих бурый жир плацентарных млекопитающих, его реальный вклад в регуляцию температуры тела птиц неизвестен (Bal, Periasamy, 2020). Кроме того, показано, что С-конец



сарколипина, участвующий в связывании с SERCA (Barbot и др., 2016), у птиц имеет другую аминокислотную последовательность (Montigny и др., 2014), что ставит под сомнение его участие в термогенезе. Таким образом, конкретные механизмы недрожательного термогенеза и их относительный вклад в поддержание температуры тела птиц на сегодняшний день остаются неясными.

Именно переход к гомойотермии (пусть и не абсолютной, в особенности на ранних этапах эволюции птиц после отделения от основной группы архозавров) в сочетании с некоторыми изменениями в анатомии позволил птицам освоить активный полет. Активный машущий полет требует больших энергетических затрат по сравнению с затратами при ходьбе или беге животного с аналогичной массой тела на то же расстояние с той же скоростью (Butler, 2016; Pennycuik, 1968). Несмотря на то, среди птиц выделяют несколько характерных форм полета (парящий, вибрационный, волнообразный полет), различных по своей энергозатратности, каждый полет включает по меньшей мере один взлет с набором высоты (Bishop, Butler, 2015), а у представителей семейств Курообразных и Тинамуобразных полет, как правило, состоит только из этой наиболее энергозатратной фазы (Bishop, Butler, 1995; Sapir и др., 2010). Продолжительный активный полет (как, например, во время сезонной миграции птиц) требует интенсивного аэробного метаболизма (Bishop, Butler, 2015), а полет на большой высоте при низком парциальном давлении кислорода и низкой температуре дополнительно увеличивает энергетические потребности организма (Scott, 2011). Короткие полеты и перепархивания (т.н. «burst flight») Курообразных, используемые при необходимости быстрого бегства от хищников, в основном обеспечиваются анаэробным метаболизмом (Marden, 1994) – однако, даже непродолжительный полет создает кислородный долг, который необходимо восполнить. Энергозатраты и интенсивность аэробного метаболизма, сопряженные с обычной для птиц физической активностью, значительно превышают возможности доставки кислорода в организме рептилий. Соответственно, эволюция птиц была сопряжена с развитием дыхательной и кровеносной систем, включая усиленную васкуляризацию легких и прочих тканей организма, увеличенная интенсивность вентиляции легких, увеличение емкости сердечно-сосудистой системы и систем транспорта кислорода (Withers, 1992). Любая из стратегий полета, используемых птицами, предполагает наряду с анатомическими перестройками (такими как формирование оперения, видоизменения передних конечностей и облегчение скелета (Padian, Chiappe, 2007)) высокую функциональность дыхательной и сердечно-сосудистой систем.

### **2.2.2. Изменения в геноме птиц**

Описанные анатомические и физиологические перестройки в организме птиц, связанные с эволюционными изменениями в ходе приобретения эндотермии и способности летать,

очевидно, не могли происходить в отрыве от перестроек генома птиц. Птицы обладают маленьким геномом, размер генома птиц варьирует в очень небольших пределах – от 0,9 млрд п.о. (у колибри) до 2,5 млрд п.о. (у страуса), что, видимо, отражает крайне низкую плотность повторов и транспозонов (Dodgson, 2015). Принимая во внимание геномные и палеогеномные данные о сходных изменениях в размере генома у других позвоночных, способных к активному полету – например, у летучих мышей и птерозавров, – было выдвинуто предположение, что более мелкие клетки с мелким ядром и маленьким геномом создают преимущество при полете (Hughes, Hughes, 1995; Organ, Shedlock, 2009; Zhang, Edwards, 2012). При этом, судя по имеющимся данным, величина генома коррелирует со способностью конкретного вида птиц к активному полету: так, колибри, известные своей способностью к особому типу полета, обладают самым маленьким геномом среди амниот, тогда как у нелетающих птиц геном имеет больший размер (Gregory и др., 2009; Hughes, Hughes, 1995).

Одной из лидирующих гипотез, объясняющих описываемую корреляцию, является связь размера генома с уровнем метаболической активности животного. Согласно этой гипотезе, клетки с меньшим размером генома имеют меньший размер и более высокое соотношение площади поверхности к объему клетки, что создает благоприятные условия для более высокой метаболической активности (Gregory, 2001), что согласуется с необходимостью поддерживать высокий уровень интенсивности метаболизма для энергетического обеспечения активного полета и соответствующим направлением действия естественного отбора (Ward и др., 2002). Сравнительный анализ морфометрических показателей в совокупности с геномными исследованиями показал, что размер генома отрицательно коррелирует с относительной массой летательных мышц и относительной массой сердца, что косвенно подтверждает данную гипотезу (Wright, Gregory, Witt, 2014).

Очевидно, что помимо интронных перестроек и уменьшения размера генома уникальные особенности физиологии и анатомии птиц должны быть связаны с экспрессией соответствующих генов, отсутствующих у прочих позвоночных. Геном птиц претерпел 2 дупликации, в результате чего образовались 4 кластера гомеобоксных *Hox*-генов; всего по примерным оценкам геном птиц содержит около 15000-20000 генов, кодирующих белки (Peer Van De, Maere, Meyer, 2009; Wang и др., 2013). На данный момент имеется крайне мало данных о каких-либо специфичных для птиц генов или их аллелей. Отчасти это связано со сложностями аннотирования генома птиц и, соответственно, идентификацией функций тех или иных функций генов. Известно, что птицы значительно расширили набор генов кератина, что связано с разнообразием кератиновых структур (перья, чешуя, клюв и когти) (Warren и др., 2010b).

### **2.2.3. Изменения физиологии птиц, связанные с одомашниванием**

### **2.3. Особенности строения и функционирования дыхательной системы птиц**

Строение и дыхательной системы и, в частности, легких птиц является уникальным, однако некоторые анатомические и ультраструктурные особенности являются лишь альтернативным способом решения тех же проблем, что стояли перед предками млекопитающих. Тем не менее, суммарная площадь газообмена у птиц на 15% больше, чем у млекопитающих, а толщина барьера между кровью и воздушной средой в 2,5 раз меньше (Maina, King, Settle, 1989; West, 2009). Более того, дыхательная система птиц обеспечивает им в среднем наиболее высокий дыхательный объем на 1 кг массы тела среди позвоночных – 160,8 мл (для сравнения, у млекопитающих дыхательный объем составляет 54,4 мл на 1 кг массы тела) (Schmidt-Nielsen, 1975).

Для птиц характерны относительно небольшие, нерастяжимые легкие, расположенные в торакоабдоминальной полости. Диафрагма, характерная для млекопитающих, отсутствует, поэтому дыхание реберное, и давление в торакоабдоминальной полости равно атмосферному (в отличие от млекопитающих, вынужденных поддерживать более низкое давление в грудной полости). Легкие связаны с системой из девяти воздушных мешков, которые составляют основной объем дыхательной системы птиц и обеспечивают так называемую «двойную вентиляцию» на вдохе и на выдохе. Воздух попадает в легкие птиц через верхние дыхательные пути, включающие ороназальные структуры и трахею, которая в районе певчей гортани (т.н. сиринкс) разветвляется на 2 первичных бронха, которые, в свою очередь, дают начало нескольким группам вторичных бронхов (Powell, 2015). В отличие от млекопитающих, бронхиальное древо которых сильно ветвится, бронхиальная система птиц включает бронхи только 3 порядков (Ludders, 2015).

Функциональной единицей дыхательной системы птиц являются парабронхи, иногда также называемые «третичными бронхами». Большинство парабронхов организованы в группы параллельных трубочек диаметром 0,5-2 мм (т.н. палеопульмональные парабронхи), соединяющие медиовентральные и медиодорзальные вторичные бронхи, но у некоторых видов птиц часть бронхов демонстрирует нерегулярные паттерны ветвления (неопульмональные парабронхи) (Scheid, Piiper, 1989). Как и альвеолы млекопитающих, парабронхи птиц покрыты сурфактантом, однако его максимальное поверхностное натяжение ниже, чем у млекопитающих, что объясняется нерастяжимостью птичьих легких (Bernhard и др., 2001). В дыхательной системе птиц отсутствуют какие-либо анатомические клапаны – однако, за счет так называемых «аэродинамических клапанов» воздух на вдохе и выдохе движется определенным образом: в палеопульмональных парабронхах всегда в

каудокраниальном направлении, тогда как в неопульмональных парабронхах на вдохе воздух движется в краниокаудальном направлении, а на выдохе – в каудокраниальном (рис. 2).

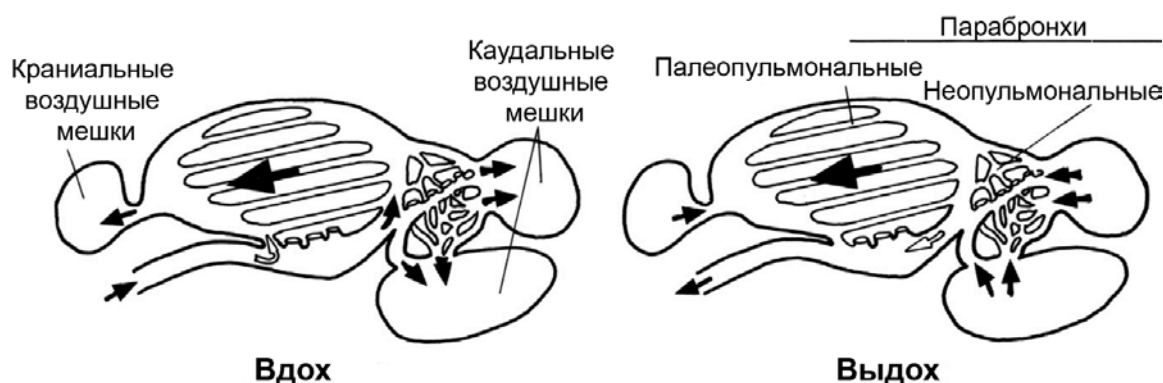


Рис. 2. Движение воздуха в дыхательной системе птиц во время вдоха и выдоха. Черные стрелки показывают движение воздуха в парабронхах и воздушных мешках, белые стрелки показывают возможные шунты. По (Powell, 2015).

Газообмен в дыхательной система птиц происходит в парабронхах. При этом строение парабронхов позволяет использовать противоточный механизм при насыщении крови в прилегающих капиллярах кислородом: движение воздуха в парабронхах и движение крови в прилегающих капиллярах направлены в противоположные стороны. Таким образом, по мере продвижения воздуха по длине парабронха парциальное давление  $O_2$  ( $P_{O_2}$ ) в нем падает, однако  $P_{O_2}$  в крови в прилегающих капиллярах оказывается еще ниже (рис. 3).

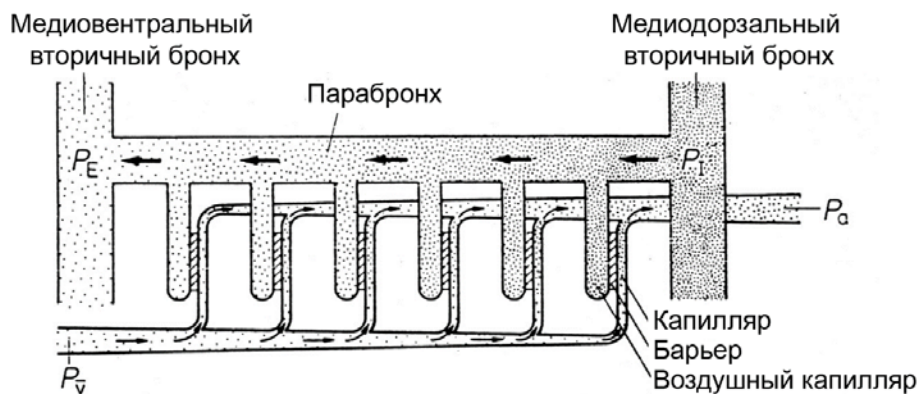


Рис. 3. Модель противоточного газообмена в парабронхах птиц. На рисунке обозначено парциальное давление  $O_2$ :  $P_I$  – во вдыхаемом воздухе;  $P_E$  – в выдыхаемом воздухе;  $P_V$  – в венозной крови;  $P_A$  – в артериальной крови. По (Scheid, 1990).

В идеальных условиях такая модель газообмена позволяет достигать более высокого  $P_{O_2}$  в артериальной крови по сравнению с  $P_{O_2}$  в выдыхаемом воздухе. Альвеолярные легкие млекопитающих же в идеальных условиях позволяют достигнуть лишь равных значений  $P_{O_2}$  в выдыхаемом воздухе и крови. (Piiper, Scheid, 1972).

Таким образом, дыхательная система птиц позволяет с высокой эффективностью насыщать кровь кислородом, что необходимо для поддержания высокоинтенсивного метаболизма и энергетического обеспечения полета, как было сказано выше. Однако, это также требует высокофункциональной сердечно-сосудистой системы для кровоснабжения тканей.

## **2.4. Особенности строения сердечно-сосудистой системы птиц**

### **2.4.1. Анатомическое строение сердца птиц**

#### *2.4.1.1. Строение камер и клапанов сердца птиц*

Несмотря на то, что эволюционные ветви птиц и млекопитающих разошлись более 200 млн лет назад (Padian, Chiappe, 2007), конвергентная эволюция в направлении увеличения интенсивности метаболизма и развития теплокровности привела к тому, что сердечно-сосудистые системы современных птиц и млекопитающих устроены весьма сходно. Однако, в силу отдаленного систематического положения и ориентации современной физиологии в значительной степени на медицинские исследования, об устройстве сердечно-сосудистой системы птиц на сегодняшний день известно гораздо меньше.

Сердце птиц, как и сердце млекопитающих, представляет из себя четырехкамерный мышечный полый орган, принимающий важное участие в поддержании давления в сосудистом русле и передвижении крови по нему. Сосудистое русло формирует два круга кровообращения, большой (системный) и малый (легочный), соединенные друг с другом последовательно. Само сердце расположено в краниальной части торакоабдоминальной полости, окружено дорзально и латерально долями печени, а его продольная ось ориентирована немного правее продольной оси тела птицы. Сердце птиц окружает тонкий, но достаточно плотный соединительнотканый перикардиальный мешок, содержащий небольшое количество серозной жидкости для облегчения движений сердца внутри него. Перикард птиц сращен с грудиной, окружающими воздушными мешками, печенью, а также с адвентициальным слоем впадающих в сердце и выходящих из него крупных центральных кровеносных сосудов, что делает положение сердца в торакоабдоминальной полости относительно постоянным. Перикардиальный мешок практически нерастяжим, что позволяет противостоять сильным увеличениям объема сердца, вызываемых перегрузкой сердца объемом крови. Кроме того, данное свойство перикарда может опосредовать механическое сопряжение работы желудочков сердца птиц.

Масса сердца птиц по отношению к массе тела, как правило, больше, чем таковая у млекопитающих сходного размера в связи с высокой энергетической стоимостью активного полета. Кроме того, как и у млекопитающих, относительная масса сердца птиц зависит от размера тела. У более мелких видов ввиду большего соотношения площади поверхности тела

к объему тела и, соответственно, больших теплопотерь и энергетических затрат на поддержание температуры тела, базовый уровень метаболизма наряду с относительной массой тела оказывается выше (рис. 4). У птиц зависимость массы сердца от массы тела выражается как  $M_h = 0,014 \times M_b^{0,91}$ , где  $M_h$  это масса сердца, а  $M_b$  – масса тела; тогда как у млекопитающих эта зависимость выглядит как  $M_h = 0,0058 \times M_b^{0,98}$  (Bishop, Butler, 1995; Prothero, 1979). Стоит отметить, что у птиц относительная масса сердца может зависеть не только от размеров тела, но и от их способности к полету – так, колибри в силу экстремально низкой массы тела и уникального способа полета (так называемый hovering flight), влекущих за собой невероятно высокие энергетические потребности организма, выпадают из предложенной выше схемы, и зависимость массы их сердца от массы тела описывается выражением  $M_h = 0,025 \times M_b^{0,95}$  (Bishop, Butler, 1995), в то время как у практически неспособных к полету тинамуобразных относительная масса сердца не достигает даже 0,3% (Altimiras, Giraldo-Deck, Garitano-Zavala, 2013).

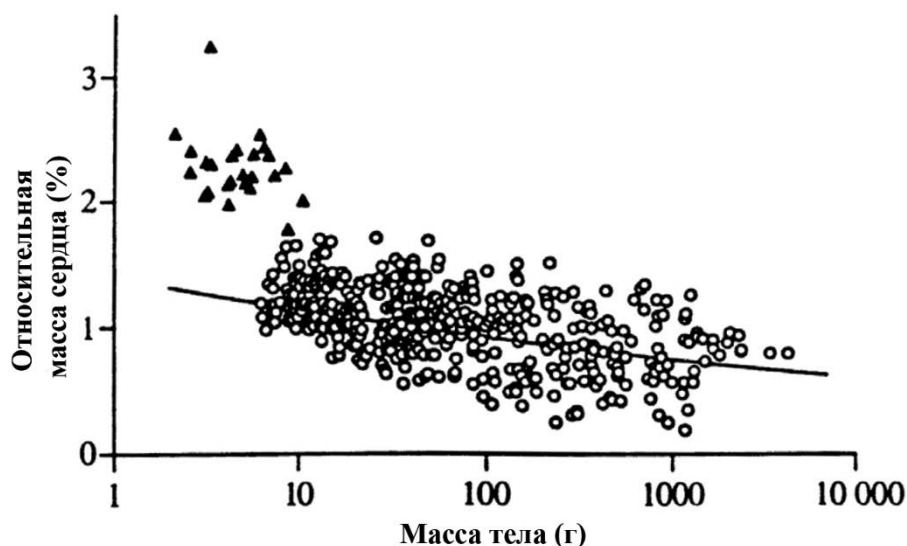


Рис. 4. Зависимость относительной массы сердца птиц от массы их тела. Данные, относящиеся к различным видам колибри, обозначены на графике треугольными символами. По (Bishop, Butler, 1995).

Как было сказано выше, сердце птиц четырехкамерное и состоит из 2 предсердий и 2 желудочков (рис. 5). По своему строению сердце птиц похоже на сердце других представителей группы архозавров, крокодилов – однако, в отличие от крокодилов, сердце птиц характеризуется полным разделением венозной и артериальной крови за счет наличия полной межжелудочковой перегородки, а также редукции второй дуги аорты, выходящей из правого желудочка (Bettex, Pretre, Chassot, 2014; Stephenson, Adams, Vaccarezza, 2017). Камеры сердца птиц аналогичны таковым у млекопитающим: кровь, проходящая через правое предсердие и правый желудочек, попадает в легочный круг кровообращения для насыщения

кислородом, тогда как кровь, проходящая через левую половину сердца, попадает в системный кровоток. В правое предсердие впадают системные (полые) вены: правая и левая верхние полые вены и нижняя полая вена (называемые также левой и правой краниальными и каудальной венами, соответственно); из правого желудочка выходит легочный ствол. В левые предсердие впадают две легочные вены – в отличие от млекопитающих, их число не варьирует между различными видами птиц (Kroneman и др., 2019) – а из левого желудочка выходит аорта, которая у птиц, опять же, в отличие от млекопитающих, ведет свое происхождение от правой системной дуги аорты, тогда как у млекопитающих остается левая системная дуга (Holmes, 1975).

Венозный синус, являющийся у рептилий, включая крокодилов, наиболее дистальным отделом сердца и участвующий в наполнении правого предсердия, в той или иной степени инкорпорирован в предсердия (атриализован) у птиц, как и у млекопитающих (Cook и др., 2017; Jensen и др., 2014). По всей видимости, это связано с высокой частотой сердечных сокращений и потерей роли венозного синуса в наполнении предсердий у теплокровных животных. Тем не менее, у более древних бескилевых птиц (страусы, эму) венозный синус редуцируется не до конца и сохраняется как небольшая камера, в которую впадают полые вены (Jensen и др., 2014; Tajali, Ghazi, Partou, 2009), а у некоторых птиц, по всей видимости, сохраняется синоатриальный клапан (Kroneman и др., 2019).

Предсердия сердца птиц, как и у млекопитающих, представляют собой тонкостенные камеры, растягивающиеся при заполнении кровью. Правое предсердие, как правило, значительно больше левого по размерам – возможно, за счет произошедшей в ходе эволюционного развития инкорпорации венозного синуса. Миокард предсердия организован в толстые пучки, формирующие так называемые гребенчатые мышцы (*musculi pectinati*). В краниальном направлении гребенчатые мышцы сходятся в одну большую мышечную арку, проходящую по краниальной поверхности обоих предсердий справа налево (так называемая поперечная арка, она составляет около 25% массы всего миокарда предсердий). У многих видов птиц нет функциональных клапанов на входе в предсердия, что свидетельствует об их незначительной роли в наполнении желудочков в ходе сердечного цикла (Dzialowski, Crossley, 2015; Kroneman и др., 2019).

Предсердия птиц отделены от желудочков клапанами. Левый предсердно-желудочковый клапан имеет 3 соединительнотканых створки, заякоренных на папиллярных мышцах желудочка и аналогичные по своему строению левому предсердно-желудочковому клапану млекопитающих. Структура же правого предсердно-желудочкового клапана птиц совершенно иная (рис. 5): он представляет собой спиральную мышечную складку, закрывающую отверстие между предсердием и желудочком, имеющее форму полумесяца (Lu и др., 1993a).

Стоит отметить, что клапан сходного строения характерен для крокодилов и однопроходных млекопитающих (Cook и др., 2017; Wade, Neely, 1949). Правый предсердно-желудочковый клапан состоит большей частью из желудочкового миокарда, основание клапана сращено со стенками предсердия и желудочка, свободный край клапана вдается в полость правого желудочка и частично сращен с его внешней стенкой так называемой трапециевидной мышцей. При этом у клапана отсутствуют как сухожильные хорды, так и папиллярные мышцы, на которых клапан мог бы быть закорен – тем не менее, доплерографические исследования показывают отсутствие обратного тока крови через клапан (Prosheva, Kaseva, Dernovoj, 2019).

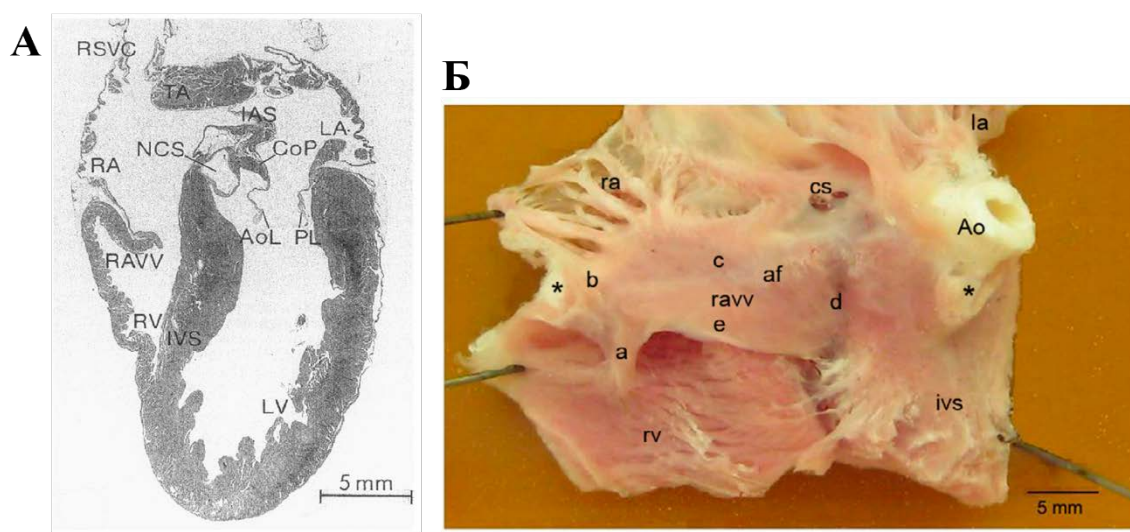


Рис. 5. Анатомические особенности строения сердца птиц. А - фронтальный срез сердца курицы, демонстрирующий строение и взаимное расположение камер сердца птиц. RA – правое предсердие; LA – левое предсердие; RV – правый желудочек; LV – левый желудочек; IAS – межпредсердная перегородка; IVS – межжелудочковая перегородка; TA – поперечная арка; RAVV – правый предсердно-желудочковый клапан; AoL – аортальная створка левого предсердно-желудочкового клапана; PL – задняя створка правого предсердно-желудочкового клапана; RSVc – правая верхняя полая вена; NCS – некоронарный синус аорты. По (Lu и др., 1993a). Б – строение правого предсердно-желудочкового клапана в сердце курицы. RAVV – правый предсердно-желудочковый клапан; AF – фиброзное кольца; Ao – аорта; IVS – межжелудочковая перегородка; RV – правый желудочек; RA – правое предсердие; LA – левое предсердие; CS – коронарный синус. По (Prosheva, Kaseva, Dernovoj, 2019).

Желудочковый миокард птиц имеет более сложную архитектуру по сравнению с предсердным. Как и у млекопитающих, высокий базовый уровень метаболизма птиц предъявляет высокие требования к способности сердца поддерживать высокое давление в кровотоке, поэтому миокард желудочков птиц в значительной мере компактизован. Левый



желудочек сердца птиц значительно больше правого, его стенка в 2-3 раза толще и имеет в 5 раз большую степень компактизации по сравнению с миокардом правого желудочка – для сравнения, у млекопитающих разница в степени компактизации между желудочками сердца всего лишь трехкратная (Sedmera и др., 2000). Кроме того, полость левого желудочка имеет меньший радиус кривизны по сравнению с правым. В совокупности, эти особенности структуры позволяют левому желудочку создавать более высокое давление в системном круге кровообращения, избегая чрезмерного напряжения стенки желудочка. Правая стенка левого желудочка формирует межжелудочковую перегородку. Свободная стенка правого желудочка значительно тоньше, она оборачивается вокруг правой стенки левого желудочка, формируя полость в форме полумесяца, не достигающую до верхушки сердца (Dzialowski, Crossley, 2015).

Клапаны на выходе из правого и левого желудочка в, соответственно, легочный ствол и аорту, имеют по 3 полулунных створки. Створки обоих клапанов закорены с помощью соединительнотканых комиссур (Kroneman и др., 2019). Створки аортального клапана более жесткие и объединены соединительнотканым кольцом, лежащим внутри кольца из миокардиальных клеток, которое также в районе коронарной створки аортального клапана соединено мышечной аркой с одной из створок левого предсердно-желудочкового клапана. Значение данной анатомической структуры пока неясно. Теоретически, подобный сфинктероподобный механизм при сжатии кольца может регулировать отток крови из левого желудочка или же участвовать в закрытии жестких створок аортального клапана – однако, выяснение его точной роли требует дальнейших исследований (Lu и др., 1993a).

#### *2.4.1.2. Коронарная система сердца птиц*

Необходимая для снабжения миокарда кислородом и питательными веществами кровь поступает по коронарным артериям (рис. 6). От основания аорты выше аортального клапана отходят правый вентральный и левый синусы аорты. У некоторых птиц число входов в коронарную систему кровообращения может варьировать (от 2 до 4).

Правый вентральный синус ведет в правую венечную артерию, левый – в левую венечную артерию. При дальнейшем ветвлении часть коронарных артерий проходит по поверхности сердца, тогда как большинство сосудов уходит в толщу миокарда желудочков, снабжая нижележащие слои клеток. У большинства видов птиц доминантной является правая венечная артерия с отходящими от нее сосудами, однако возможны варианты с доминированием левой венечной артерии и ее ответвлений или же равным развитием правой и левой венечных артерий. Венозная кровь из миокарда собирается 5 группами коронарных вен и возвращается через коронарный синус в правое предсердие. Мелкие коронарные вены могут впадать непосредственно в правое предсердие или правый желудочек (Dzialowski, Crossley, 2015; West, Langille, Jones, 1981).

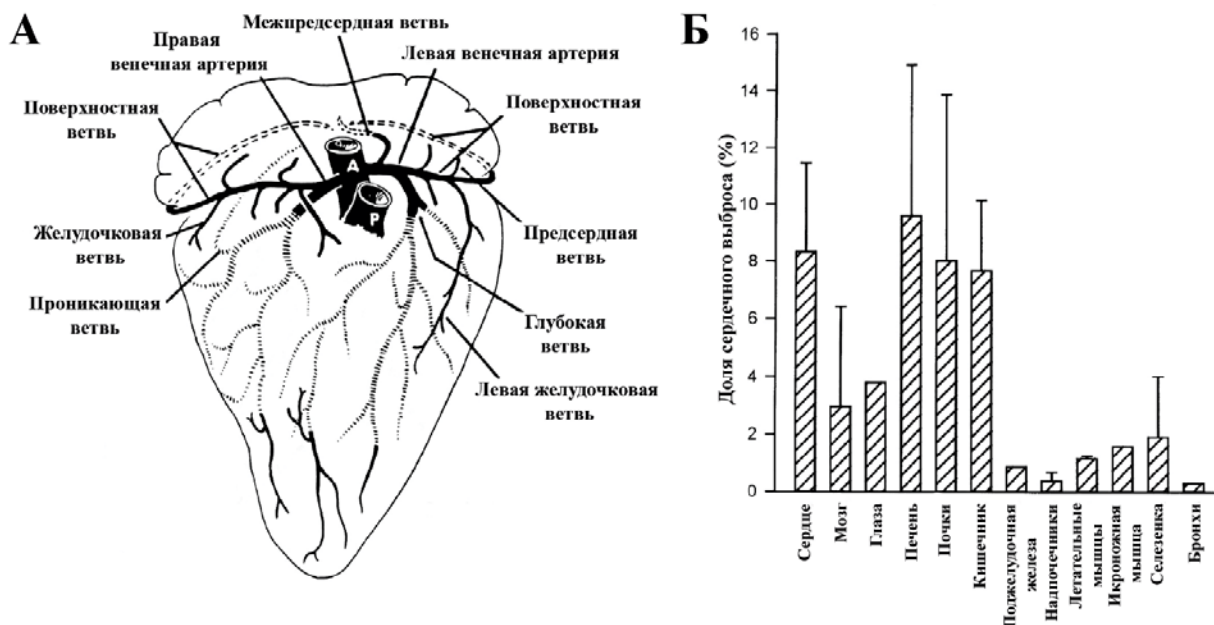


Рис. 6. А – расположение коронарных сосудов в сердце курицы. Сплошные линии обозначают расположенные на поверхности сердца части артерий; прерывистые линии отражают коронарные артерии в толще миокарда. По (West, Langille, Jones, 1981). Б – распределение кровоснабжения различных органов птицы в процентах от сердечного выброса. По (Dzialowski, Crossley, 2015).

Сердце птиц перфузируется кровью весьма интенсивно по сравнению с прочими органами (рис. 6); в покое сердечная мышца снабжается кровью сильнее, чем скелетная мускулатура (Johansen, 1964; Jones и др., 1979). При физических нагрузках кровоснабжение желудочков сердца птиц может возрасти вдвое (Ellerby и др., 2005). По всей видимости, кровоток в коронарных сосудах птиц, как и у млекопитающих, имеет место быть главным образом во время диастолы – таким образом, при увеличении диастолического интервала при условии сохранения артериального давления на прежнем уровне кровоснабжение миокарда должно усиливаться (Dzialowski, Crossley, 2015).

#### 2.4.1.3. Ультраструктура миокарда птиц

С гистологической точки зрения предсердия и желудочки птиц устроены весьма сходно, не считая значительно большей толщины стенки желудочков. Стенка камер сердца птиц, как и у млекопитающих, состоит из 3 слоев. Внешний слой, эпикард, и внутренний, эндокард, состоят из рыхлой соединительной ткани и эластиновых волокон, ограниченных слоем плоского эпителия или эндотелия, соответственно. Между эпикардом и эндокардом располагается собственно миокард, сформированный поперечно исчерченными мышечными волокнами. Межпредсердная и межжелудочковая перегородки обладают двумя слоями эндокарда, обращенными в сторону соответствующих сердечных камер и разделенными слоем миокарда (Dzialowski, Crossley, 2015).

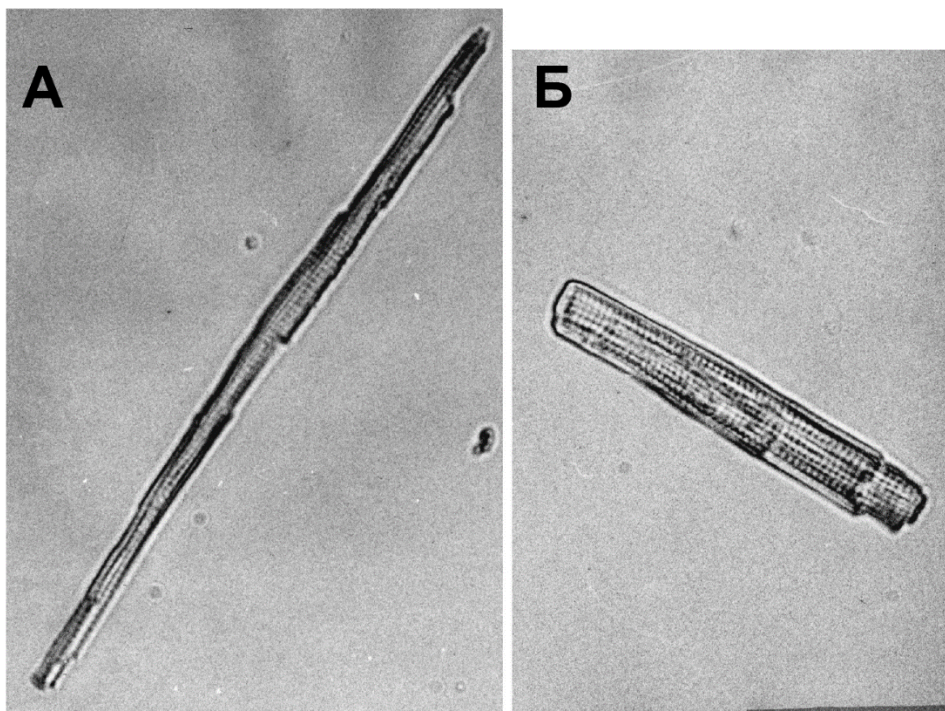


Рис. 7. Репрезентативные микрофотографии изолированных желудочковых кардиомиоцитов зяблика (А) и крысы (Б) (Bogdanov и др., 1995).

Несмотря на значительные анатомические сходства между сердцами птиц и млекопитающих, ультраструктура миокарда у этих групп животных кардинально различается. Строго говоря, морфология и ультраструктура кардиомиоцитов млекопитающих уникальны среди позвоночных, тогда как кардиомиоциты птиц в значительной степени – по крайней мере, в первом приближении – напоминают кардиомиоциты рептилий (Hirakow, 1970). Кардиомиоциты птиц представляют собой сильно вытянутые клетки веретеновидной формы с выраженной поперечной исчерченностью (рис. 7). Диаметр кардиомиоцитов птиц составляет в зависимости от вида и возраста от 3 до 10 мкм, длина – порядка 150-200 мкм; таким образом, диаметр кардиомиоцитов птиц оказывается гораздо меньше, чем у млекопитающих (Hirakow, 1970; Kim и др., 2000; Perni, Iyer, Franzini-Armstrong, 2012; Sommer, Johnson, 1969).

Несмотря на присутствующие противоречия в ранних работах относительно ультраструктуры сердечных миоцитов птиц, общепринятой является точка зрения, согласно которой, несмотря на высокие сердечный ритм и сократимость сердца птиц, в их кардиомиоцитах отсутствуют поперечные (Т-) трубочки, характерные для миокардиальных клеток млекопитающих и обеспечивающие быстроту электромеханического сопряжения в их сердце. Структура саркомеров в кардиомиоцитах птиц не отличается от таковой у млекопитающих, за исключением отсутствия М-полос, объединяющих миозиновые филаменты; влияние этой ультраструктурной особенности на сократительную функцию

миокарда птиц неясно (Bossen, Sommer, Waugh, 1978; Dzialowski, Crossley, 2015; Hirakow, 1970; Sommer и др., 1991).

#### 2.4.1.4. Электромеханическое сопряжение и структура СПР в сердце птиц

Электромеханическое сопряжение в миокарде птиц, как и в прочих поперечнополосатых мышцах позвоночных, включает подъем уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме клетки в ответ на электрическое возбуждение, связывание  $\text{Ca}^{2+}$  тропонином с последующим изменением конформации последнего и освобождением сайтов взаимодействия актина с миозином (Bers, 2001). Как и у млекопитающих, источником  $\text{Ca}^{2+}$  для сокращений миокарда птиц является не только внеклеточная среда, но и саркоплазматический ретикулум, являющийся основным депо  $\text{Ca}^{2+}$  в миокарде. Выход  $\text{Ca}^{2+}$  из СПР является  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым и происходит в ответ на связывание  $\text{Ca}^{2+}$  рианодиновыми рецепторами на мембране СПР (Fabiato, 1983; Shiels, Galli, 2014). В миокарде млекопитающих выход  $\text{Ca}^{2+}$  происходит в трех типах цистерн СПР: на периферии, в местах взаимодействия СПР с сарколеммой, в диадах – местах взаимодействия СПР с Т-трубочками, – и в так называемом «корбулярном СПР», богатом рианодиновыми рецепторами, но не взаимодействующим ни с сарколеммой, ни с Т-трубочками, причем ввиду большого диаметра кардиомиоцитов млекопитающих взаимодействие Т-трубочек с цистернами СПР приобретает особенно большое значение (Forbes, Mock, Niel Van, 1990; Loughrey, Smith, MacEachern, 2004; Richards и др., 2011; Snelling и др., 2015). В миокарде птиц и холоднокровных позвоночных, однако, ввиду отсутствия системы поперечных трубочек, кальцийзависимый выход  $\text{Ca}^{2+}$  из СПР происходит только в периферических цистернах и в корбулярном СПР. При этом миокарде птиц особенно богат корбулярными цистернами СПР по сравнению с миокардом прочих позвоночных (Perni, Iyer, Franzini-Armstrong, 2012). Однако, в то время как у холоднокровных позвоночных инициация выброса  $\text{Ca}^{2+}$  из СПР происходит в первую очередь на периферии миоцитов, у птиц, по всей видимости, за счет особенностей расположения рианодиновых рецепторов на СПР, имеет место быть взаимодействие между периферическим и корбулярным СПР (Perni, Iyer, Franzini-Armstrong, 2012; Sheard и др., 2019). Это обеспечивает птицам более синхронную активацию рианодиновых рецепторов на мембране СПР, быстрый запуск сокращения и, следовательно, более высокую частоту сердечного ритма (рис. 8).

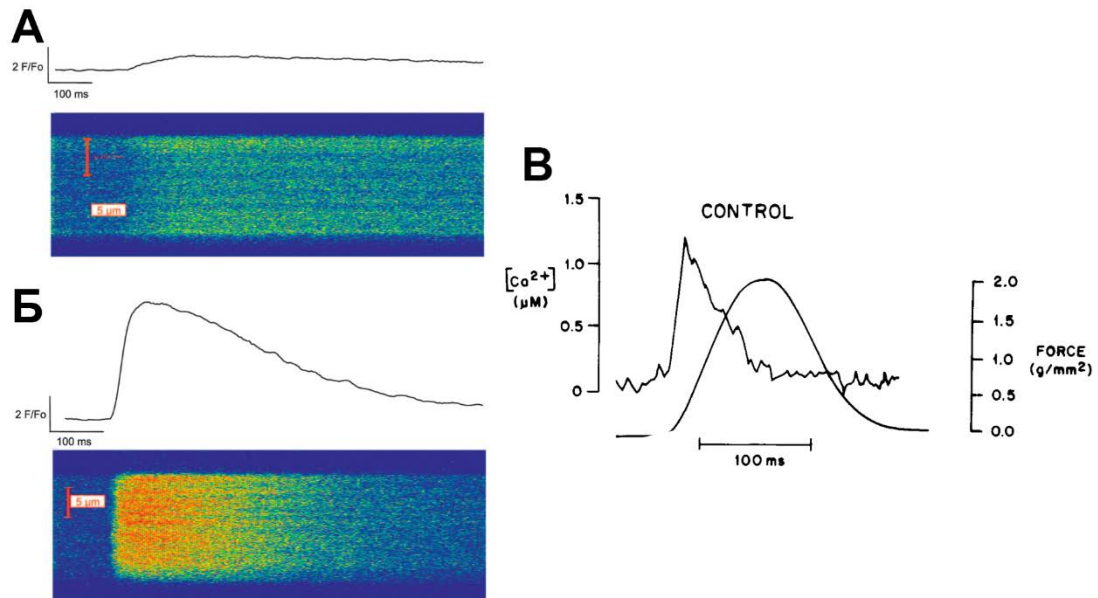


Рис. 8. Кальциевые транзиенты, полученные методом кальциевого имиджинга в изолированных кардиомиоцитах форели (А), крысы (Б) и курицы (В). По (Creazzo, Burch, Godt, 2004; Shiels, White, 2005).

#### 2.4.1.5. Проводящая система сердца птиц

Высокая частота сокращений сердца птиц требует быстрого распространения волны возбуждения по всему сердцу. Это, в свою очередь, требует наличия хорошо развитой проводящей системы сердца (рис. 9). У холоднокровных позвоночных она практически неразвита и представлена только пейсмекерными клетками в венозном синусе (синусный узел) и эволюционно консервативным медленным участком проведения между предсердным и желудочковым миокардом (при этом атриовентрикулярный участок не изолирован соединительной тканью). Желудочковый миокард в ходе сердечного цикла активируется в направлении от основания к верхушке; сходный паттерн активации характерен для сердец эмбрионов млекопитающих и птиц с неразвитой проводящей системой (Burggren, Farrell, Lillywhite, 2011; Jensen и др., 2012; Moorman, Christoffels, 2003; Poss, 2010). Однако, у взрослых птиц и млекопитающих паттерн активации желудочков меняется, и активация внешних стенок желудочков происходит в направлении от верхушки к основанию сердца, что свидетельствует о развитии проводящей системе желудочков Гиса-Пуркинье (пучок Гиса, ножки пучка Гиса и волокна Пуркинье) (Sedmera и др., 2005; Sedmera, 2011).

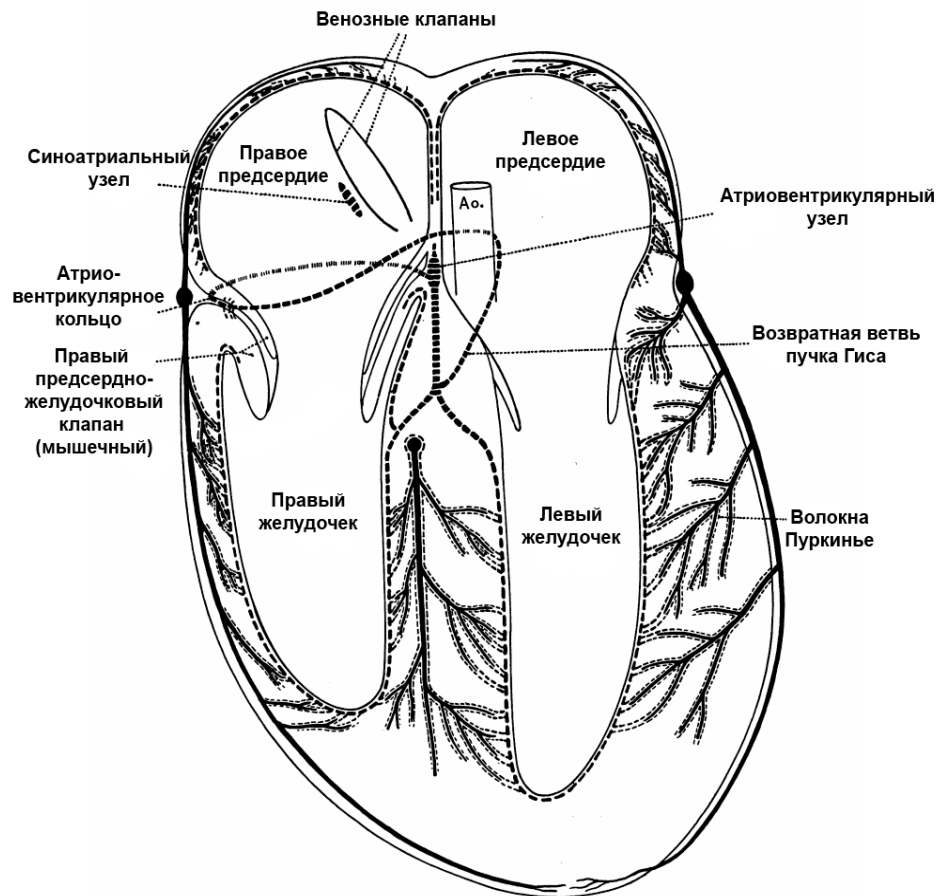


Рис. 9. Проводящая система сердца птиц. По (Davies, 1930).

Возбуждение в сердце птиц генерируется в синоатриальном узле, расположенном в правом предсердии в области мест вхождения полых вен, положение водителя ритма в пределах ткани узла может меняться (Hill, Goldberg, 1980; Kroneman и др., 2019). Наличие оформленного атриоventрикулярного узла в сердце птиц в течение долгого времени являлось спорным вопросом: часть морфологических и гистологических изысканий говорят об отсутствии выраженного атриоventрикулярного узла в сердце птиц (Murakami, Saito, Mochizuki, 1985; Szabó, Virágh, Challice, 1986; Truex, Smythe, 1965), большинство исследователей свидетельствуют о его наличии и объясняют расхождения значительной межвидовой вариативностью расположения и структуры узла (Kim, Yasuda, 1979; Lu и др., 1993b; Mathur, Shrivastava, 1979; Moore, 1965; Parto, 2012). Наличие специализированного пути проведения возбуждения из суправентрикулярной области сердца в желудочки обеспечивает птицам (как и млекопитающим) в 4 раза более короткую атриоventрикулярную задержку по сравнению с таковой у рептилий – и, соответственно, позволяет развивать более высокую частоту сердечных сокращений (Boukens и др., 2019). У птиц есть атриоventрикулярное кольцо, сформированное одной из ножек пучка Гиса (так называемой возвратной ветвью). Атриоventрикулярное кольцо огибает правое атриоventрикулярное отверстие и основание ствола аорты, проходя через правый предсердно-желудочковый клапан. У разных групп птиц

эта вспомогательная часть атриовентрикулярной проводящей системы может быть развита в различной степени, у некоторых видов атриовентрикулярное кольцо не замыкается (Murakami, Saito, Mochizuki, 1985; Szabó, Virágh, Challice, 1986). Функция атриовентрикулярного кольца в сердце птиц неясна, однако, некоторые исследователи предполагают, что он может выполнять роль атриовентрикулярного узла, обеспечивая задержку проведения возбуждения между предсердиями и желудочками (Prosheva и др., 2015). Пучок Гиса относительно длинный. Две оставшиеся ножки пучка Гиса идут и разветвляются внутри межжелудочковой перегородки. Распространение электрического возбуждения в толще желудочкового миокарда обеспечивается наличием специализированных клеток миокарда – волокон Пуркинье (Kim, Yasuda, 1979; Murakami, Saito, Mochizuki, 1985; Szabó, Virágh, Challice, 1986). Стоит отметить, что волокна Пуркинье также обнаружены в предсердном миокарде птиц, но их роль также не вполне ясна (Bogusch, 1974). С одной стороны, волокна в предсердиях организованы так, чтобы преимущественно проводить волну возбуждения к атриовентрикулярному узлу (Davies, 1930; Hill, Goldberg, 1980). С другой стороны, волокна Пуркинье в предсердиях расположены диффузно, и могут представлять собой рудиментарный остаток, участвовавший когда-то в формировании проводящей системы сердца (Sommer, 1983).

В проводящей системе сердца птиц выделяют три (некоторые исследователи – четыре) типа клеток. Пейсмекерные (или Р-) клетки обнаруживаются в синоатриальном и атриовентрикулярном узлах и участвуют в ритмической генерации электрического возбуждения, выполняя таким образом функцию водителя ритма. Р-клетки небольшие, округлой формы, с относительно большим ядром и малым количеством миофибрилл. Р-клетки электрически связаны только с такими же Р-клетками или с переходными (или так называемыми Т-) клетками, но не с рабочими кардиомиоцитами. Т-клетки также имеют небольшие размеры по сравнению с рабочими клетками миокарда, более вытянутые по сравнению с Р-клетками, содержат больше миофибрилл и обеспечивают передачу электрического возбуждения от пейсмекерных клеток к рабочим. Ни Р-, ни Т-клетки не содержат секреторных гранул. Волокна Пуркинье обнаруживаются в составе пучка Гиса и его ножек, а также в сети Пуркинье. Волокна Пуркинье относительно крупные, содержат мало миофибрилл. Размер волокон Пуркинье градуально увеличивается по мере продвижения от ножек пучка Гиса к более дистальным частям проводящей системы; в толще желудочкового миокарда они расположены вблизи коронарных артерий и параллельно им. Некоторые исследователи также выделяют четвертый тип клеток в проводящей системе сердца птиц – Пуркинье-подобные клетки (Purkinje-like cells), встречающиеся в атриовентрикулярном узле и атриовентрикулярном кольце сердца птиц. Морфологически они напоминают волокна Пуркинье, однако имеют меньший размер. Пуркинье-подобные клетки могут быть

электрически связаны с Т-клетками (Davies, 1930; Hill, Goldberg, 1980; Lu и др., 1993b). Как и у млекопитающих, клетки проводящей системы сердца птиц характеризуются особым паттерном экспрессии коннексинов, формирующих электрические контакты между кардиомиоцитами. В частности, в качестве маркера проводящей системы сердца птиц указывают коннексин с молекулярной массой 42 кДа (Cx42), динамика экспрессии которого в ходе онтогенеза коррелирует с формированием зрелой проводящей системы (Gourdie и др., 1993).

## **2.5. Особенности физиологии сердца птиц**

### **2.5.1. Параметры работы и производительность сердца птиц**

Несмотря на то, что в среднем относительная масса сердца птиц превышает таковую у млекопитающих и, тем более, у холоднокровных позвоночных, производительность сердца птиц и его способность обеспечивать ткани организма кислородом разнятся в пределах данного класса животных в зависимости от размеров тела и образа жизни. Производительность сердца, а именно его способность создавать давление в циркуляторном русле и прокачивать объем крови, наиболее явно определяются его размерами и структурой (например, наличием или отсутствием развитой проводящей системы), которые в свою очередь определяют ударный объем сердца и частоту его сокращений, слагающие сердечный выброс (Young и др., 2002). Как уже упоминалось выше, масса сердца птиц аллометрически изменяется вместе с размерами животных; для птиц масса сердца пропорциональна массе тела в степени 0,91 (Bishop, Butler, 1995; Bishop, 1997; Brush, 1966); относительная масса сердца птиц имеет тенденцию снижаться по мере увеличения размеров тела – однако, по поводу математического выражения этой зависимости нет единого ответа.

При этом, возможности сердца должны соответствовать энергетическим запросам организма животного, и, в частности, покрывать потребление кислорода во время активного полета. Потребление кислорода ( $V_{O_2}$ ) птицами при полете пропорционально массе тела в степени от 0,73 до 0,87, по различным оценкам (Bishop, Butler, 1995; Butler, 1991), максимальное потребление кислорода пропорционально массе тела в степени 0,88 (Bishop, 1999); а ограничивается данный параметр, согласно уравнению Фика, сердечным выбросом, кислородной емкостью крови и способностью тканей экстрагировать  $O_2$  из крови (ур. 1):

$$V_{O_2} = f_h \times V_s \times (C_{aO_2} - C_{vO_2}) \quad (1)$$

где  $f_h$  – частота сердечных сокращений,  $V_s$  – ударный объем сердца,  $C_{aO_2}$  и  $C_{vO_2}$  – концентрация  $O_2$  в артериальной и венозной крови, соответственно (Fick, 1870).

Помимо собственно максимального  $V_{O_2}$  производительность сердца можно оценивать по соотношению  $V_{O_{2max}}$  и  $V_{O_2}$  в покое (или базового уровня метаболизма) – данный безразмерный



параметр (т.н. аэробная производительность или aerobic scope) характеризует диапазон возможной нагрузки сердечно-сосудистой системы (Lasiewski, Dawson, 1967). В чистом виде данное соотношение практически не зависит размеров животных (рис. 10, А). Однако, Bishop в своем исследовании утверждает, что если нормировать данное соотношение по относительной массе сердца и концентрации гемоглобина в крови животного, чтобы исключить второстепенные факторы и оценивать исключительно способности сердечно-сосудистой системы, выявляется сильная зависимость так называемой стандартизованной аэробной производительности ( $AS_{st}$ ) от размеров и массы тела животного (рис. 10, Б); расчеты показывают, что  $AS_{st}$  пропорциональна массе тела в степени 0,15 (Bishop, 1999) – то есть, птицы и млекопитающих крупных размеров имеют более широкий диапазон производительности сердечно-сосудистой системы по сравнению с более мелкими животными. На первый взгляд данное утверждение противоречит с имеющимися данными о крайне высокой удельной интенсивности метаболизма и высокой относительной массе сердец мелких птиц – например, колибри (Bishop, Butler, 1995; Suarez, 1992). Однако, эксперименты с дополнительной нагрузкой показали, что колибри практически достигают максимальных значений  $Vo_2$  уже в полете без нагрузки, тогда как с дополнительным грузом время полета сокращается до нескольких секунд (Chai, Dudley, 1996; Wells, 1993), а их митохондрии даже в состоянии покоя функционируют с наибольшей известной среди позвоночных масс-специфичной интенсивностью (Suarez и др., 1991; Suarez, 1992).

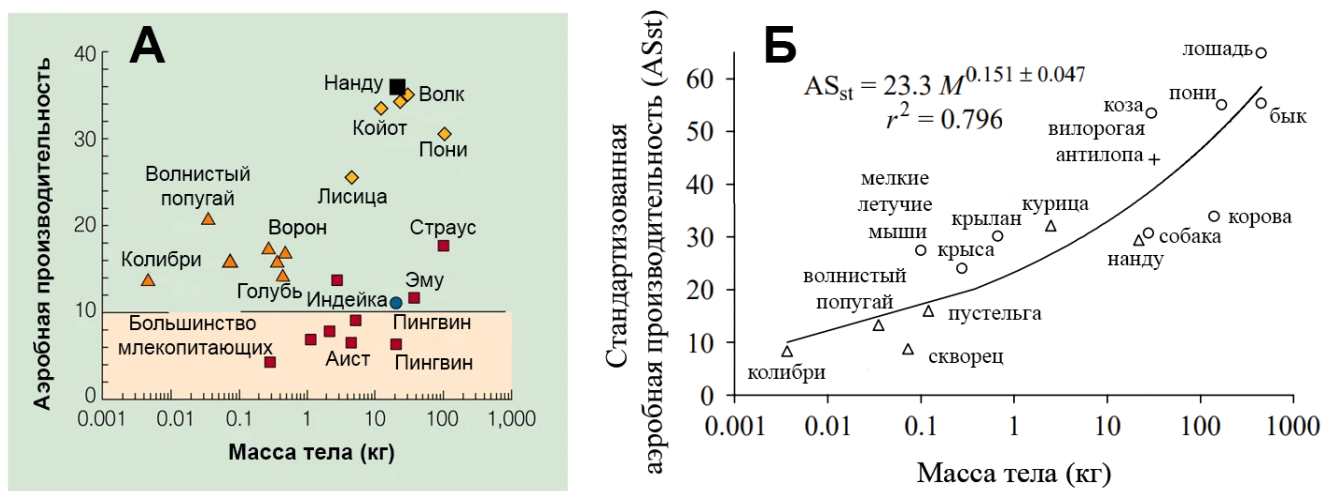


Рис. 10. А – зависимость аэробной производительности различных видов млекопитающих и птиц от массы тела. Летящие птиц обозначены треугольными символами, ходящие и бегающие птицы – квадратными, бегающие млекопитающие – ромбами. По (Bundel и др., 1999). Б – зависимость стандартизованной аэробной производительности различных видов млекопитающих (круглые символы) и птиц (треугольные символы) от массы тела. По (Bishop, 1999).

Таким образом, несмотря на то, что по сравнению с другими классами позвоночных животных птицы обычно характеризуются большей относительной массой сердца (Hartman, 1955), более высоким сердечным выбросом (Grubb, 1983; Spector, 1956) и более высокой интенсивностью метаболизма (Clarke, Pörtner, 2010), их стандартизованная аэробная производительность и ее зависимость от размеров тела не отличаются от таковых у млекопитающих.

С другой стороны, сравнение аэробной производительности птиц и млекопитающих без нормирования данного параметра демонстрирует, что аэробная производительность птиц уступает лишь таковой у активно бегающих млекопитающих – таких, как копытные или псовые. Для полета требуется как минимум 15-кратное увеличение интенсивности метаболизма и поглощения кислорода по сравнению с базовым уровнем, в то время как у большинства млекопитающих данное соотношение не превышает 10 (Bundle и др., 1999; Ellington, 1991; Seeherman и др., 1981). Менее активные птицы, не способные или практически не способные к полету, – такие, как пингвины или домашние курицы, – способны при физической нагрузке достигать увеличения аэробного метаболизма наравне с большинством млекопитающих (Brackenbury, el-Sayed, 1985; Kooyman, Ponganis, 1994). В то же время вторично потерявшие способность к полету, но при этом активно бегающие нанду, относящиеся к бескилевым птицам, имеют высокую относительную массу сердца и демонстрируют весьма высокие показатели аэробной производительности наравне с активно бегающими млекопитающими (Bundle и др., 1999). Таким образом, способность птиц к полету коррелирует с наличием высокопроизводительного сердца, способного работать при широком диапазоне нагрузок. В то же время, сердечно-сосудистая система нелетающих птиц может быть не менее эффективна.

#### *2.5.1.1. Частота сокращения и ударный объем сердца птиц*

Ударный объем сердца напрямую зависит от его размеров и аллометрически меняется вместе с изменениями размера тела и сердца животного. Большая относительная масса сердца обеспечивает птицам, как способным к полету, так и нелетающим, больший ударный объем в пересчете на массу тела по сравнению с млекопитающими; однако, ударный объем в пересчете на массу сердца между этими группами не различается (Grubb, Jorgensen, Conner, 1983; Grubb, 1982).

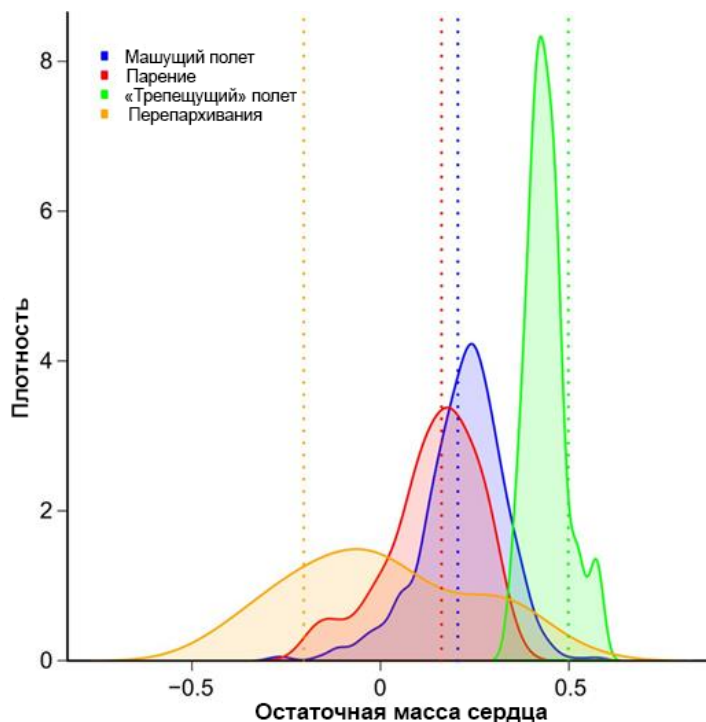


Рис. 11. Оценка плотности характерных значений остатков массы сердца (после проведения регрессионного анализа) для птиц с различными типами полета. По (Nespolo и др., 2018).

Большой ударный объем является критичным для птиц, передвигающихся с помощью активного полета. Так, многостороннее исследование Altimiras и др. показало, что в случае птиц семейства тинаму, способных к кратковременным перепархиваниям, но не способных полноценно передвигаться с помощью активного машущего полета, ограничивающим фактором является именно производительность сердечно-сосудистой системы. Все виды птиц, относящиеся к семейству тинаму, обладают крайне малой относительной массой сердца – всего лишь около 0,3%, что в несколько раз меньше, чем относительная масса сердца у плохо летающих курообразных птиц – 0,81% (Bishop, 1997). При том, что курообразные и тинаму имеют сходную относительную массу летательных мышц (Magnan, 1922), тинаму имеют меньший ударный объем сердца и, соответственно, сердечный выброс, а также характеризуются более интенсивным накоплением лактата при физических нагрузках и избыточным поглощением кислорода после их окончания. При этом частота сокращения сердца тинаму не была снижена по сравнению с другими птицами сходных размеров – то есть, лимитирующим фактором, ограничивающим сердечный выброс, оказался недостаточный ударный объем сердца (Altimiras и др., 2017). Более того, разные по энергозатратности виды полета предъявляют разные требования к производительности сердечно-сосудистой системы, что так же находит в различиях в относительной массе сердца (Nespolo и др., 2018) и, соответственно, сердечном выбросе (рис. 11).

Частота сокращений сердца птиц, как и ударный объем, хотя и в меньшей степени, зависит от размеров тела и размеров сердца птиц: у более мелких животных выше энергетические потребности в пересчете на единицу массы тела (Speakman, 2005), а сердце имеет меньший абсолютный размер, поэтому сердечный цикл, включающий процессы электрической активации и сокращения миокарда, объективно занимает меньше времени. При сравнении с млекопитающими частота сердечных сокращений у птиц оказывается не выше, а в некоторых случаях ниже, чем у млекопитающих сходных размеров (рис. 12). По расчетам, частота сердечных сокращений птиц  $f_h$  зависит от массы тела  $M_b$  приблизительно как  $f_h = 488 \times M_b^{-0,187}$ , тогда как для млекопитающих данная зависимость выражается как  $f_h = 477 \times M_b^{-0,163}$  (Bishop, 1997).

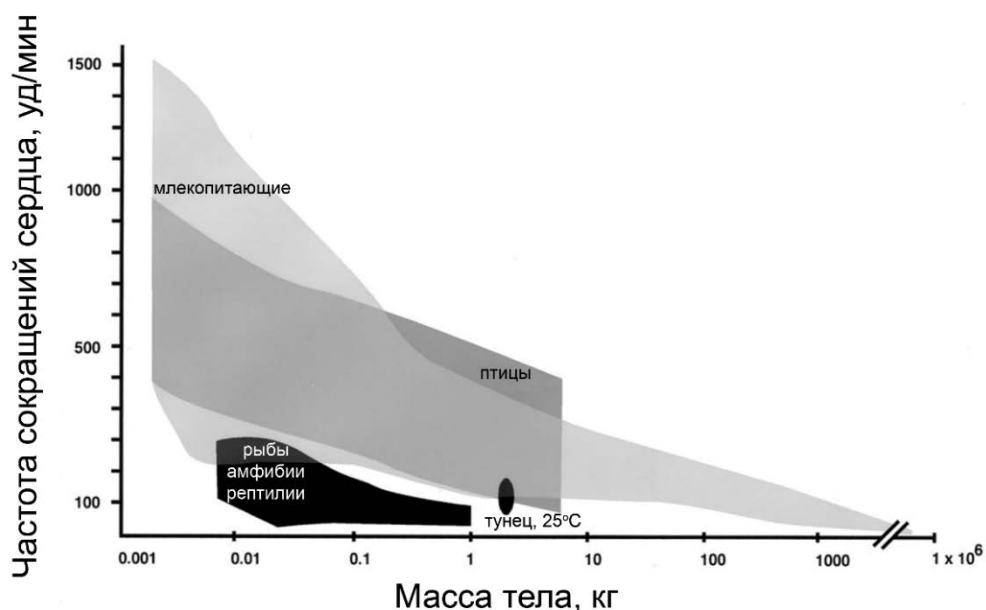


Рис. 12. Пределы вариативности частоты сердечных сокращений в различных группах позвоночных в зависимости от массы тела животного. По (Lillywhite, Zippel, Farrell, 1999).

При этом, несмотря на эволюционную близость птиц к другим представителям группы архозавров, крокодилам, частота сокращений сердце птиц неизменно оказывается значительно выше, даже в случае птиц с наименее производительным сердцем – например, тинаму (Altimiras и др., 2017). Различия сохраняются, даже при искусственном устранении разницы в температуре тела, что свидетельствует о значительных анатомических различиях, и, несмотря на появление зачатков проводящей системы желудочков в сердце крокодилов, проводящая система сердца птиц более совершенна и позволяет достигать гораздо более высоких значений частоты сокращений (Boukens и др., 2019; Jensen и др., 2018).

Общий сердечный выброс у птиц, таким образом, зависит от размеров тела и определяется следующим соотношением:  $CO = 307 \times M_b^{0,69}$  (Seymour, Blaylock, 2000). Для млекопитающих

была выведена аналогичная зависимость:  $CO = 166 \times M_b^{0,79}$  (Holt, Rhode, Kines, 1968) – таким образом, при равной массе тела сердечный выброс у птиц оказывается выше, чем у млекопитающих.

При необходимости увеличения поглощения кислорода организмом и, следовательно, сердечного выброса, у птиц – как и у млекопитающих (Baudinette, Seymour, Orbach, 1978; Evans, Rose, 1988) – в наибольшей степени изменяется именно частота сердечных сокращений, как у летающих, так и у не способных к полету видов. Так, при беге у эму наблюдается приблизительно четырехкратное увеличение частоты сердечных сокращений (Grubb, Jorgensen, Conner, 1983), у голубей в полете наблюдается увеличение частоты сокращений сердца в 5,8 раз (Butler, West, Jones, 1977), а у белошеких казарок – до 7,24 раз (Butler, Woakes, 1980). Стоит отметить, что несмотря на то, что бег как способ передвижения также, как и полет, предъявляет серьезные требования к функциональности сердечно-сосудистой системы, для большинства птиц полет является более энергоемкой активностью: сравнение поглощения кислорода и частоты сердечных сокращений нескольких видов птиц при перемещении по беговой дорожке и полете в аэротрубе показывает, что, во время полета не только увеличиваются оба этих параметра, но их зависимость приобретает иной характер: при равном увеличении частоты сокращений сердца, прирост поглощения кислорода при полете оказывается больше (Ward и др., 2002).

Данные относительно способности птиц изменять под нагрузкой ударный объем сердца разнятся в зависимости от использованной в работе экспериментальной модели и конкретного вида птиц. Так, описанное изменение зависимости поглощения кислорода от частоты сердечных сокращений при полете по сравнению с ходьбой, весьма вероятно обусловлено увеличением ударного объема сердца (Butler, Woakes, Bishop, 1998; Ward и др., 2002). Исходя из совокупности данных, полученных в нескольких исследованиях, Bishop предположил, что в покое ударный объем должен зависеть от массы сердца птицы как  $0,18 \times M_h^{1,05}$ , а во время полета – как  $0,3 \times M_h^{1,05}$  (Bishop, 1997). С другой стороны, в различных исследованиях, проведенных на голубях, было показано, что при перемещении по беговой дорожке их ударный объем возрастает приблизительно на 40% (Grubb, 1982), тогда как в другой работе при полете в аэротрубе голуби демонстрировали весьма незначительные изменения ударного объема сердца (Butler, West, Jones, 1977). Эму при беге заметно увеличивают ударный объем сердца, однако эти изменения были менее выражены, чем для частоты сердечных сокращений (Grubb, Jorgensen, Conner, 1983). В то же время, у уток при физической нагрузке на беговой дорожке ударный объем сердца вовсе не изменялся (Bech, Nomoto, 1982; Grubb, 1982). По всей видимости, способность птиц увеличивать сердечный выброс за счет увеличения ударного

объема сердца зависит от вида нагрузки, образа жизни и систематического положения животного. Данный вопрос требует более детального дальнейшего изучения.

#### 2.5.1.2. Давление в системном и легочном круге кровообращения у птиц

Несмотря на то, что давление в тех или иных участках кровеносной системы определяется целым рядом факторов, от тонуса стенки сосуда и объема циркулирующей в сосудистом русле крови до архитектуры сосудистой сети и собственно свойств крови, в значительной степени данный параметр также определяется работой сердца. В частности, именно появление четырехкамерного сердца в эволюционных рядах птиц и млекопитающих позволило полностью разделить круги кровообращения и создать систему высокого давления в большом круге, снизив давление в малом круге кровообращения и предотвратив повреждение легких из-за избыточной фильтрации жидкости в легочных капиллярах. В ряду позвоночных, при переходе от пойкилотермии к гомойотермии наблюдается тенденция к увеличению артериального давления в системном кровообращении, при этом для птиц, как правило, характерны наиболее высокие значения данного параметра среди позвоночных животных (рис. 13). Более высокие значения артериального давления позволяют более интенсивно перфузировать ткани организма, снабжая их кислородом и обеспечивая высокую интенсивность метаболизма, – у птиц и млекопитающих артериальное давление в среднем примерно в 5,2 раза выше по сравнению с пойкилотермными представителями позвоночных (Burggren, Farrell, Lillywhite, 1997; Smith, 1994). Ранее были предприняты попытки систематизировать и усреднить данные об артериальном давлении в организме птиц (Altman, Dittmer, 1971; Sturkie, 1986), однако, из-за различий в методиках регистрации артериального давления и состоянии животных в ходе эксперимента сложно проводить какие-либо правомерные обобщения имеющихся данных.

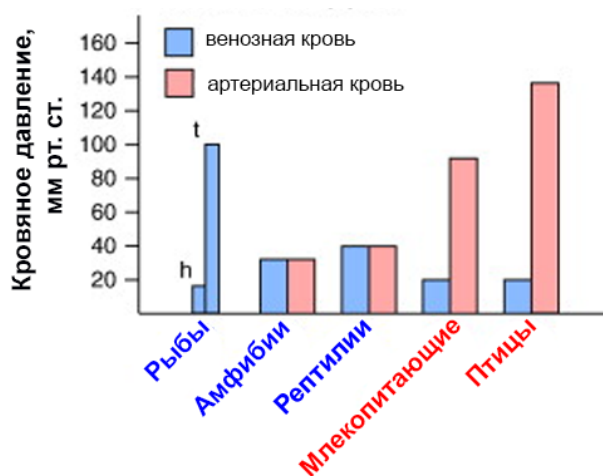


Рис. 13. Усредненное системное давление в различных классах позвоночных животных. По (Jensen и др., 2013а).

Нет оснований считать, что артериальное давление каким-либо образом зависит от массы и размеров тела животного. Тем не менее, некоторые исследователи предлагают математическое выражение корреляции между артериальным давлением и массой тела животных. Согласно этим расчетам, для птиц систолическое давление  $P_S$  и диастолическое давление  $P_D$  зависят от массы тела следующим образом:  $P_S = 158,8 \times M_b^{0,02}$ ;  $P_D = 122,9 \times M_b^{0,003}$  (для млекопитающих, соответственно,  $P_S = 115,2 \times M_b^{0,05}$ ;  $P_D = 78,7 \times M_b^{0,05}$ ) – однако, поскольку показатель степени  $M_b$  близок к 0, данная зависимость, если и имеет место быть, крайне слаба (Seymour, Vlaylock, 2000). В соответствии с законом Лапласа напряжение стенки сердца (более конкретно – желудочков) прямо пропорционально давлению крови и радиусу сердечной камеры (в некотором приближении для расчетов сердце можно считать шаром) (Woods, 1892); у птиц оно в среднем несколько выше, чем у млекопитающих: 15,5 кПа против 13,9 кПа. Несмотря на то, что размер сердца аллометрически зависит от размеров тела животного, напряжение стенки левого желудочка ( $\sigma$ ) практически не меняется: для птиц оно зависит от массы тела как  $\sigma = 14,2 \times M_b^{0,03}$ , для млекопитающих  $\sigma = 11,4 \times M_b^{0,04}$  (Seymour, Vlaylock, 2000).

Стоит отметить, что даже у наименее физически активных представителей класса птиц с минимальной относительной массой сердца (например, тинаму) артериальное давление в системном круге также поддерживается на относительно высоком уровне за счет тех или иных адаптаций – таких как высокая частота сердечных сокращений или дополнительно утолщенная стенка левого желудочка (Altimiras и др., 2017).

Как и у млекопитающих, у птиц при необходимости увеличения перфузии тканей (например, при физических нагрузках) наблюдается увеличение артериального давления. Однако, многие исследователи отмечают, что относительный прирост данного показателя по сравнению со значениями в состоянии покоя у птиц оказывается невелик по сравнению с млекопитающими: для птиц в покое в среднем характерны значения артериального давления порядка 18,4 кПа, тогда как во время различных видов физической активности оно поднимается до 20,4 кПа (Grubb, 1982; Grubb, 1983; Woakes, Butler, 1986); у млекопитающих в покое артериальное давление находится на уровне около 14,66 кПа, тогда как во время физической нагрузки оно может подниматься до 20,26 кПа (Jones и др., 1989; Taylor и др., 1987). Можно было бы поставить под сомнение данные, полученные в экспериментах от птиц во время бега или плавания, поскольку это энергетически менее затратные виды физической активности по сравнению с полетом – однако, было показано, что у голубей во время полета в аэротрубе артериальное давление также изменяется крайне незначительно, тогда как частота сердечных сокращений и сердечный выброс животных могут возрастать в несколько раз (Butler, West, Jones, 1977). Принимая во внимание описанную выше высокую

производительность сердца птиц, можно предположить, что столь незначительное увеличение артериального давления у птиц при нагрузках связано с некими особенностями регуляции давления на уровне сосудов.

У птиц, как у млекопитающих и прочих позвоночных, регуляция артериального давления осуществляется за счет гуморальных и нервных воздействий, последние опосредуются главным образом за счет барорецепторного рефлекса – однако, расположение и функционирование барорецепторов у птиц изучены крайне слабо (Durfee, 1964). До сих пор практически неизвестна степень миелинизации барорецепторных волокон в составе аортального нерва, а также возможная роль сердечных барорецепторов.

Показано, что у птиц при сохранении функциональности барорецепторного рефлекторного пути более высокие значения артериального давления коррелируют с более низкими показателями частоты сердечных сокращений:  $HR = -0,502 \times P_s + 233$ , тогда как после денервации данная зависимость исчезает. Однако, низкий показатель  $r^2$  регрессии ( $r^2 = 0,386$ ) свидетельствует о том, что другие, независимые от артериального давления факторы, оказывают на частоту сердечных сокращений птиц гораздо более выраженное влияние (Smith, 1994).

## **2.5.2. Электрофизиологические особенности работы сердца птиц**

### *2.5.2.1. Распространение электрического возбуждения в сердце птиц и конфигурация электрокардиограммы*

Электрокардиография является наиболее доступным неинвазивным методом, позволяющим получить информацию о суммарной электрической активности сердца. При регистрации электрокардиограммы птиц, как и у прочих позвоночных, чаще всего используют поверхностные или подкожные электроды и три стандартных отведения Эйнтховена (Dzialowski, Crossley, 2015). Первые пионерские работы по регистрации электрокардиограммы птиц были опубликованы более 100 лет назад (Lewis, 1916). В последующие годы были предприняты несколько попыток описать конфигурацию электрокардиограммы птиц (Kisch, 1951; Sturkie, 1949), однако из-за недостатка данных и, в частности, информации о распространении возбуждения в сердце птиц, в течение долгого времени имели место быть споры о том, как выглядит типичная ЭКГ птиц. В связи с отличиями в строении проводящей системы и распространении возбуждения в сердце птиц по сравнению с таковыми у млекопитающих, в большинстве отведений QRS-комплекс на электрокардиограмме птиц имеет отрицательное направление (рис. 14), а электрическая ось сердца направлена в другую сторону относительно таковой у млекопитающих (Boukens и др., 2019; Dzialowski, Crossley, 2015; Prosheva и др., 2015). Так, по данным Kisch и McKenzie, Will



и Hardie ЭКГ птиц включает P-волну, QRS-комплекс и T-волну (Kisch, 1951; McKenzie, Will, Hardie, 1971). Mangold считал, что в ЭКГ птиц нет R-компонента, но есть глубокий S-зубец (Mangold, 1919). Sturkie выделял в кардиограмме птиц P-волну, доминантные S-зубец и T-волну, маленький R-зубец, тогда как Q-зубец, по его мнению, отсутствовал. Кроме того, расхождения во мнениях относительно конфигурации электрокардиограммы птиц были связаны с межвидовой вариабельностью: на сегодняшний день принято считать, что Q-зубец действительно отсутствует в электрокардиограмме курицы (Goldberg, Bolnick, 1980; Liu, Li, 2005), может быть небольшим у индейки (McKenzie, Will, Hardie, 1971) и более выраженным в электрокардиограмме утки (Cinar и др., 1996).

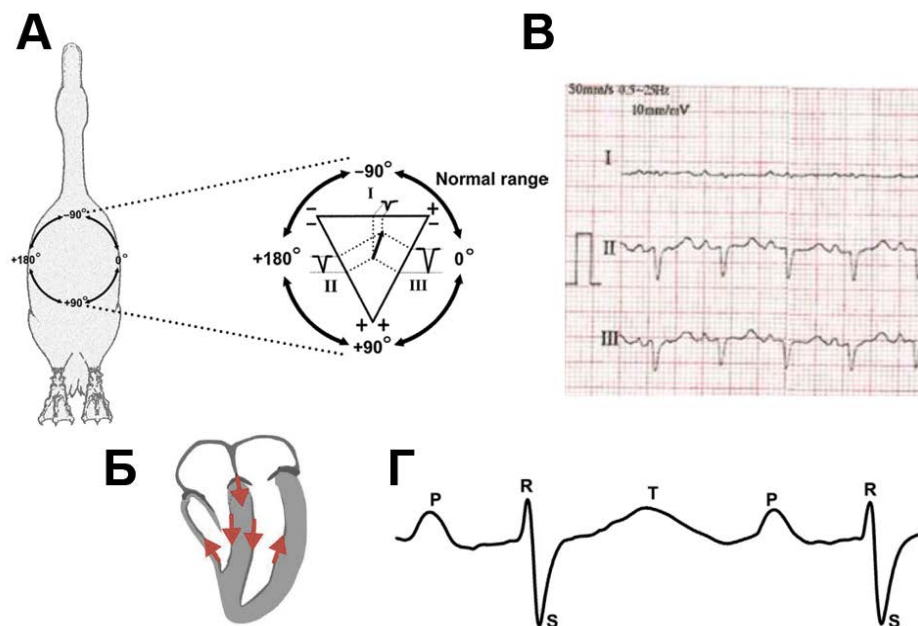


Рис. 14. А – электрическая ось сердца птиц и основные отведения при регистрации электрокардиограммы. Б – схема распространения возбуждения по желудочкам сердца птиц. В – примеры электрокардиограммы птиц в 3 основных отведениях. Г – типичная электрокардиограмма птиц. По (Boukens и др., 2019; Dzialowski, Crossley, 2015; Prosheva и др., 2015; Yogeshpriya и др., 2018).

Как и у других позвоночных, активация предсердий отражается на электрокардиограмме птиц в виде P-волны. В отличие от холоднокровных позвоночных, у которых венозный синус сохраняется в виде отдельной камеры сердца, у птиц ввиду значительной степени его атриализации отсутствует волна SV, характерная для кардиограммы эктотермных позвоночных и отражающая активацию венозного синуса до активации предсердий. Интервал PR отражает атриовентрикулярную задержку возбуждения (Boukens и др., 2019; Davies, Francis, 1946).

QRS-комплекс, отражающий деполяризацию желудочков, как уже говорилось выше, на кардиограмме птиц отличается по своей форме от QRS-комплекса на кардиограммах млекопитающих или эктотермных позвоночных. Из-за практически полного отсутствия Q-зубца, малой амплитуды R-зубца и доминантного отрицательно направленного зубца S их совокупность на кардиограмме птиц иногда определяют как rS-комплекс (Yogeshpriya и др., 2018). Причины такой морфологии QRS комплекса не вполне ясны и, по всей видимости, кроются в особенностях строения сети волокон Пуркинье в желудочках сердца птиц и последовательности активации желудочкового миокарда. Авторы ранних работ в области электрокардиографии птиц предполагали, что субэпикардальные слои желудочкового миокарда птиц активируются несколько раньше субэндокардиальных, что может отражаться на форме QRS-комплекса (Kisch, 1951). Другие исследователи, однако, предполагают, что из-за отсутствия изолирующей соединительнотканной оболочки вокруг ножек пучка Гиса в сердце птиц возбуждение должно быстро распространяться в области перегородки, а оттуда в остальной миокард желудочков (Davies, 1930; Lu и др., 1993b). Электрическое картирование показало, что паттерн активации желудочкового миокарда птиц отличается от такового у млекопитающих. В то время как у большинства млекопитающих есть две основных области перехода возбуждения с эндокардиальной стороны на эпикардиальную, у птиц активация эпикарда желудочков мультифокальная (или мозаичная); у некоторых видов возбуждение движется не от верхушки сердца к основанию, а от левого желудочка к правому (Kharin, 2004; Offerhaus и др., 2021). Описанный паттерн активации миокарда может лежать в основе характерной для птиц формы QRS-комплекса.

T-волна отражает процесс реполяризации желудочков. Интервал QT отражает длительность потенциала действия в желудочковом миокарде (Boukens и др., 2019). В желудочковом миокарде птиц реполяризация определяется в первую очередь, по всей видимости, локальными различиями длительности потенциалов действия. Общий паттерн реполяризации желудочков (по крайней мере, эпикардиальных слоев миокарда) у птиц схож с таковым у млекопитающих и происходит в направлении от верхушки сердца к его основанию (Kharin, 2004).

У мелких видов птиц с высокой частотой сердечных сокращений, малой длительностью миокардиальных потенциалов действия и быстрой реполяризации на электрокардиограмме обнаруживается также J-волна, характерная также для мелких млекопитающих со сходными характеристиками работы сердца (например, грызунов). J-волна отражает раннюю реполяризацию желудочкового миокарда, тогда как поздняя реполяризация по-прежнему отражается на электрокардиограмме в виде T-волны (Offerhaus и др., 2021).

### 2.5.2.2. *Конфигурация электрической активности миокарда птиц*

Большинство исследований в этой области разрознены и были выполнены в середине прошлого века на эмбриональном миокарде птиц, в том числе культивированном (Fingl, Woodbury, Hecht, 1952; Lehmkuhl, Sperelakis, 1963).

Lieberman и de Carvalho достаточно детально описали характерную конфигурацию электрической активности венозного синуса, синоатриального клапана, предсердия, атриовентрикулярного кольца и желудочка эмбрионов курицы в возрасте от 3 до 20 дней. В работе показано, что потенциалы действия пейсмекерного типа генерируются в области перехода еще не полностью атриализованного венозного синуса в предсердия, а электрическая активность атриовентрикулярного кольца, расположенного между правым предсердием и желудочком, в значительной степени напоминает таковую в атриовентрикулярном узле кролика. В работе также показана разница в конфигурации электрической активности между эмбриональным рабочим миокардом предсердий и желудочков: предсердные потенциалы действия имели значительно меньшую длительность (Lieberman, Paes De Carvalho, 1965).

Наиболее исчерпывающие данные касательно конфигурации электрической активности тех или иных отделов сердца взрослых птиц были получены в работе E.N. Moore (рис. 15). В исследовании было показано, что в сердце взрослых куриц и индеек кардиомиоциты с пейсмекерным типом активности и, соответственно, водитель ритма расположены в области синоатриального клапана в синоатриальном узле (САУ).

Пейсмекерные клетки птиц характеризуются отсутствием стабильного потенциала покоя и наличием медленной диастолической деполяризации (МДД), при этом в зависимости от выраженности пейсмекерных характеристик клетки скорость диастолической деполяризации в различных областях САУ может быть выше или ниже. Так, кардиомиоциты в левой створке синоатриального клапана сердца птиц характеризуются быстрой МДД, плавно переходящей в генерацию потенциала действия, тогда как в правой створке клапана кардиомиоциты характеризуются более медленной МДД с выраженным переходом к переднему фронту потенциала действия и, вероятно, относятся к латентному пейсмекерному миокарду. Потенциалы действия, зарегистрированные в рабочем миокарде желудочков, имели большую длительность по сравнению с ПД предсердного миокарда. Электрическая активность волокон Пуркинье сильно отличалась от таковой в прочих отделах сердца птиц. Потенциалы действия в волокнах Пуркинье во всех отделах сердца птиц характеризовались выраженной фазой ранней реполяризации, за которой следовала также ярко выраженная фаза плато. При этом, несмотря на то что МДД в волокнах Пуркинье птиц, по всей видимости, отсутствует, скорость нарастания переднего фронта в них была значительно ниже по сравнению с таковой в рабочем миокарде. Длительность потенциалов действия в волокнах Пуркинье также больше по

сравнению с таковой в рабочих кардиомиоцитах – что, вероятно, обеспечивает длительный период рефрактерности и предотвращает возможные extrasystoles и фибрилляцию желудочков (Moore, 1965).

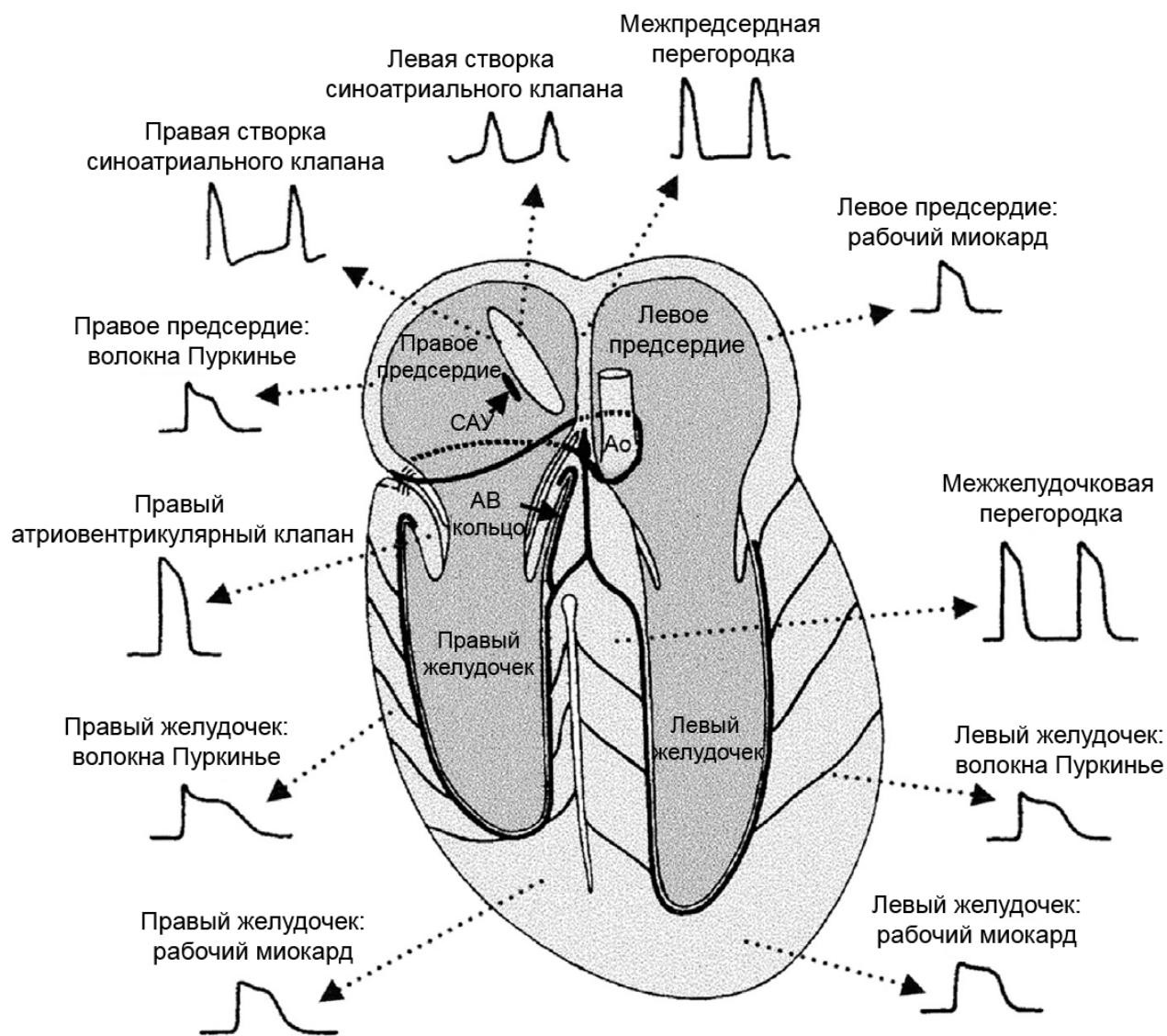


Рис. 15. Характерная конфигурация электрической активности в различных отделах сердца взрослых птиц. По (Jones, Johansen, 1972; Moore, 1965).

Серия работ, выполненная В. Прошевой и соавторами, достаточно подробно описывает электрическую активность правого атриовентрикулярного мускульного клапана и правого атриовентрикулярного кольца в сердце птиц. Показано, что в зависимости от расположения острого стеклянного микроэлектрода, в правом атриовентрикулярном клапане регистрируются различные виды потенциалов действия, характерные как для рабочих желудочковых кардиомиоцитов, так и для клеток проводящей системы сердца, а также для пейсмекерных кардиомиоцитов с различной скоростью МДД. Несмотря на то, что частота

генерация ПД атриовентрикулярным клапаном приблизительно в 2 раза ниже таковой для синоатриального узла, можно предположить, что именно эта структура берет на себя функцию водителя ритма в случае потери функции САУ (Prosheva, Kaseva, 2016).

В некоторых работах предпринимались попытки изучить вклад тех или иных ионных токов в формирование электрической активности сердца птиц – однако, ввиду неселективности используемых методов (например, неселективный блокатор калиевых каналов тетраэтиламмоний или изменение ионного состава растворов) возможная интерпретация подобных данных весьма ограничена (Parrano, 1976).

### 2.5.2.3. *Ионные токи, формирующие электрическую активность сердца птиц*

Основная масса данных касательно ионных токов, формирующих электрическую активность миокарда птиц, получена в исследованиях, выполненных на кардиомиоцитах эмбрионов птиц, изолированных или культивированных. Однако, в ходе онтогенеза электрофизиологический фенотип миокарда может перестраиваться – это известно для млекопитающих; для некоторых видов птиц (относящихся к так называемым гнездовым птицам) после вылупления из яйца характерен постепенный переход от пойкилотермии к гомойотермии (Østnes и др., 2001; Pearson, 2015; Sirsat и др., 2016), что с большой долей вероятности должно быть также связано с перестройкой электрической и сократительной активности сердца.

Несколько пионерских работ, выполненных Н. Satoh на культуре кардиомиоцитов, полученных из желудочков эмбрионов курицы, продемонстрировали наличие основных ионных токов, формирующих электрическую активность миокарда. Было показано наличие быстрого натриевого тока, имеющего достаточно большую пиковую амплитуду в области максимума вольт-амперной характеристики (более 1 нА) (Satoh, 1995d); продемонстрировано наличие калиевого тока задержанного выпрямления (Satoh, 1995a; Satoh, 1995c), а также транзитного выходящего калиевого тока  $I_{to}$  (Satoh, 1995b).

Исследования, выполненные Т. Creazzo и соавторами, подробно описывают круговорот  $Ca^{2+}$  в эмбриональных кардиомиоцитах птиц. Было показано, что сарколеммальный вход  $Ca^{2+}$  в эмбриональных кардиомиоцитах обеспечивается как  $Ca^{2+}$  током L-типа, так и током T-типа (Brotto, Creazzo, 1996), нехарактерным для рабочего миокарда взрослых млекопитающих (Clozel, Ertel, Ertel, 1999; Xu, Best, 1992). В то же время, показано, пиковая амплитуда и относительный вклад кальциевых токов L- и T-типов в ходе эмбрионального развития птиц изменяются, наряду с содержанием  $Ca^{2+}$  в саркоплазматическом ретикулуме и буферной емкостью для ионов  $Ca^{2+}$  (Creazzo, Burch, Godt, 2004; Kitchens, Burch, Creazzo, 2003). Таким образом, несмотря на то, что исследования эмбрионального миокарда птиц представляют

определенный интерес, имеющиеся данные относительно его электрической активности и электрофизиологического фенотипа нельзя полностью переносить на взрослых животных.

Исследования электрофизиологического фенотипа миокарда взрослых птиц еще более отрывочны. Bogdanov с соавторами в своем исследовании провел прямое сравнение сарколеммального  $\text{Ca}^{2+}$  тока в изолированных желудочковых кардиомиоцитах крысы и зяблика и продемонстрировал, что, помимо большой пиковой амплитуды суммарного  $\text{Ca}^{2+}$  тока, миокард взрослого зяблика характеризуется наличием функционального  $\text{Ca}^{2+}$  тока Т-типа, который, по мнению авторов должен обеспечивать быстрый вход  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку, что может быть критичным для быстрой частоты сокращения сердца птиц (Bogdanov и др., 1995). В то же время, другие исследователи утверждают, что  $\text{Ca}^{2+}$  ток Т-типа в миокарде взрослых птиц на примере индейки отсутствует (Kim и др., 2000).

М. Vornanen провел масштабное исследование быстрого натриевого тока  $I_{\text{Na}}$  в ряду позвоночных, сравнив чувствительность сердечного  $I_{\text{Na}}$  к тетродотоксину у разных групп животных и выявив молекулярные основы имеющихся различий. Показано, что миокард птиц характеризуется крайне высокой пиковой амплитудой быстрого натриевого тока – наиболее высокой среди исследованных видов позвоночных – и при этом, в отличие от млекопитающих и рептилий, проявляет высокую чувствительность к селективному блокатору каналов натриевого тока, тетродотоксину. Последнее объясняется тем, что в миокарде птиц оказался вторично утеряна резистентная к тетродотоксину изоформа натриевых каналов  $\text{Nav}1.5$ , приобретенная в ходе эволюции в группе пресмыкающихся (Vornanen, Hassinen, Haverinen, 2011).

G. Iribe и соавторы в своей работе продемонстрировали наличие чувствительных к растяжению кальцийзависимых калиевых каналов  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  – однако, в силу малой амплитуды, данный ток вносит весьма ограниченный вклад по сравнению с мажорными типами ионных каналов в миокарде (Iribe и др., 2010).

Итак, на сегодняшний день электрофизиологический фенотип миокарда птиц, его молекулярные основы и вклад отдельных токов в формирование электрической активности сердца взрослых птиц остается практически неизученным.

## **2.6. Электрофизиологический фенотип миокарда и проблема поиска модельных объектов в экспериментальной кардиологии**

Одной из актуальных проблем современной физиологии и, в частности, электрофизиологии сердца является поиск релевантных животных моделей для проведения исследований. Патологии сердца и, в частности, сердечные аритмии являются одной из наиболее распространенных причин смерти людей (Abdalla и др., 2020; Sharma, Kafle, Alurkar, 2020). В

связи с этим значительное число исследований в области фундаментальной и прикладной физиологии сердца сфокусированы на поиске новых препаратов с противоаритмической активностью, а также на поиске новых экспериментальных моделей. Большинство разновидностей аритмий связаны с различными дисфункциями ионных каналов миокарда, врожденных или вызванных ремоделированием сердечной ткани, при этом заметную роль в развитии аритмий играют дисфункции калиевых каналов, участвующих в реполяризации миокарда и, следовательно, определяющих длительность потенциала действия и периода рефрактерности. Для миокарда большинства позвоночных животных основными каналами, переносящими ионы  $K^+$ , являются  $KvLQT1$  (известный как  $KCNQ1$  и  $Kv7.1$ ), переносящий медленный ток задержанного выпрямления  $I_{Ks}$ ;  $ERG$  (также известен как  $KCNH2/6/7$  или  $Kv11.1-3$ ), переносящий быстрый ток задержанного выпрямления  $I_{Kr}$ ; группа каналов  $Kv4.2$ ,  $Kv4.3$ ,  $Kv1.4$ ,  $Kv3.4$  переносит транзиторный выходящий ток  $I_{to}$ ; каналы  $Kv1.5$  и  $Kv3.1$  переносят ультрабыстрый ток задержанного выпрямления  $I_{Kur}$  (Carmeliet, 1999; Grant, 2009; Nattel и др., 2007). Несмотря на то, что большинство перечисленных ионных каналов сердца достаточно консервативны и могут быть обнаружены даже у примитивных групп позвоночных животных (Haverinen, Vornanen, 2009a; Vornanen, Hassinen, 2016), даже в пределах класса млекопитающих относительный вклад и набор данных ионных каналов может сильно различаться. При этом наблюдаемый эффект гипотетического исследуемого кардиотропного препарата будет зависеть от имеющегося в миокарде животного паттерна ионных токов, зависящего как от экспрессии формирующих пору  $\alpha$ -субъединиц каналов, так и от наличия различных вспомогательных субъединиц канала и имеющих место быть взаимодействий между ними (Barhanin и др., 1996; Deschênes, Tomaselli, 2002; Weerapura и др., 2002), а также, в некоторых случаях, от частоты стимуляции препарата или генерации потенциалов в нем (Lu и др., 2001; Varró и др., 2000), что делает поиск «идеального» модельного объекта еще более затруднительным.

В потенциалах действия человеческого миокарда фаза ранней реполяризации обеспечивается током  $I_{to}$ , а фаза поздней реполяризации – токами  $I_{Kur}$ ,  $I_{Kr}$  и  $I_{Ks}$  (Cavero, 2001; Jost и др., 2005). Сходный электрофизиологический фенотип характерен для миокарда собаки и кролика (Cui и др., 2011; Nerbonne, 1998; Nerbonne, 2000). В миокарде свиньи, часто называемом одним из наиболее схожих с человеческим, слабо представлен ток  $I_{Kur}$  и практически отсутствуют каналы  $Ca^{2+}$ -независимого калиевого тока  $I_{to1}$  (Lacroix и др., 2002; Li и др., 2003; Mow и др., 2008; Nerbonne, 1998). При этом даже наиболее релевантные модельные объекты демонстрируют отличные от человека ответы на противоаритмические препараты (Janse, Opthof, Kléber, 1998), а их высокая стоимость и сложность содержания в совокупности

с определенными этическими факторами приводят к весьма редкому использованию перечисленных модельных животных в лабораторной практике.

Большинство исследователей в области экспериментальной физиологии сердца используют в своих работах крыс, мышей и морских свинок. Однако, электрофизиологический фенотип миокарда этих животных отличается от человеческого еще сильнее. В миокарде морской свинки отсутствуют токи  $I_{to}$  и  $I_{Kur}$ ; в миокарде крыс и мышей отсутствуют токи задержанного выпрямления  $I_{Kr}$  и  $I_{Ks}$  (Nerbonne, 1998; Nerbonne, 2000), что делает большинство противоаритмических препаратов, предназначенных для человека, неэффективными в данных животных моделях (Janse, Opthof, Kléber, 1998).

В последние годы многие исследователи предлагают данио-рерио (*Danio rerio*) в качестве экспериментальной модели для скрининга лекарственных препаратов и исследований в области физиологии сердца, ввиду высокой рентабельности, простоты генетических манипуляций и других качеств данного животного, таких как большое число потомства и оптическая прозрачность тела. Однако, несмотря на кажущуюся схожесть конфигурации электрической активности сердца человека и данио-рерио, набор формирующих ее ионных токов сильно различается между этими видами (Nemtsas и др., 2010; Vornanen, Hassinen, 2016). Различия в электрофизиологическом фенотипе между человеческим сердцем и миокардом земноводных и пресмыкающихся еще более выраженные, что делает данные классы позвоночных максимально нерелевантными модельными объектами (Abramochkin, Kuzmin, 2018; Abramochkin, Matchkov, Wang, 2020; Warren и др., 2010a).

Таким образом, вопрос поиска экспериментальных животных для кардиофизиологических исследований и скрининга лекарственных препаратов остается открытым. Для его решения необходимы фундаментальные исследования, затрагивающие новые виды и группы видов животных и ставящие целью поиск электрофизиологического фенотипа миокарда, наиболее сходного с человеческим. На сегодняшний день одной из наименее изученных в области электрофизиологии сердца групп животных являются птицы, рассматриваемые на примере японского перепела в настоящей работе.



### 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 3.1. Объект исследования

Все эксперименты были проведены с использованием изолированных тканевых препаратов (регистрация электрической активности с использованием микроэлектродов и оптическое картирование электрической активности) или изолированных кардиомиоцитов (регистрация ионных токов методом пэтч-кламп), выделенных из сердца взрослых японских перепелов (*Coturnix japonica*), а также на анестезированных японских перепелах (регистрация электрокардиограммы). В работе были использованы японские перепелы эстонской разновидности обоих полов, возрастом 2-4 месяца с массой тела 200-300 граммов. Данная порода перепелов была выбрана как яйценоская и характеризующаяся, соответственно, более низким темпом роста массы тела по сравнению с мясными породами, для которых может быть характерен высокий риск развития дилатационной кардиомиопатии, асцита и синдрома внезапной смерти и, с высокой долей вероятности, соответствующие патологические изменения в электрической и сократительной активности миокарда. Несмотря на то, что подобные патологии для мясных разновидностей японских перепелов не отмечены в литературе, данная закономерность характерна для других видов домашней птиц (Jackson, Kingston, Hemsley, 1972; Julian, 1987; Julian, 1998; Magwood, Bray, 1962; Nain и др., 2008). Птицы были получены с фермы «Орловский дворик» (Россия, Московская обл., г. Мытищи). Перед экспериментами животных содержали при температуре 24°C, в режиме 12-часового светового дня, пищу (коммерческая кормовая смесь для перепелов) и воду предоставляли ad libitum. Все эксперименты и манипуляции с животными проводили в соответствии с директивой 86/609/ЕЕС по обращению с лабораторными животными.

#### 3.2. Электрокардиография наркотизированного перепела in vivo

##### 3.2.1. Регистрация электрокардиограммы in vivo

Электрокардиограмму регистрировали у наркотизированных перепелов с помощью подкожных электродов. Перед началом эксперимента перепелов наркотизировали изофлураном (3,5% в кислороде, скорость подачи 2 л/мин), который показал себя как эффективный анестетик с минимальными сердечно-сосудистыми эффектами (Naganobu, Nagio, 2000). Для стабилизации температуры тела наркотизированных животных использовали термоконтроллер (Bio-tc1, НПФ «Биотехнологии», Россия). Подкожные электроды располагали так, чтобы отведение для регистрации электрокардиограммы соответствовало II отведению Эйнтховена, расположение электродов проиллюстрировано на рис. 16 (Einthoven, Fahr, Waart De, 1913; Strunk, Heather Wilson, 2003; Szabuniewicz, McCrady, 1974; Yogeshpriya и др., 2018). Электрокардиограмму регистрировали с помощью усилителя PL3516 Power Lab 16/35 Animal Bio Amp (ADInstruments, США), получаемый сигнал

записывали и обрабатывали с помощью пакета программного обеспечения Lab Chart Pro (ADInstruments, США).

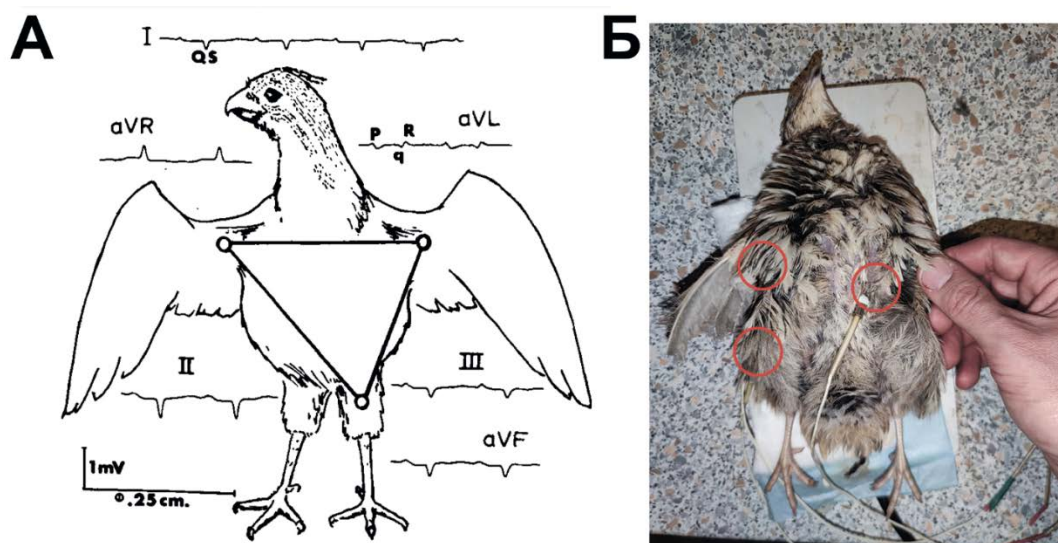


Рис. 16. А – расположение электродов для регистрации ЭКГ японского перепела в предыдущих исследованиях (Szabuniewicz, McCrady, 1974); Б – расположение подкожных электродов для регистрации ЭКГ в данной работе.

### 3.2.2. Введение агонистов и антагонистов рецепторов медиаторов автономной нервной системы японскому перепелу

Введение агонистов и антагонистов медиаторов симпатической и парасимпатической систем осуществляли путем инъекции в торакоабдоминальную полость перепела. Для исследования функционирования сердца перепела *in vivo* под максимальной симпатической нагрузкой животным вводили блокатор мускариновых холинорецепторов атропин (0,5 мг/кг массы тела) и неселективный агонист адренорецепторов изопротеренол (200 мкг/кг массы тела) (Cyr, Dickens, Romero, 2009; Fregly, Simpson, Palmore, 1976).

### 3.2.3. Анализ электрокардиограммы перепела

С помощью встроенного модуля анализа ЭКГ в программном обеспечении Lab Chart Pro оценивали следующие параметры:

- R-R интервал и частоту сердечных сокращений;
- P-R интервал, отражающий атриовентрикулярную задержку проведения возбуждения (более точным параметром является интервал P-Q, однако, Q-зубец неразличим на электрокардиограмме птиц);
- длительность QRS-комплекса, отражающую время деполяризации желудочков;
- Q-T интервал, отражающий общее время деполяризации и реполяризации желудочков;

- Q-T интервал, скорректированный по формуле Базетта (QTc):  $QTc = \frac{QT}{\sqrt{RR}}$ ;
- Tr-Te интервал, соответствующий периоду от пика T-волны до ее окончания и отражающий время реполяризации желудочков;
- межцикловый интервал TP.

### **3.3. Внутриклеточная регистрация потенциалов действия в многоклеточных препаратах миокарда перепела**

#### **3.3.1. Выделение препаратов миокарда японского перепела**

Для получения жизнеспособных препаратов правого предсердия и правого желудочка японского перепела животных декапитировали с помощью гильотины для мелких лабораторных животных (Open Science, Россия), предварительно наркотизировав изофлураном. После декапитации перепелам вскрывали торакоабдоминальную полость, извлекали сердце и помещали его в препаровальную ванночку, заполненную физиологическим раствором комнатной температуры следующего состава (в mM): 129 NaCl; 4 KCl; 20,9 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 MgSO<sub>4</sub>; 20 NaHCO<sub>3</sub>; CaCl<sub>2</sub>; глюкоза; pH 7,4. В среднюю ветвь аорты вводили канюлю, соединенную со шприцем, содержащим тот же раствор, оставшиеся две ветви аорты пережимали и перевязывали лигатурами. Сердце промывали раствором, вытесняя кровь из желудочков, предсердий и коронарных сосудов. После этого производили препаровку необходимых для работы отделов сердца.

Для выделения препаратов правого предсердия сердце фиксировали в препаровальной ванночке правым желудочком вверх, делали разрез по границе предсердий и желудочков и вырезали ушко предсердия вместе с межвенной областью. Для работы с препаратами предсердия в навязанном ритме удаляли всю межвенную область, содержащую водитель ритма сердца.

Для выделения препаратов правого желудочка сердце фиксировали в препаровальной ванночке правым желудочком вверх, после делали надрез выше верхушки сердца, вводили браншу ножниц в полость правого желудочка и продолжали разрезать, сначала с правого, затем с левого края полости желудочка, до предсердно-желудочковой границы, после чего отделяли свободную стенку правого желудочка.

#### **3.3.2. Дизайн экспериментальной установки и регистрация потенциалов действия в изолированных препаратах миокарда перепела**

После выделения, препараты миокарда перепела помещали в экспериментальную камеру эндокардиальной стороной вверх и закрепляли с помощью энтомологических булавок. Препараты суперфузировали модифицированным физиологическим раствором (состав указан

в разделе 3.3.1) при температуре 42°C со скоростью 10 мл/мин, pH поддерживали на уровне 7,4 посредством непрерывной аэрации карбогеном (95% O<sub>2</sub>; 5% CO<sub>2</sub>). Препараты рабочего миокарда перепела (препараты ушка правого предсердия и препараты правого желудочка) ввиду отсутствия в них спонтанной электрической активности постоянно стимулировали электрическими импульсами с частотой 6 Гц, что соответствует частоте сердечных сокращений перепела (Cogger, Otis, Ringer, 1974; Valance и др., 2008; Wilson, 1972). Стимуляцию осуществляли с помощью биполярных серебряных электродов (диаметр 1 мм, расстояние между электродами 2-3 мм), соединенных со стимулятором (DL360, NB-lab, Россия). Стимулирующие электроды фиксировали на поверхности тканевого препарата вблизи его границы. Эксперименты начинали после периода адаптации препарата к экспериментальным условиям (60 минут).

Для регистрации потенциалов действия (ПД) использовали стандартную технику внутриклеточного отведения электрической активности с использованием стеклянных микроэлектродов. ПД отводили с помощью острых микроэлектродов, изготовленных из боросиликатных стеклянных капилляров (WPI, США; внешний диаметр 1,2 мм, внутренний диаметр 0,6 мм) с помощью пуллера (P-30, Sutter Instrument, США) и заполненных раствором KCl (3 М); сопротивление кончиков заполненных микроэлектродов составляло 15-40 МΩ. Микроэлектроды с помощью специального холдера подключали к усилителю (1600, А-М System, США); усиленный сигнал поступал на аналогово-цифровой преобразователь (Е-154, L-card, Россия), а затем записывался и обрабатывался на персональном компьютере с помощью программного обеспечения PowerGraph Professional 3.3.8 (ДиСофт, Россия). Схема описанной экспериментальной установки представлена на рис. 16

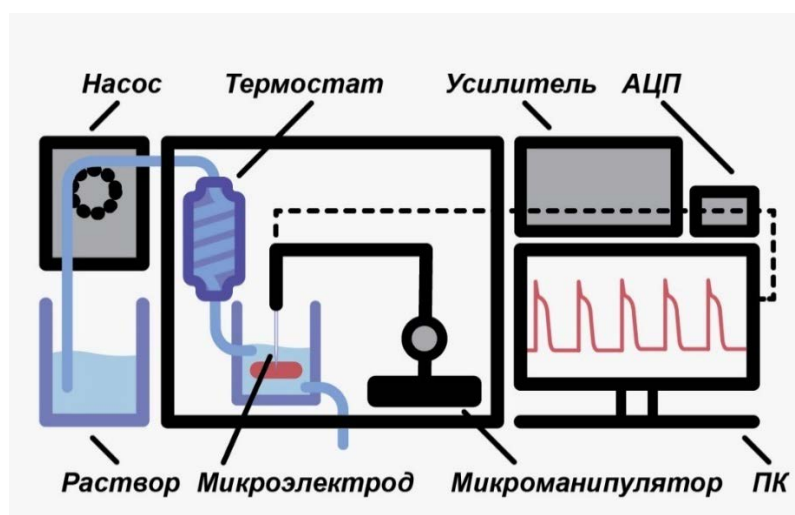


Рис. 17. Схема установки для регистрации электрической активности многоклеточных тканевых препаратов с помощью острых стеклянных микроэлектродов. Пунктирная линия обозначает аналоговый сигнал.

### 3.3.3. Анализ потенциалов действия

Анализ зарегистрированных потенциалов действия осуществляли в программе MiniAnalysis (Synaptosoft, США). Оценивали длительность ПД на уровне 25%, 50% и 90% реполяризации (ДПД25, ДПД50 и ДПД90, соответственно).

В экспериментах, включавших регистрацию электрической активности пейсмекерного миокарда, оценивали длительность ПД на уровне 50% реполяризации, а также скорость нарастания медленной диастолической деполяризации ( $V_{мдд}$ ) и частоту спонтанной импульсации.

Для оценки различий в конфигурации электрической активности, вызванных в ходе эксперимента аппликацией блокаторов и иных соединений, использовали значений длительности потенциалов действия, соответствующие максимальному развитию эффекта с момента начала подачи соединения в экспериментальную камеру с препаратом миокарда.

### 3.4. Регистрация биоэлектрической активности методом оптического картирования

Для поиска источника генерации электрического возбуждения в сердце японского перепела использовали метод оптического картирования. Тканевые препараты правого предсердия, содержащие межвенную область, окрашивали раствором потенциалчувствительного флуоресцентного красителя di-4-ANNEPS (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 5  $\mu$ М и помещали в экспериментальную камеру. Препараты непрерывно перфузировали модифицированным физиологическим раствором (состав указан выше в разделе 3.3.1) при температуре 42°C со скоростью 10 мл/мин, pH поддерживали на уровне 7,4 за счет аэрации карбогеном. В перфузионный раствор также добавляли 10 мкМ блеббистатина (Sigma-Aldrich, США) для подавления работы миозина в кардиомиоцитах и нивелирования сократительных артефактов при регистрации электрической активности.

Для возбуждения флуоресценции красителя использовали источник света с длиной волны 500 нм. Для регистрации флуоресцентного сигнала использовали высокочувствительную фотодиодную матрицу (WuTech H-469V, США) в составе оптико-электронной установки. Возбуждающий свет и эмиссионную флуоресценцию красителя разделяли с помощью фильтра, расположенного на входе фотодиодной матрицы и пропускающего свет с длиной волны более 610 нм. Фотодиодная матрица имела гексагональную форму; самый длинный ряд включал 24 фотодиода. Оптическая система была настроена таким образом, что площадь картирования составляла приблизительно 19 мм<sup>2</sup>.

Частота регистрации сигнала составляла 1,63 КГц; таким образом, интервала между кадрами составляли 1,63 мс. Флуоресценцию регистрировали в течение 1000 мс; данный

временной интервал включал не менее 5-6 циклов возбуждения препарата. Сигналы от фотодиодов матрицы поступали на АЦП, регистрацию и обработку сигнала проводили с использованием программы Cadrioplex (RedShirtImaging, США). По каждому фотодиоду матрицы отслеживали изменение уровня флуоресценции в течение времени, в результате чего получали оптические сигналы, соответствующие ПД. На основе данных сигналов строили изохронные карты, отражающие моменты одновременной активации картируемой области.

### **3.5. Регистрация ионных токов в изолированных кардиомиоцитах перепела**

#### **3.5.1. Выделение изолированных кардиомиоцитов перепела**

Для регистрации ионных токов методом пэтч-кламп автором работы была разработана методика получения изолированных кардиомиоцитов перепела посредством энзиматической диссоциации.

Животных анестезировали и декапитировали как описано выше (см. раздел 3.2.1). После декапитации быстро вскрывали торакоабдоминальную полость, вынимали сердце и помещали на аппарат Лангендорфа для ретроградной перфузии с постоянным протоком (5,5 мл/мин). Сердце перепела канюлировали через среднюю ветвь аорты, не доходя до аортального клапана, оставшиеся две ветви аорты перевязывали. Сердце перфузировали не содержащим ионов  $\text{Ca}^{2+}$  перфузионным раствором следующего состава (в мМ): 125 NaCl; 4 KCl; 1,66  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 25,2  $\text{NaHCO}_3$ ; 4,9 пируват натрия; 20,5 таурин; 0,55  $\text{MgCl}_2$ ; 11 глюкоза; а также 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина; pH поддерживали на уровне 7,4 путем постоянной аэрации карбогеном при температуре 42°C, что соответствует температуре тела перепела (Ben-Naim и др., 2011; Murakami и др., 2001).

После вымывания крови из сердца и 7-10 минут спустя сердце перфузировали раствором аналогичного состава, содержащим дополнительно 0,425 мг/мл коллагеназы II, 0,025 мг/мл протеазы XIV типа и 6 мкМ  $\text{CaCl}_2$ . После 34-39 минут перфузии раствором, содержащим ферменты, предсердия отделяли, разрезали на мелкие фрагменты и пипетировали для высвобождения изолированных клеток в раствор Kraftbrühe следующего состава (в мМ): 50 глутамат калия; 20 HEPES; 20 таурин; 3  $\text{MgSO}_4$ ; 30 KCl; 0,5 EGTA; 30  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 10 глюкоза; pH 7,2 при температуре 24°C. После 37-45 минут с момента начала перфузии такую же процедуру проводили с желудочками. Для выделения пейсмекерных кардиомиоцитов из области водителя ритма от сердца через 37-39 минут с момента начала перфузии отделяли межвенную область правого предсердия, нарезали на мелкие фрагменты и пипетировали в растворе Kraftbrühe для высвобождения изолированных миоцитов. Изолированные кардиомиоциты перепела хранили в растворе Kraftbrühe при комнатной температуре и использовали для работы в течение 8-9 часов с момента выделения.

### 3.5.2. Регистрация ионных токов в изолированных кардиомиоцитах перепела методом пэтч-кламп

Интегральные ионные токи регистрировали в изолированных кардиомиоцитах перепела методом пэтч-кламп в конфигурации whole-cell. Клетки помещали в экспериментальную камеру объемом 150 мкл (RC-26, Warner Instruments, США), закрепленную на инвертированном микроскопе (Diaphot 200, Nikon, Япония). С помощью гидравлического микроманипулятора (MHW-3, Narishige, Япония) к клетке подводили пэтч-пипетку, изготовленную из бесфиламентных боросиликатных стеклянных капилляров (Sutter Instruments, США) с помощью пуллера (PIP 6, НЕКА Elektronik, Германия), заполненную раствором, имитирующим состав внутриклеточной среды. Сопротивление кончика заполненной раствором пэтч-пипетки составляло 2-3 МΩ. Пэтч-пипетка через холдер и головку усилителя были соединены с собственно усилителем (EPC 800, НЕКА Elektronik, Германия), а также с медицинским шприцем для изменения давления внутри холдера и пипетки. Контакт высокого сопротивления между пэтч-пипеткой и клеткой устанавливали путем подачи внутрь пипетки отрицательного давления. После достижения сопротивления контакта 1 ГΩ производили перфорацию мембраны клетки путем подачи резкого перепада давления внутри пипетки или посредством электрического импульса, формируя таким образом конфигурацию whole-cell для регистрации интегральных ионных токов (т.е. токов, проходящих через всю совокупность тех или иных ионных каналов на мембране клетки). После установления конфигурации whole-cell компенсировали емкость клетки, емкость пипетки и сопротивление контакта для элиминации емкостных токов. Регистрацию токов начинали после периода адаптации клетки к экспериментальным условиям (1 минута с момента установления конфигурации whole-cell).

В ходе эксперимента изолированные кардиомиоциты в экспериментальной камере суперфузировали модифицированным раствором Тироде при температуре 24°C. При регистрации калиевых токов использовали раствор модифицированный Тироде следующего состава (в mM): 150 NaCl; 5,4 KCl; 1,2 MgCl<sub>2</sub>; 5 HEPES; 10 глюкоза; pH 7,4. Дополнительно в раствор добавляли нифедипин (10 мкМ) и тетродотоксин (1 мкМ) для подавления кальциевого тока L-типа и быстрого натриевого тока, соответственно (Brotto, Creazzo, 1996; Kitchens, Burch, Creazzo, 2003; Vornanen, Hassinen, Haverinen, 2011). Пэтч-пипетки при этом заполняли раствором следующего состава (в mM): 140 KCl; 1 MgCl<sub>2</sub>; 5 EGTA; 10 HEPES; 4 MgATP; 0,03 Na<sub>2</sub>GTP; pH 7,2. Для регистрации кальциевых и натриевых токов использовали растворы, в которых ионы K<sup>+</sup> заменяли на Cs<sup>+</sup>. Таким образом, модифицированный раствор Тироде для регистрации кальциевых токов имел следующий состав (в mM): 150 NaCl; 5,4 CsCl; 1,2 MgCl<sub>2</sub>; 5 HEPES; 10 глюкоза; pH 7,4. Модифицированный раствор Тироде для регистрации

натриевого тока отличался сниженной концентрация ионов  $\text{Na}^+$  и имел следующий состав (в мМ): 20 NaCl; 120 Трис; 5,4 CsCl; 1,2  $\text{MgCl}_2$ ; 5 HEPES; 10 глюкоза; pH 7,4. Пипеточный раствор для регистрации кальциевых токов имел следующий состав (в мМ): 130 CsCl; 1  $\text{MgCl}_2$ ; 5 EGTA; 10 HEPES; 4  $\text{MgATP}$ ; 0,03  $\text{Na}_2\text{GTP}$ ; 15 тетраэтиламмоний; pH 7,2. При регистрации быстрого натриевого тока в пипеточный раствор также добавляли 10 мМ NaCl. Описанные выше составы растворов для регистрации натриевого тока снижали трансмембранный градиент ионов  $\text{Na}^+$  и позволяли регистрировать ток более низкой амплитуды, что, в свою очередь, снижало сдвиг поддерживаемого потенциала (V), который, согласно закону Ома, пропорционален сопротивлению контакта между пэтч-пипеткой и клеткой ( $R_S$ ) и силе тока (I). В ходе регистрации быстрого натриевого тока для дополнительной минимизации отклонения поддерживаемого потенциала от заданных значений использовали электрическую компенсацию сопротивления контакта ( $K_S$ ; ур. 2):

$$V = \frac{I \times R_S \times (100\% - K_S)}{100\%} \quad (2)$$

В работу включали только те клетки, при работе с которыми отклонение поддерживаемого потенциала составляло не более 2 мВ, поскольку это гарантировало релевантную стационарную кинетику работы ионных каналов (Maltsev, Undrovinas, 1998).

Протоколы изменения мембранного потенциала, использовавшиеся для регистрации тех или иных ионных токов, отражены на врезках в соответствующих рисунках. Запись данных производили на персональном компьютере с использованием программного обеспечения WinWCP 5.3.4 (University of Strathclyde, Великобритания).

### **3.5.3. Анализ ионных токов, зарегистрированных в изолированных кардиомиоцитах перепела**

Обработку данных производили с использованием программного обеспечения ClampFit 10.3 (Molecular Devices, США).

При обработке данных, полученных методом пэтч-кламп, амплитуду зарегистрированных ионных токов нормировали по емкости кардиомиоцита. Амплитуду токов оценивали после вычитания тока, записанного в присутствии селективного блокатора. Амплитуду токов с относительно быстрой кинетикой время-зависимой инактивации, а именно кальциевого тока L-типа, быстрого натриевого тока, выходящего транзитного калиевого тока, оценивали как разность между пиком тока и его хвостовыми значениями после полной инактивации. Амплитуду калиевых токов задержанного выпрямления, ввиду гораздо более медленной инактивации, оценивали на двух ступенях протокола: на первой, активационной, – как разницу между амплитудой тока в начале и после полной активации; на второй, инактивационной,



оценивали разницу между пиком тока и его хвостовым значением после полной инактивации (так называемый хвостовой ток). Амплитуду токов входящего выпрямления ввиду отсутствия инактивации какого-либо типа оценивали как абсолютную амплитуду тока.

Кинетику стационарной инактивации токов ( $h_{\infty}$ ) оценивали, используя отношение тока при заданном поддерживаемом потенциале к максимальному току. Кинетику стационарной активации оценивали, используя аналогичное соотношение проводимости каналов при заданном поддерживаемом потенциале:  $g/g_{\max}$ . Проводимость, в свою очередь, оценивали как отношение амплитуды тока к разнице между поддерживаемым потенциалом и потенциалом реверсии для данного типа ионов (ур. 3):

$$G = \frac{I_V}{V - V_{rev}} \quad (3)$$

Степень выпрямления токов входящего выпрямления (в частности, фонового тока входящего выпрямления  $I_{K1}$ ) оценивали как отношение зарегистрированного в эксперименте тока  $I_{K1}$  к гипотетическому току, не подверженному выпрямлению (см. врезку на рис. 33). Зависимость описанных выше соотношений от мембранного потенциала выражалась функцией Больцмана (ур. 4):

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V - V_{0.5}}{k}}} \quad (4)$$

где  $V$  – поддерживаемый мембранный потенциал,  $V_{0.5}$  – потенциал 50% выпрямления,  $k$  – наклон кривой (Estacion и др., 2010; Maltsev, Undrovinas, 1998).

Кинетику инактивации токов оценивали по временной константе инактивации  $\tau$ , получаемой в результате выражения зависимости падения амплитуды тока с течением времени в виде экспоненциальной функции Чебышева, представленной в инструментарии программного обеспечения ClampFit 10.3.

### **3.6. Оценка емкости кальциевых депо СПР в изолированных кардиомиоцитах перепела**

Количество кальция, депонированного в саркоплазматическом ретикулуме изолированных кардиомиоцитов перепела, оценивали, используя методику пэтч-кламп в конфигурации whole-cell с некоторыми модификациями относительно метода, описанного в разделе 3.3.

Изолированные кардиомиоциты перепела выделяли, как описано выше. Клетки помещали в экспериментальную камеру установки, описанной в разделе 3.3.2. В ходе эксперимента клетки непрерывно перфузировали модифицированным раствором Тироде, в котором ионы  $K^+$  заменяли на  $Cs^+$ , как описано выше. К клетке подводили пэтч-пипетку, заполненную модифицированным пипеточным раствором, содержащим (в mM): 130 CsCl; 5 MgCl<sub>2</sub>; 0,025

EGTA; 10 HEPES; 4 MgATP; 0,03 Na<sub>2</sub>GTP; 15 тетраэтиламмоний; pH 7,2. Более низкая концентрация EGTA по сравнению со стандартными пипеточными растворами имитировала условия связывания ионов Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме кардиомиоцитов птиц, что необходимо для адекватной загрузки Ca<sup>2+</sup> в СПР (Creazzo, Burch, Godt, 2004; Hove-Madsen, Llach, Tort, 2001). Также пипеточный раствор содержал 40 мкМ β-эсцина – перфорирующего ионофора, который обеспечивает перфорацию мембраны после установления гигаомного контакта и предотвращает снижение пиковой амплитуды кальциевого тока со временем в ходе эксперимента по сравнению с классической whole-cell конфигурацией (Sarantopoulos и др., 2004).

Емкость кальциевого депо СПР в изолированных кардиомиоцитах перепела оценивали посредством измерения входящего тока, опосредуемого ионами Na<sup>+</sup>, перекачиваемыми через мембрану клетки Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обменником (NCX) в ответ на быструю аппликацию кофеина (10 мМ). Поскольку кофеин вызывал открытие риаудиновых рецепторов на мембране СПР и выброс Ca<sup>2+</sup> из депо, концентрация Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме миоцитов резко возрастала. Это приводило к активации обменников NCX на плазмалемме кардиомиоцитов, которые выкачивали ионы Ca<sup>2+</sup> наружу в обмен на ионы Na<sup>+</sup> в соотношении 1:3, соответственно, что при поддерживаемом потенциале -80 мВ проявлялось в виде входящего (деполяризующего) тока. Таким образом, интеграл индуцируемого кофеином и опосредуемого обменником NCX тока (I<sub>NCX</sub>) по времени оказывается пропорциональным количеству кальция, депонированного до этого в СПР клетки (Haverinen, Vornanen, 2009b; Shiels, Vornanen, Farrell, 2002; Varro и др., 1993). Количество Ca<sup>2+</sup> в СПР оценивали после различного числа деполяризующих пульсов (см. рис. 39). Перед началом каждого эксперимента СПР клетки опустошали путем аппликации кофеина. Полученные данные нормировали на емкость клетки и выражали как количество перенесенных зарядов, нормированное на емкость клетки (пКл/пФ). Также содержание Ca<sup>2+</sup> в СПР выражали в виде мкМ. Объем клетки вычисляли из площади поверхности клетки (рассчитывали из емкости мембраны клетки, считая удельную емкость мембраны 1,59 мкФ/см<sup>2</sup>), считая, что соотношение площади поверхности клеток такой формы к их объему приблизительно равно 1,15 (Vornanen, 1997), а также что объем клетки, не занятый митохондриями, составляет порядка 55% (Creazzo, Burch, Godt, 2004; Vornanen и др., 1998).

### **3.7. Оценка уровня экспрессии ионных каналов в рабочем миокарде перепела методом количественной ПЦР в реальном времени**

В работе оценивали количество мРНК порообразующих субъединиц каналов, опосредующих основные реполяризующие калиевые токи в миокарде взрослых перепелов, а именно мРНК генов Kv4.3, Kv7.1 и Kv11.1. Тотальную РНК выделяли из свободных стенок предсердий и желудочков перепелов. Животных наркотизировали и декапитировали, как было

описано выше, вскрывали торакоабдоминальную полость и вырезали сердце. Сердце промывали от крови путем ретроградной перфузии по Лангендорфу (см. раздел 3.3.1) холодным модифицированным физиологическим раствором (состав указан в разделе 3.2.1). Фрагменты ткани помещали в реагент ExtractRNA (Евроген, Россия), гомогенизировали и выделяли тотальную РНК в соответствии с базовыми протоколами, полученными от производителя.

Концентрацию РНК в пробах и чистоту проб оценивали на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Пробы с тотальной РНК обрабатывали ДНКазой I из расчета 1 единица ДНКазы I на 1 мкг тотальной РНК. После уравнивания концентраций РНК в пробах синтезировали первую цепь тотальной кодирующей ДНК (кДНК) с использованием обратной транскриптазы MMLV и случайных праймеров (MMLV RV kit, Евроген, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Полученную кДНК хранили при температуре -20°C, оставшийся элюат с РНК – при -80°C.

Количественную ПЦР в реальном времени проводили с использованием интеркалирующего индикатора SYBR Green I в сочетании с пассивным референсным красителем ROX (qPCRmix-HS SYBR+LowROX, Евроген, Россия) в термоциклере (CFX96, BioRad, США). Для проведения полимеразной цепной реакции в термоциклере использовали следующие условия: 95°C в течение 5 мин; 40 циклов, включающих 15 с при 95°C, 20 с при 60°C и 20 с при 72°C. От каждого животного исследовали не менее 3 образцов ткани. В каждом эксперименте параллельно анализировали 2 контрольных образца (в отсутствие РНК из образца и без проведения обратной транскрипции).

Праймеры были сконструированы в соответствии с транскриптами, известными для японского перепела (*Coturnix japonica*) или домашней курицы (*Gallus gallus domesticus*) и аннотированными в базе данных NCBI Nucleotide. Для каждой использованной в работе пары праймеров было подтверждено отсутствие димеров, сформированных праймерами. Эффективность праймеров оценивали с использованием метода последовательного разведения образцов и выражали как прирост кДНК в пробе за один цикл ПЦР в % от исходного количества кДНК. В работе были использованы праймеры с эффективностью не ниже 75%.

Праймеры, использованные в данных экспериментах, представлены в таб. 1. В качестве референсных генов использовали гены глицеральдегид 3-фосфат-дегидрогеназы (GAPDH) и  $\beta$ -актина (Alexander и др., 1997; Makwana и др., 2000; Yue, Tomanek, 1999). Относительную экспрессию генов рассчитывали по следующей формуле (ур. 5):

$$\text{Уровень экспрессии} = \frac{E(\text{ГИ})^{\Delta Ct(\text{ГИ})}}{\sqrt{E(\beta\text{-актин})^{\Delta Ct(\beta\text{-актин})} \times E(\text{GAPDH})^{\Delta Ct(\text{GAPDH})}}} \quad (5)$$

где ГИ – ген интереса (Kv4.3, Kv7.1 или Kv11.1),  $\Delta Ct$  – разница пороговых циклов между образцом и калибровочной пробой.

Таб. 1. РНК-транскрипты, использованные для дизайна праймеров, праймеры и их параметры, использованные в работе.

Ген	№ в базе данных NCBI Nucleotide	Праймеры, 3'-5', прямой (F) и обратный (R)	Ta, °C	E, %	Ампликон, п.н.
GAPDH	XM_015873412.2	(F) AAGGAGTGAGCCAAGCACACA (R) TCACTGCAGGATGCAGAACTG	60	100	109
$\beta$ -актин	AF199488.1	(F) CAGGATGCAGAAGGAGATCACA (R) TAGAGCCTCCAATCCAGACAGAGTA	60	100	101
Kv4.3	AF209722.1	(F) CAGGATGCAGAAGGAGATCACA (R) TAGAGCCTCCAATCCAGACAGAGTA	60	75	167
Kv7.1	XM_015863924.1	(F) CAGGATGCAGAAGGAGATCACA (R) TAGAGCCTCCAATCCAGACAGAGTA	60	96	158
Kv11.1	XM_015852747.1	(F) CAGGATGCAGAAGGAGATCACA (R) TAGAGCCTCCAATCCAGACAGAGTA	60	100	156

### **3.8. Определение белков ионных каналов в миокарде перепела методом вестерн-блоттинга**

Для идентификации молекулярной природы ионных каналов, опосредующих основные реполяризирующие калиевые токи в миокарде японского перепела в работе проводили качественное определение белков Kv4.3, Kv7.1 и Kv11.1 методом вестерн-блоттинга. В качестве положительного контроля в работе использовали суммарный белок, экстрагированный из рабочего миокарда взрослых крыс (контроль для белка Kv4.3) и морских свинок (контроль для белков Kv7.1 и Kv11.1).

Животных декапитировали, сердце вырезали и ретроградно промывали модифицированным физиологическим раствором, как описано выше (см. раздел 3.2.1). Из сердца вырезали фрагменты свободных стенок предсердий и желудочков, которые затем измельчали в жидком азоте и хранили при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Полученный гомогенат лизировали в буфере RIPA следующего состава (в mM): 25 Трис-HCl; 150 NaCl; 5 ЭДТА; 1% NP-40; 1% дезоксихолат натрия; 0,1% додецилсульфат натрия; pH 7,2-7,4; буфер содержал смесь ингибиторов протеаз (1:100, Sigma, США). После обработки буфером RIPA образцы центрифугировали 5 минут при скорости 18 тыс. об./мин при комнатной температуре, после чего отбирали супернатант. Полученные пробы хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Концентрацию белка в пробах определяли по Брэдфорду (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad, США) (Bradford, 1976). Разделение белков проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли (Laemmli, 1970). В работе использовали 5% концентрирующий и 7,5% разделяющий гели. На одну из дорожек наносили цветные белковые маркеры (PageRuler Prestained Protein Ladder 10-170 kDa, Thermo Fisher Scientific, США, 26616), которые были использованы для определения молекулярного веса анализируемых белков. Электрофорез проводили в установке Mini-Trans Blot (Bio-Rad, США) течение 1 часа; стартовое напряжение составляло 60 В; в ходе фореа его постепенно увеличивали до 180 В. При электрофорезе использовали трис-глициновый электродный буфер следующего состава (в мМ): 25 Трис-НСl; 192 глицин; 0,1% додецилсульфат натрия; рН 8,3.

После электрофореза белки переносили с геля на нитроцеллюлозную мембрану методом переноса в камере. Для переноса использовали буфер следующего состава (в мМ): 25 Трис-НСl; 192 глицин; 20% этиловый спирт; рН 8,3. Перенос проводили при 250 мА в течение 1 часа. Для подтверждения успешного электропереноса белков мембрану окрашивали раствором Ронсеау S (0,1% раствор в 0,1% уксусной кислоте). После визуализации перенесенных на мембрану белков при необходимости вырезали отдельные участки мембраны с исследуемыми в дальнейшей работе белками, после чего мембрану отмывали от красителя (3 раза по 5 минут) в фосфатно-солевом буфере с добавлением Tween 20 (PBS-Т, в мМ): 137 NaCl; 2,7 KCl; 10 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,76 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,05% Tween 20; рН 7,4. После отмывки мембрану в течение часа при комнатной температуре инкубировали с блокирующим раствором на основе PBS-Т буфера и 5% обезжиренного сухого молока (Blotting Grade Blocker Non Fat Dry Milk, Bio-Rad, США, 1706404XTU) для блокирования незанятых участков мембраны и предотвращения неспецифического связывания антител.

Затем проводили инкубацию мембраны с растворами поликлональных первичных антител. Антитела растворяли в PBS-Т буфере, содержащем 5% обезжиренного сухого молока. Инкубацию проводили при +4°С в течение ночи. Используемые в работе первичные антитела и их разведения приведены в таб. 2:

Таб. 2. Поликлональные антитела, использованные для идентификации порообразующих субъединиц каналов методом вестерн-блоттинга.

Антитело	Разведение	Происхождение	Производитель
Anti-Kv4.3	1:400	кролик	Alomone Labs, Израиль, APC-017
Anti-Kv7.1	1:200	кролик	Alomone Labs, Израиль, APC-022
Anti-Kv11.1	1:400	кролик	Alomone Labs, Израиль, APC-062

После инкубации с первичными антителами и последующей отмывки в буфере PBS-T (3 раза по 5 минут) мембрану в течение 1 часа инкубировали с раствором вторичных антител, полученных из козы против кролика и конъюгированных с пероксидазой хрена (1:10000, Abcam, Великобритания, ab6721). Затем мембрану отмывали в буфере PBS-T (3 раза по 5 минут).

Для проявки сигнала использовали коммерческий раствор ESL (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Fisher Scientific, США, Pierce-34,095). Хемилюминесцентный сигнал детектировали с использованием прибора ChemiDoc MP (Bio-Rad, США).

### **3.9. Иммуоцитохимическое окрашивание изолированных кардиомиоцитов перепела**

Предсердные и желудочковые кардиомиоциты перепела получали путем энзиматического выделения, как описано выше в разделе 3.3.1, и хранили в растворе Kraftbrühe. На предметное стекло помещали 50 мкл суспензии клеток, после чего добавляли равное количество фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего 4% параформальдегида. Фиксацию изолированных клеток проводили в течение 30 минут при комнатной температуре. После отмывки от фиксирующего раствора (3 раза по 5 минут в PBS) кардиомиоциты в течение 10 минут при комнатной температуре пермеабелизовали с помощью 0,2% сапонины, растворенного в PBS. В дальнейшем все используемые растворы также содержали 0,2% сапонины для сохранения перфораций в мембране кардиомиоцитов. После обработки сапонином проводили блокирование путем инкубации кардиомиоцитов в течение 1 часа при комнатной температуре в растворе PBS, содержащем в дополнение к сапонину 10% козьей сыворотки. После отмывки (5 минут в растворе PBS с 0,2% сапонины) в течение 1 часа проводили инкубацию с первичными антителами. Помимо первичных антител, перечисленных выше в таб. 2 в разделе 3.6, также были использованы первичные антитела против  $\alpha$ -актинина (1:1000 в PBS, содержащем 0,2% сапонины и 1% бычьего сывороточного альбумина; Abcam; ab9465; мышинные поликлональные). После инкубации с первичными антителами производили отмывку (3 раза по 5 минут в PBS с сапонином). После этого кардиомиоциты в течение 1 часа при комнатной температуре инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa 488 и растворенных в PBS, содержащем 0,2% сапонины и 1% бычьего сывороточного альбумина. Для первичных антител против  $\alpha$ -актинина использовали вторичные антитела, полученные из кролика против мыши (1:500; Abcam; ab150125); для первичных антител против калиевых каналов использовали вторичные антитела, полученные из козы против кролика (1:750; Abcam; ab150077). После инкубации кардиомиоцитов со

вторичными антителами производили отмывку (3 раза по 5 минут в PBS, содержащем сапонин), после чего монтировали покровные стекла. Для монтирования использовали среду, используя коммерческую среду для монтирования, содержащую иодид пропидия для окрашивания ядер кардиомиоцитов (Vectashield Mounting Medium with Propidium Iodide; Vector Laboratories; США; H-1300-10). Окрашенные клетки визуализировали с использованием конфокального микроскопа LSM 710 (Zeiss, Германия).

### **3.10. Визуализация катехоламин-содержащих симпатических волокон в миокарде перепела**

Для оценки степени симпатической иннервации миокарда японского перепела симпатические волокна в ткани сердца визуализировали с помощью гистохимического окрашивания глиоксильной кислотой, которая при взаимодействии с катехоламинами формирует флуоресцирующий комплекс. Препараты миокарда предсердий и межвенной области правого предсердия перепела получали по методике, описанной выше в разделе 3.3.1. Поскольку стенки желудочков имели слишком большую толщину, для окрашивания желудочкового миокарда использовали поперечные срезы стенок правого и левого желудочка перепела толщиной до 0,3 мм, полученные с помощью вибрационного микротомы. Препараты промывали модифицированным физиологическим раствором (состав указан выше в разделе 3.3.1), помещали на предметное стекло и удаляли излишки жидкости. После этого препараты в течение 30 минут инкубировали в PBS, содержащем глиоксильную кислоту (2%) и сахарозу (10%), pH 7,4. По окончании периода инкубации препарат расправляли на предметном стекле эндокардиальной стороной вверх и высушивали в течение 30-60 минут под струей теплого воздуха. Затем проводили термическую обработку в сухожаровом шкафу при температуре 100°C в течение 5 минут. Высушенный препарат монтировали с использованием вазелинового масла в качестве среды.

Окрашенные препараты визуализировали с помощью конфокального микроскопа LSM 710, оборудованного цифровой камерой Plan-Apochromat (разрешение 2048×2048 пикселей, 8 бит/пиксель) (Zeiss, Германия) с объективом 20x/0,8 M27. Источником возбуждающего света являлся фотодиодный лазер. Использовали возбуждающий свет с длиной волны 405 нм, флуоресценцию в препаратах использовали в диапазоне длин волн 420-440 нм.

Плотность симпатических волокон в исследованных препаратах оценивали с использованием программного обеспечения ImageJ 1.53 с помощью плагина Bio-Formats Explorer. После вычитания фона и бинаризации изображения производили подсчет процентного соотношения количества флуоресцентных пикселей к общей площади исследуемого препарата. Полученные значения отражали содержание катехоламинергических нервных волокон в сердечной ткани перепела. После этого производили скелетонизацию

изображения и оценивали отношение общей длины флуоресцентных волокон в ткани к общей площади препарата. Данный показатель отражал относительную протяженность симпатических волокон.

### **3.11. Статистическая обработка данных**

Данные в работе представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего для  $n$  клеток или препаратов миокарда от  $N$  животных. Статистическую обработку данных производили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США).

Нормальность распределения выборок в работе проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилкса. Для сравнения двух связанных или несвязанных выборок использовали  $t$ -тест Стьюдента для соответствующего типа сравнения. В некоторых случаях для сравнения связанных выборок использовали непараметрический критерий Вилкоксона. Для сравнения более чем 2 выборок использовали дисперсионный анализ ANOVA с post-hoc тестом Тьюки. Сравнение нескольких повторных измерений содержания  $Ca^{2+}$  в СПР кардиомиоцитов осуществляли с помощью дисперсионного анализа для повторных измерений (RM-ANOVA) с post-hoc тестом Даннетта. При сравнении параметров кинетики стационарной активации и инактивации или чувствительности кардиомиоцитов к тому или иному блокатору ионного тока пользовались критерием Фишера.



### 3.12. Реактивы

В работе были использованы следующие реактивы:

Название	Фармакологическая активность	Производитель	Растворитель	Рабочая концентрация
di-4-ANNEPS	Потенциалчувствительный флуоресцентный краситель	Sigma Aldrich	DMSO	5 мкМ
E-4031	Блокатор тока $I_{Kr}$	Tocris Bioscience	H <sub>2</sub> O	10 мкМ
HMR 1556	Блокатор тока $I_{Ks}$	Tocris Bioscience	DMSO	30 мкМ
4-аминопиридин	Блокатор тока $I_{to}$	Santa Cruz Biotechnology	H <sub>2</sub> O	3 мМ
Атропин	Антагонист М-холинорецепторов	Sigma Aldrich	H <sub>2</sub> O	0,5 мг/кг
Ацетилхолин	Агонист ацетилхолиновых рецепторов	Sigma Aldrich	H <sub>2</sub> O	1 мкМ
Блебистатин	Ингибитор миозина II	Sigma Aldrich	DMSO	10 мкМ
Глюкоксиловая кислота	Флуоресцентный маркер симпатических волокон	Sigma Aldrich	H <sub>2</sub> O	2%
Дофетилид	Блокатор тока $I_{Kr}$	Tocris Bioscience	H <sub>2</sub> O	3 мкМ
Изопротеренол	Агонист $\beta$ -адренорецепторов	Sigma Aldrich	H <sub>2</sub> O	200 мкг/кг
Карбахол	Агонист ацетилхолиновых рецепторов	Sigma Aldrich	H <sub>2</sub> O	1 мкМ
Кофеин	Активатор риадиноновых рецепторов	Sigma Aldrich	H <sub>2</sub> O	10 мМ
Нифедипин	Блокатор тока $I_{Ca}$	Sigma Aldrich	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	50 мкМ
Сапонин	Перфоратор клеточных мембран	Fluka	H <sub>2</sub> O	0,2%
Терциапин	Блокатор тока $I_{KACH}$	Tocris Bioscience	H <sub>2</sub> O	1 мкМ
Тетродотоксин	Блокатор тока $I_{Na}$	Sigma Aldrich	H <sub>2</sub> O	1 мкМ

## 4. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 4.1. Электрическая активность сердца перепела in vivo

#### 4.1.1. Характеристики электрокардиограммы перепела в базальных условиях

В базальных условиях конфигурация электрокардиограммы, регистрируемой с помощью подкожных микроэлектродов у наркотизированного японского перепела, имела характерный вид для электрокардиограммы птиц. В цикле выделяли P-волну, PR-интервал, Q-зубец отсутствовал, тогда как QRS-комплекс включал небольшой зубец R и доминантный, направленный в отрицательную сторону зубец S (рис. 17). Частота сокращений сердца перепела в покое составляла  $343,6 \pm 3,3$  уд./мин. ( $n = 6$ ).

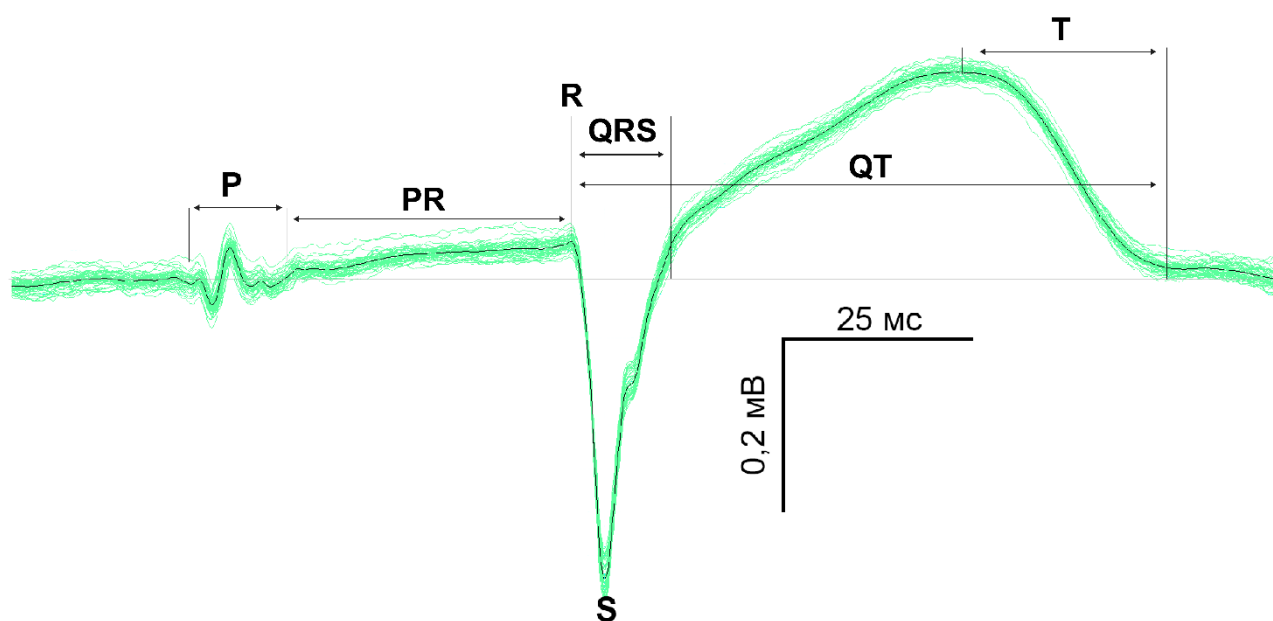


Рис. 17. Репрезентативный пример электрокардиограммы японского перепела в базальных условиях.

Длительность характерных интервалов электрокардиограммы перепела представлены ниже в таб. 3. Поскольку выделить Q-зубец в электрокардиограмме перепела было невозможно, фактически, в работе оценивали не длительность QRS-комплекса и интервала QT, а длительность комплекса от начала зубца R до конца зубца S и интервал RT – однако, для удобства мы предпочли сохранить общепринятые обозначения. Оцениваемые интервалы схематично обозначены на рис. 17.

Таб. 3. Длительность характерных интервалов (в мс) электрокардиограммы наркотизированного японского перепела в базальных условиях ( $n = 6$ ,  $N = 6$ ).

RR	PR	P	QRS	QT	QTc	Tr-Te	TP
159,4±15,9	41,8±2,4	13,76±0,92	17,85±1,06	86,5±3,3	211,0±12,6	21,52±3,62	43,38±4,44

#### 4.1.2. Электрокардиограмма перепела в условиях максимальной симпатической нагрузки

Введение атропина в сочетании с изопротеренолом вызывало значительное увеличение частоты сокращения сердца перепела до  $546,7 \pm 19$  уд./мин. ( $P = 0,0015$ ; парный t-тест Стьюдента), сопровождающееся изменениями в конфигурации регистрируемой электрокардиограммы (рис. 18).

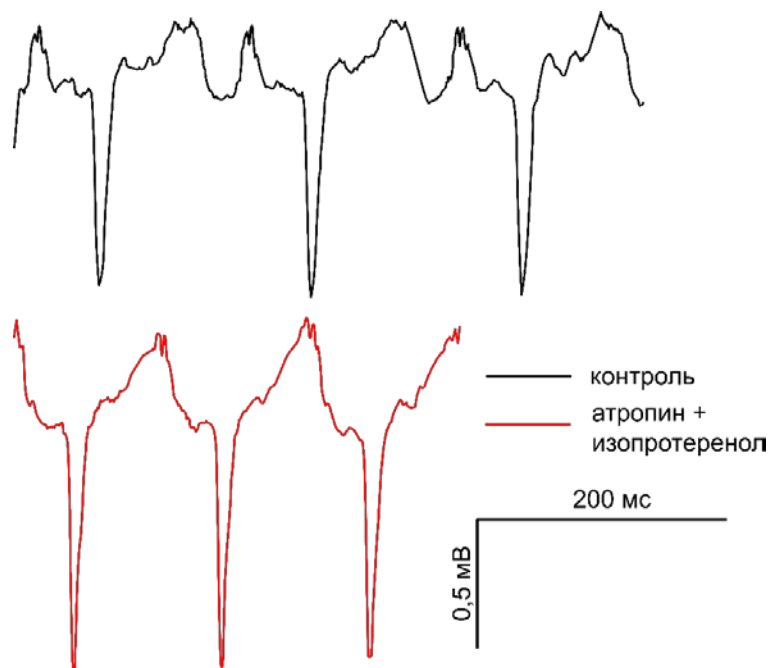


Рис. 18. Репрезентативные примеры электрокардиограммы японского перепела в базальных условиях и при максимальной симпатической нагрузке.

Ускорение частоты сердечных сокращений перепела и сокращение длины сердечного цикла (интервал RR) при симпатической нагрузке происходило за счет уменьшения длительности интервалов QT (на  $20,56 \pm 5,05\%$ ), Tr-Te (на  $50,06 \pm 4,13\%$ ) и межциклового интервала TP – длительность последнего изменилась наиболее сильно (на  $84,4 \pm 13,7\%$ ); также снизилась длительность P-волны (на  $43,8 \pm 3,3\%$ ). Стоит отметить, что интервал QTc, скорректированный по формуле Базетта, остался на том же уровне под симпатической нагрузкой. Изменения прочих параметров электрокардиограммы, а именно длительности интервалов PR и QRS под действием симпатической нагрузки были статистически незначимыми. Влияние симпатической нагрузки на основные параметры электрокардиограммы перепела отражено на рис. 19.

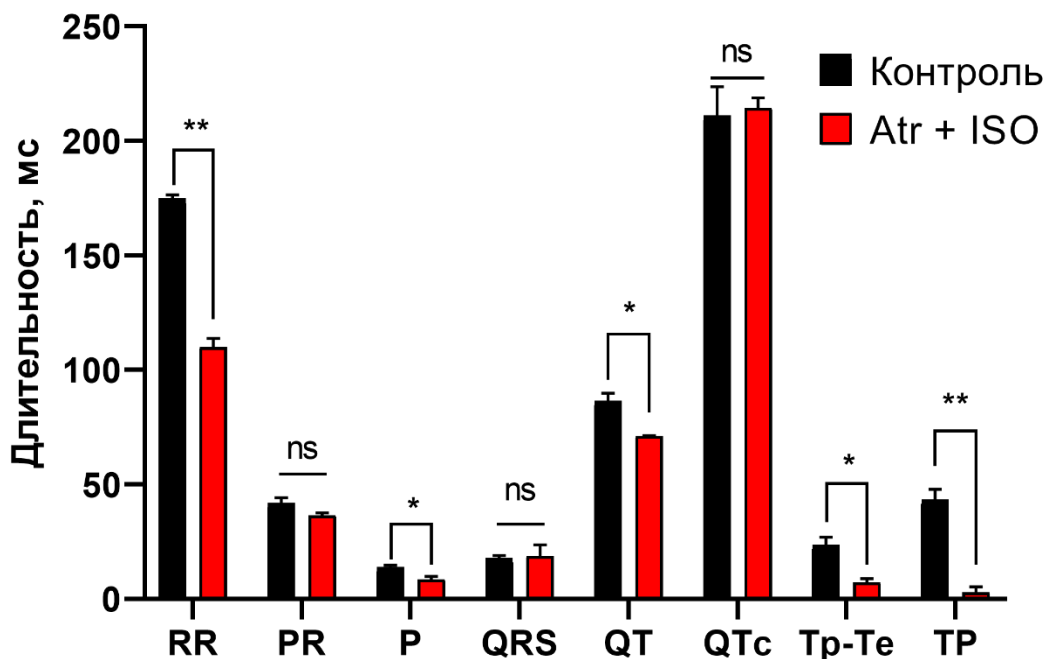


Рис. 19. Влияние симпатической нагрузки на конфигурацию электрокардиограммы японского перепела ( $n = 6$ ;  $N = 6$ ). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; парный t-тест Стьюдента для связанных выборок.

#### 4.2. Адренергическая иннервация миокарда японского перепела

Столь выраженная реакция сердца японского перепела на симпатическую нагрузку предполагает, что функционирование миокарда перепела может быть в значительной степени зависимо от симпатических воздействий. Мы оценили плотность симпатической иннервации желудочкового и предсердного миокарда, а также миокарда межвенной области правого предсердия японского перепела с помощью гистохимического окрашивания тканевых препаратов глиоксиловой кислотой.

Во всех исследованных препаратах окрашивание глиоксиловой кислотой выявило обильную сеть флуоресцентных катехоламинергических волокон. Репрезентативные микрофотографии окрашенных препаратов представлены на рис. 20, А, Б, В.

Анализ плотности и протяженности катехоламинергических волокон не выявил статистически значимых различий между плотностью симпатической иннервации в различных отделах сердца японского перепела (рис. 20, Г, Д) – тем не менее, стоит отметить, что в желудочковом миокарде наблюдалась слабая тенденция к более высокой плотности иннервации.

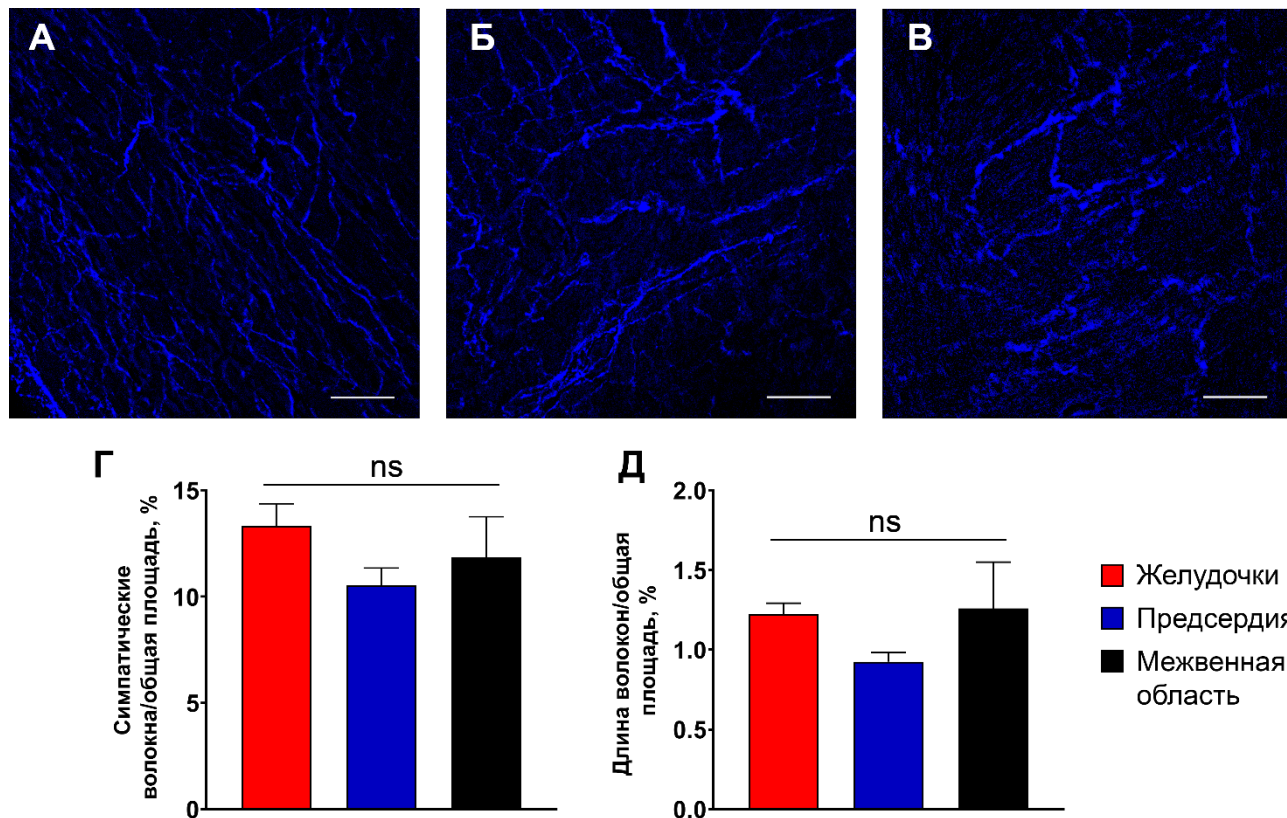


Рис. 20. А, Б, В – репрезентативные микрофотографии, отражающие распределение катехоламинергических (симпатических) нервных волокон в миокарде желудочков, предсердий и межвенной области правого предсердия перепела, соответственно (масштаб – 50 мкм). Г, Д – оценка степени симпатической иннервации миокарда японского перепела, выраженная как отношение площади и длины флуоресцентных волокон, соответственно, к общей площади препаратов.

### **4.3. Конфигурация электрической активности изолированных тканевых препаратов миокарда перепела**

#### **4.3.1. Потенциал покоя в рабочем миокарде перепела**

После периода адаптации все исследованные тканевые препараты миокарда японского перепела демонстрировали стабильный, сильно отрицательный потенциал покоя. Для препаратов правого предсердия был характерен потенциал покоя на уровне  $-81,9 \pm 1,8$  мВ ( $n = 11, N = 11$ ), в препаратах правого желудочка потенциал покоя был на уровне  $-86,16 \pm 1,49$  мВ ( $n = 10, N = 10$ ). Потенциал покоя в препаратах желудочкового миокарда, как правило, был несколько более отрицательным по сравнению с таковым в предсердиях, однако различия не были статистически значимыми ( $P = 0,09$ ; t-тест Стьюдента для несвязанных выборок).

#### **4.3.2. Конфигурация потенциалов действия в рабочем миокарде перепела**

Ни в одном из исследованных препаратов правого желудочка в экспериментальных условиях не наблюдалось спонтанной электрической активности. Препараты правого

предсердия, однако, демонстрировали спонтанную активность, которая прекращалась после отделения участка, включающего места входа в предсердие полых вен (межвенная область) и соответствующего предположительному водителю ритма сердца птиц.

В ответ на электрическую стимуляцию с частотой 6 Гц все исследованные препараты миокарда генерировали потенциалы действия. Репрезентативные примеры потенциалов действия (ПД), зарегистрированных в предсердном и желудочковом миокарде перепела, представлены на рис. 21, А. ПД в правом предсердии имели значительно меньшую длительность по сравнению с таковыми в правом желудочке на уровнях реполяризации 25%, 50% и 90% (рис. 21, Б), различия были статистически значимыми. Кроме того, для желудочковых ПД был характерен более быстрый передний фронт нарастания ( $dV/dt_{max}$ ):  $363,4 \pm 55,5$  В/с ( $n = 10, N = 10$ ), тогда как для переднего фронта предсердных ПД скорость нарастания составляла  $215,6 \pm 21,9$  В/с ( $n = 8, N = 8$ ); описанные различия были статистически значимыми ( $P = 0,0189$ ; t-тест Стьюдента для несвязанных выборок). Параметры ПД, зарегистрированных в предсердных и желудочковых препаратах миокарда перепела, представлены в таб. 4.

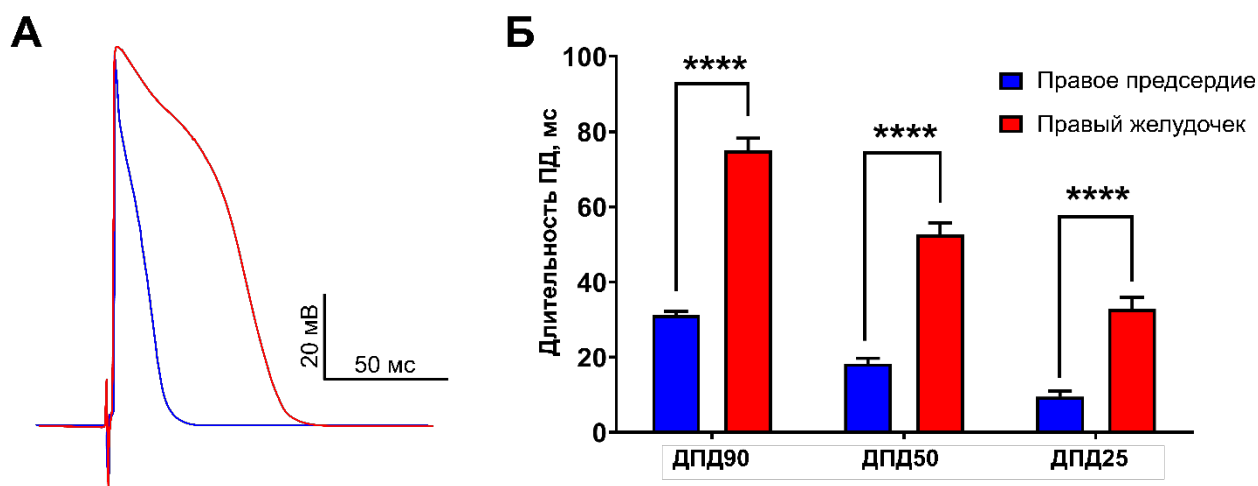


Рис. 21. А – репрезентативные записи ПД в препаратах желудочкового (красный) и предсердного (синий) миокарда японского перепела. Б – сравнение длительностей ПД в желудочковом ( $n = 10, N = 10$ ) и предсердном ( $n = 8, N = 8$ ) миокарде перепела на разных уровнях реполяризации. \*\*\*\* –  $P < 0,01$ , t-тест Стьюдента для несвязанных выборок.

Таб. 4. Параметры ПД в тканевых препаратах предсердного ( $n = 8$ ;  $N = 8$ ) и желудочкового ( $n = 10$ ;  $N = 10$ ) миокарда японского перепела. \* и \*\*\*\* указывают на статистически значимые различия конфигурации желудочковых и предсердных ПД (\* $P < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; t-тест Стьюдента для несвязанных выборок).

	Потенциал покоя, мВ	$dV/dt_{max}$ , В/с	ДПД90, мс	ДПД50, мс	ДПД25, мс
<b>Правое предсердие</b>	$-81,9 \pm 1,8$	$215,6 \pm 21,9^*$	$31,11 \pm 1,05^{****}$	$18,22 \pm 1,46^{****}$	$9,5 \pm 1,5^{****}$
<b>Правый желудочек</b>	$-86,16 \pm 1,49$	$363,4 \pm 55,5^*$	$75,05 \pm 3,22^{****}$	$52,63 \pm 3,06^{****}$	$32,82 \pm 3,11^{****}$

#### 4.4. Морфологические характеристики изолированных кардиомиоцитов перепела

Энзиматически выделенные кардиомиоциты перепела представляли собой сильно вытянутые клетки веретеновидной формы с выраженной поперечной исчерченностью (см. рис 22). Желудочковые кардиомиоциты имели более крупные размеры по сравнению с предсердными: их длина составляла  $186,1 \pm 15,9$  мкм, ширина –  $8,48 \pm 0,37$  мкм ( $n = 28$ ,  $N = 6$ ), тогда как длина предсердных миоцитов составляла  $135,9 \pm 5,3$  мкм, а ширина –  $6,83 \pm 0,38$  мкм ( $n = 27$ ,  $N = 6$ ). Разница в размерах была статистически значимой:  $P < 0,0001$  для длины кардиомиоцитов,  $P < 0,05$  для ширины (t-тест Стьюдента для несвязанных выборок).

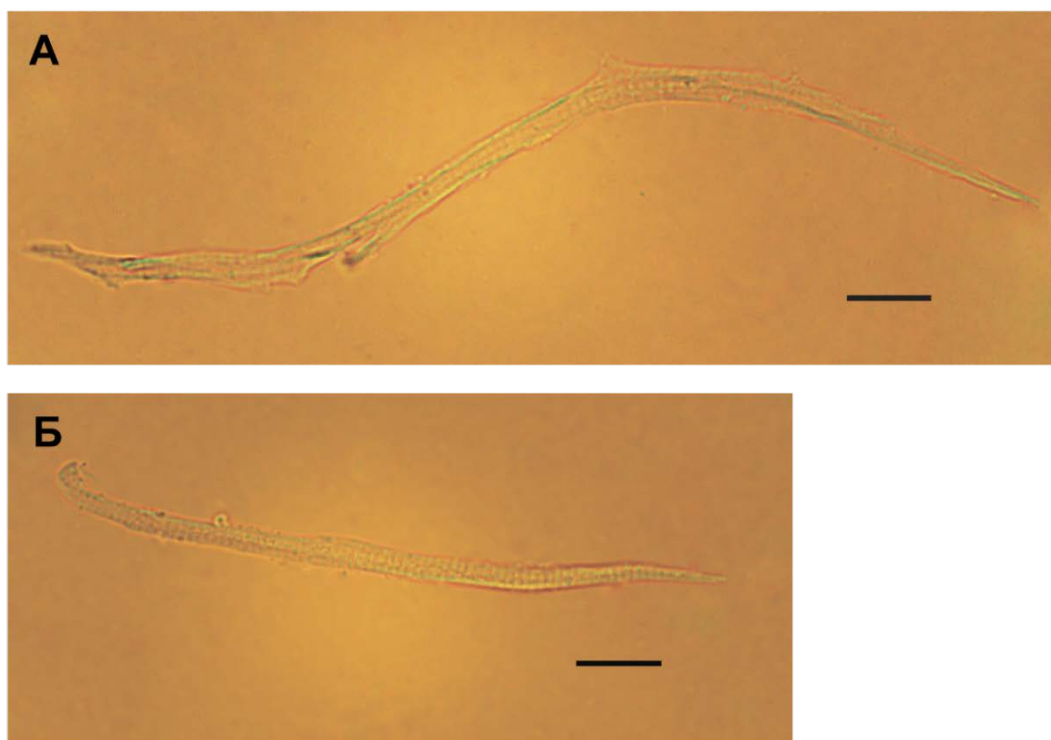


Рис. 22. Микрофотографии изолированных желудочкового (А) и предсердного (Б) кардиомиоцитов японского перепела. Масштаб – 20 мкм.

Разница в размерах кардиомиоцитов была также отражена в разнице в емкости клеток, которая напрямую зависит от площади поверхности клетки. Желудочковые клетки имели статистически значимо большую емкость по сравнению с предсердными: емкость кардиомиоцитов, полученных из желудочков, составляла  $71,97 \pm 2,36$  пФ ( $n = 135$ ,  $N = 43$ ), тогда как предсердные кардиомиоциты имели емкость, равную  $36,75 \pm 0,87$  пФ ( $n = 160$ ,  $N = 52$ ). Различия в емкости клеток также были статистически значимыми ( $P < 0,0001$ ; t-тест Стьюдента для несвязанных выборок).

#### **4.5. Ионные токи в рабочем миокарде перепела**

##### **4.5.1. Реполяризирующие калиевые токи задержанного выпрямления**

После периода адаптации к экспериментальным условиям и установления whole-cell контакта между кардиомиоцитом и пэтч-пипеткой, при использовании калийсодержащих растворов и в присутствии нифедипина при деполяризации клетки до потенциала 0 мВ и выше от поддерживаемого потенциала -80 мВ наблюдали медленно нарастающий выходящий ток, предположительно соответствующий калиевому току задержанного выпрямления. Для более точной идентификации вклада отдельных типов ионных каналов в зарегистрированный суммарный ток задержанного выпрямления было проведено несколько серий экспериментов с использованием селективных блокаторов ионных каналов.

##### *4.5.1.1. Быстрый калиевый ток задержанного выпрямления $I_{Kr}$*

Калиевые токи задержанного выпрямления регистрировали, используя двухступенчатый протокол изменения поддерживаемого потенциала. Поддерживаемый потенциал на первой ступени протокола меняли после каждого шага, длительность ступени была такова, что ток успевал активироваться до максимальных значений; на второй ступени потенциал поддерживали на уровне -20 мВ для оценки тока во время его потенциал-зависимой инактивации (см. рис. 23, на врезке).

После аппликации селективного блокатора быстрого тока задержанного выпрямления  $I_{Kr}$  E-4031 (10 мкМ во внеклеточном растворе) амплитуда суммарного тока задержанного выпрямления, как в предсердных, так и в желудочковых кардиомиоцитах, снижалась, что свидетельствует о том, что зарегистрированный ток отчасти опосредован каналами тока  $I_{Kr}$ .

Амплитуду тока  $I_{Kr}$  оценивали методом вычитания тока, зарегистрированного в присутствии селективного блокатора E-4031, из суммарного тока задержанного выпрямления. Помимо E-4031 в данной работе для подавления тока  $I_{Kr}$  также был использован родственный E-4031 блокатор, дофетилид, – однако, в экспериментальных условиях метода пэтч-кламп для E-4031 была показана более высокая эффективность, что обусловило выбор блокатора в данной серии экспериментов (Ohler и др., 1994). Репрезентативные записи тока  $I_{Kr}$ ,



зарегистрированного в предсердных и желудочковых кардиомиоцитах перепела, представлены на рис. 23, А и Б, соответственно. Амплитуда тока на первой (рис. 23, В) и на второй ступенях протокола (так называемый хвостовой ток, рис. 23, Г) не различались между предсердными и желудочковыми клетками. Вольт-амперные кривые тока  $I_{Kr}$  в рабочих кардиомиоцитах перепела имели характерную для  $I_{Kr}$  у прочих позвоночных форму с максимумом амплитуды тока в области поддерживаемых потенциалов +20-40 мВ (на первой ступени протокола) (Hassinen, Haverinen, Vornanen, 2015; Lu и др., 2001).

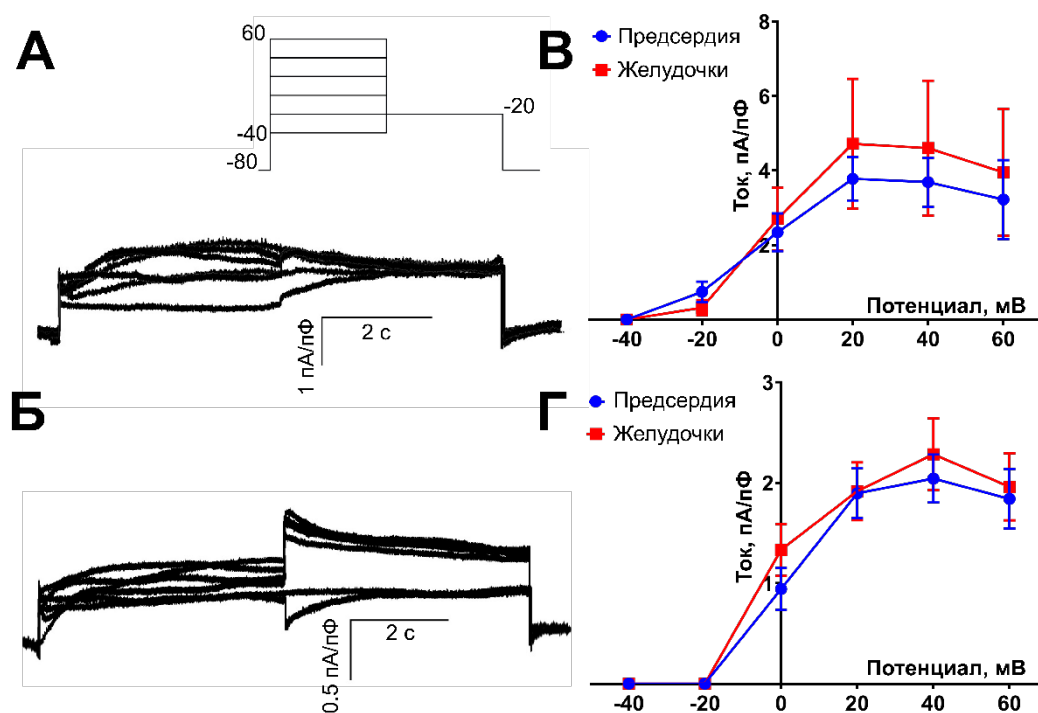


Рис. 23. А, Б – репрезентативные записи быстрого тока задержанного выпрямления  $I_{Kr}$  в изолированных предсердных и желудочковых кардиомиоцитах перепела, соответственно. В, Г – вольт-амперные характеристики тока  $I_{Kr}$ , активируемого на первой ступени протокола (см. врезку) и его хвостового тока, регистрируемого на второй ступени, соответственно, в предсердных ( $n = 12$ ,  $N = 6$ ) и желудочковых ( $n = 9$ ,  $N = 6$ ) кардиомиоцитах перепела.

#### 4.5.1.2. Вклад тока $I_{Kr}$ в формирование электрической активности рабочего миокарда перепела

Для оценки вклада обнаруженного нами тока  $I_{Kr}$  в реполяризацию рабочего миокарда перепела были проведены дополнительные серии экспериментов с тканевыми препаратами миокарда. Было исследовано изменение конфигурации потенциалов действия в препаратах правого предсердия и правого желудочка перепела в присутствии селективного блокатора тока  $I_{Kr}$  дофетилида в составе перфузионного раствора. Прочие условия эксперимента были аналогичными описанным выше в разделах 3.3 и 4.1. Было показано, что дофетилид в концентрации 3 мкМ в значительной степени замедлял реполяризацию как предсердного, так

и желудочкового миокарда перепела (рис. 24, А, Б). Это выражалось в статистически значимом увеличении длительности потенциалов действия в присутствии дофетилида: на уровне 90% реполяризации длительность ПД была увеличена на  $35,50 \pm 13,15\%$  ( $n = 6, N = 6$ ) в препаратах правого предсердия и на  $27,81 \pm 6,68\%$  ( $n = 5, N = 5$ ) в препаратах правого желудочка (рис. 24, В, Г). Дофетилид не вызывал видимых изменений в потенциале покоя ни в одном из исследованных препаратов. Описанные эффекты дофетилида в рабочем миокарде перепела были необратимыми. Таким образом, результаты данных экспериментов свидетельствуют о том, что быстрый ток задержанного выпрямления  $I_{Kr}$  вносит вклад в поздние стадии реполяризации в рабочем миокарде японского перепела.

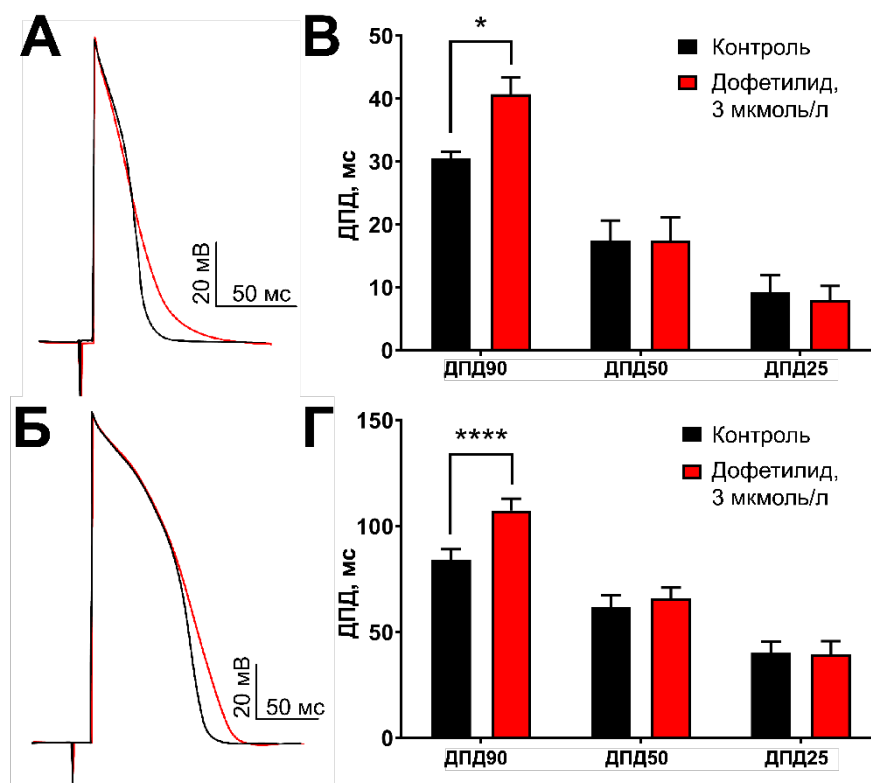


Рис. 24. А, Б – репрезентативные записи ПД в изолированных препаратах предсердного и желудочкового миокарда перепела, соответственно, в контрольных условиях (черный) и в присутствии 3 мкМ селективного блокатора тока  $I_{Kr}$  дофетилида (красный). В, Г – изменение длительности ПД в предсердном ( $n = 6, N = 6$ ) и желудочковом ( $n = 5, N = 5$ ) миокарде перепела, соответственно, под действием дофетилида. \* -  $P < 0,05$ ; \*\*\*\* -  $P < 0,0001$ ; парный t-тест Стьюдента для связанных выборок.

#### 4.5.1.3. Медленный калиевый ток задержанного выпрямления $I_{Ks}$

Блокаторы тока  $I_{Kr}$ , однако, подавляли суммарный ток задержанного выпрямления в кардиомиоцитах перепела лишь отчасти, тогда как основная его компонента была нечувствительна ни к E-4031, ни к дофетилиду. Данный ток полностью подавлялся в присутствии хроманола 293В или его производного HMR 1556 – селективных блокаторов

медленного калиевого тока задержанного выпрямления  $I_{Ks}$ , что позволяет соответствующим образом идентифицировать его. Ток  $I_{Ks}$  имел большую по сравнению с  $I_{Kr}$  амплитуду, являясь преобладающим калиевым током задержанного выпрямления в миокарде перепела. Репрезентативные записи тока  $I_{Ks}$  в предсердных и желудочковых кардиомиоцитах представлены на рис. 25, А и Б. В отличие от тока  $I_{Kr}$ , амплитуда тока  $I_{Ks}$  различалась между предсердными и желудочковыми миоцитами ( $P < 0,0001$ ; t-тест Стьюдента для несвязанных выборок): в желудочковых клетках она была статистически значимо больше и при поддерживаемом потенциале +60 мВ превышала таковую в предсердных клетках в 1,35 раз на первой ступени протокола и в 1,99 раз для хвостового тока (рис. 25, В, Г).

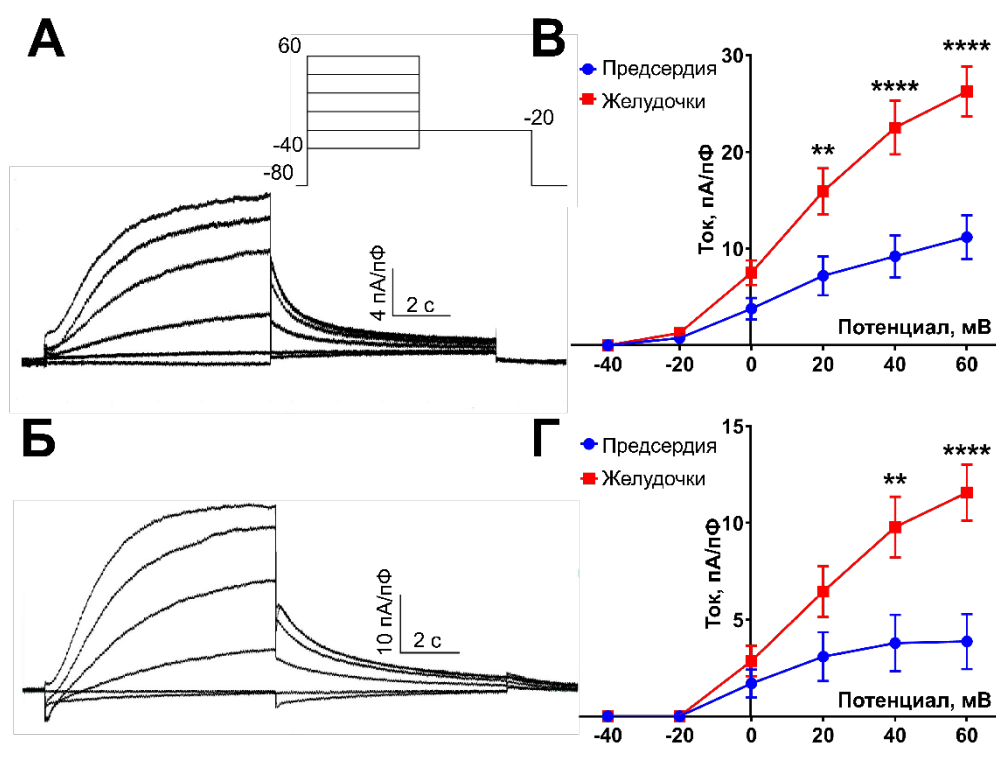


Рис. 25. А, Б – репрезентативные записи медленного тока задержанного выпрямления  $I_{Ks}$  в изолированных предсердных и желудочковых кардиомиоцитах перепела, соответственно. В, Г – вольт-амперные характеристики тока  $I_{Ks}$ , активируемого на первой ступени протокола (см. врезку) и его хвостового тока, регистрируемого на второй ступени, соответственно, в предсердных ( $n = 11$ ,  $N = 5$ ) и желудочковых ( $n = 13$ ,  $N = 6$ ) кардиомиоцитах перепела. \*\* -  $P < 0,01$ ; \*\*\*\* -  $P < 0,0001$ ; t-тест Стьюдента для несвязанных выборок.

Стоит отметить, что поскольку блокаторы тока  $I_{Ks}$  недостаточно селективны и при высоких концентрациях могут подавлять другие ионные токи, запись тока  $I_{Kr}$  в присутствии HMR 1556 была невозможной.

#### 4.5.1.4. Вклад тока $I_{Ks}$ в формирование электрической активности рабочего миокарда перепела

Роль тока  $I_{Ks}$  в реполяризации рабочего миокарда перепела также оценивали с использованием микроэлектродной техники на тканевых препаратах миокарда. HMR 1556 в перфузионном растворе в концентрации 30 мкМ вызывал статистически значимое увеличение длительности потенциалов действия на различных уровнях реполяризации; HMR 1556 в концентрации 1 мкМ был неэффективен (рис. 26, А, Б). На уровне 90% реполяризации HMR 1556 вызывал увеличение длительности ПД на  $12,99 \pm 3,18\%$  в препаратах правого предсердия и на  $11,69 \pm 3,65\%$  в препаратах правого желудочка; на уровне 50% реполяризации увеличение длительности ПД составило  $25,21 \pm 4,74\%$  в предсердном миокарде и  $9,14 \pm 5,89\%$  в желудочковом миокарде (рис. 26, В, Г).

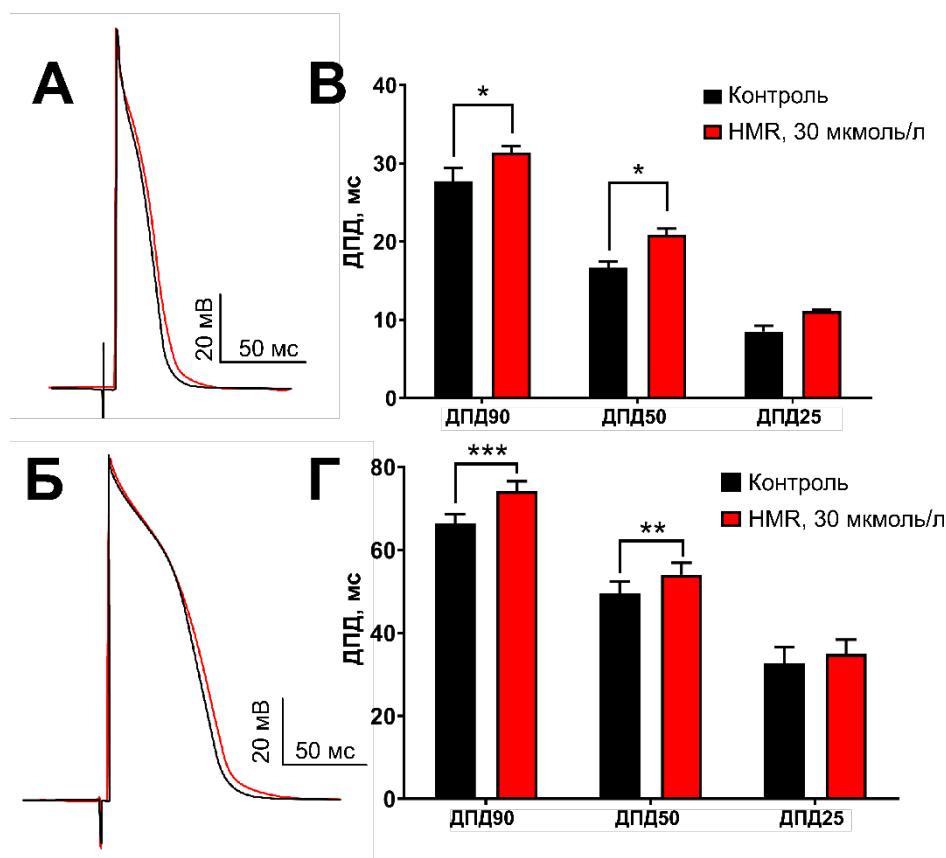


Рис. 26. А, Б – репрезентативные записи ПД в изолированных препаратах предсердного и желудочкового миокарда перепела, соответственно, в контрольных условиях (черный) и в присутствии 30 мкМ блокатора тока  $I_{Ks}$  HMR 1556 (красный). В, Г – изменение длительности ПД в предсердном ( $n = 6$ ,  $N = 6$ ) и желудочковом ( $n = 6$ ,  $N = 6$ ) миокарде перепела, соответственно, под действием HMR 1556. \* -  $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$ ; \*\*\* -  $P < 0,001$ ; парный t-тест Стьюдента для связанных выборок.

#### 4.5.1.5. Чувствительность токов задержанного выпрямления в миокарде перепела к блокаторам

Как упоминалось выше, быстрый калиевый ток задержанного выпрямления  $I_{Kr}$  в рабочем миокарде перепела оказался чувствительным к действию селективных блокаторов E-4031 и его производного дофетилида. Однако, в экспериментах с изолированными кардиомиоцитами E-4031 оказался более эффективен. Эффект E-4031 был дозозависимым (рис. 27, А),  $IC_{50}$  составила 2 мкМ в предсердных клетках и 9 мкМ в желудочковых – таким образом, кривая дозозависимости эффекта E-4031 для желудочковых клеток была сдвинута вправо (статистически значимая разница между  $IC_{50}$ ;  $P = 0,0004$ , критерий Фишера).

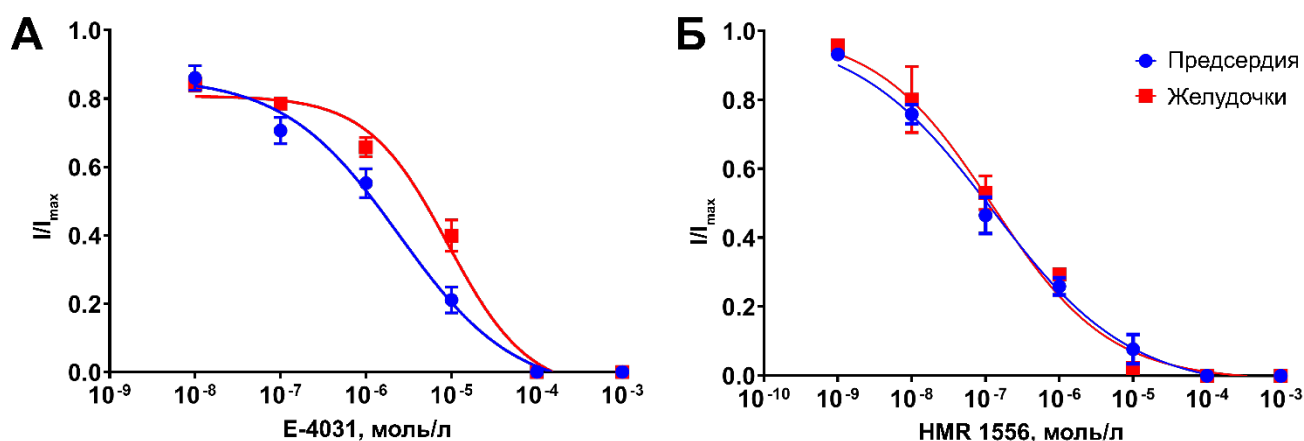


Рис. 27. А – кривая дозозависимости подавления тока  $I_{Kr}$  селективным блокатором E-4031 в предсердных ( $n = 6$ ,  $N = 5$ ) и желудочковых ( $n = 5$ ,  $N = 4$ ) изолированных кардиомиоцитах. Б – кривая дозозависимости подавления тока  $I_{Ks}$  блокатором HMR 1556 в предсердных ( $n = 6$ ,  $N = 3$ ) и желудочковых ( $n = 7$ ,  $N = 4$ ) изолированных кардиомиоцитах.

Эффект блокатора медленного тока задержанного выпрямления  $I_{Ks}$  также был дозозависимым (рис. 27, Б), однако чувствительность тока к блокатору не различалась между предсердными и желудочковыми кардиомиоцитами: в предсердиях  $IC_{50}$  составила 63 нМ, в желудочковых – 142 нМ ( $P = 0,1506$ ; критерий Фишера).

### 4.5.2. Транзиторный выходящий калиевый ток $I_{to}$

#### 4.5.2.1. Транзиторный выходящий ток в изолированных кардиомиоцитах перепела

В условиях полного подавления кальциевого тока нифедипином (10 мкМ), быстрого натриевого тока – тетродотоксином (1 мкМ), быстрого тока задержанного выпрямления E-4031 (3 мкМ) и медленного тока задержанного выпрямления HMR 1556 (10 мкМ) деполяризация изолированных кардиомиоцитов перепела, как предсердных, так и желудочковых, вызывала в некоторых клетках появление быстро активирующегося и быстро

инактивирующегося тока выходящего направления (рис. 28, А, Б). Ток обратимо подавлялся 4-аминопиридином (3 мМ).

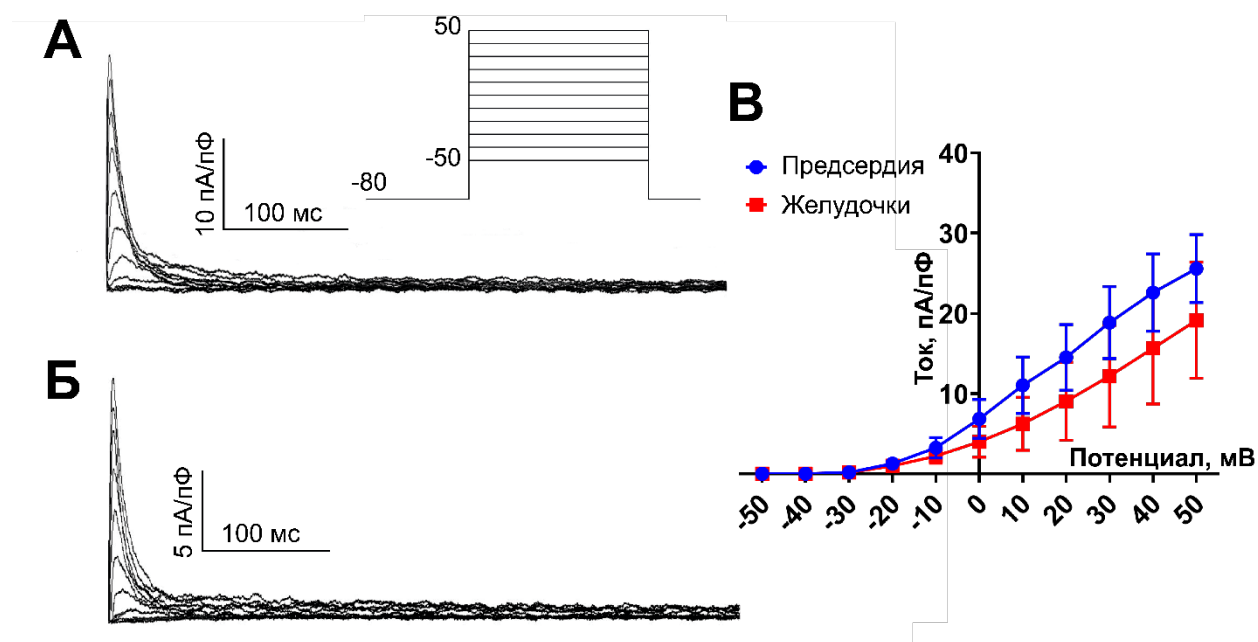


Рис. 28. А, Б – репрезентативные записи транзиторного выходящего тока  $I_{to}$  в изолированных предсердных и желудочковых кардиомиоцитах перепела, соответственно. В – вольт-амперные характеристики тока  $I_{to}$  в изолированных предсердных ( $n = 7$ ,  $N = 5$ ) и желудочковых ( $n = 5$ ,  $N = 4$ ) кардиомиоцитах перепела.

Принимая во внимание в совокупности кинетику данного тока, его независимость от внутриклеточного кальция, чувствительность к 4-аминопиридину, а также форму вольт-амперной характеристики (рис. 28, В), мы идентифицировали данный ток как транзиторный выходящий калиевый ток, известный также как  $I_{to}$ . Ток  $I_{to}$  ранее не обнаруживали в миокарде птиц. Амплитуда тока  $I_{to}$  не различалась между желудочковыми и предсердными миоцитами.

#### 4.5.2.2. Вклад тока $I_{to}$ в формирование электрической активности рабочего миокарда перепела

В изолированных препаратах рабочего миокарда перепела 4-аминопиридин (3 мМ) вызывал статистически значимое замедление реполяризации (рис. 29, А, Б). В препаратах правого предсердия увеличение длительности ПД на уровнях 25% и 50% реполяризации составило, соответственно,  $37,45 \pm 4,61\%$  и  $18,63 \pm 3,26\%$ , а в препаратах правого желудочка –  $33,52 \pm 4,15\%$  и  $15,77 \pm 2,70\%$ . Изменений в уровне мембранного потенциала покоя в ответ на действие 4-аминопиридина не наблюдали (рис. 29, В, Г).

Однако, принимая во внимание неселективность действия 4-аминопиридина, можно предположить, что наблюдаемые в изолированных препаратах миокарда изменения

длительности ПД в ответ на аппликацию 4-аминопиридина были обусловлены подавлением ультрабыстрого калиевого тока задержанного выпрямления  $I_{Kur}$ , чувствительного к 4-аминопиридину в концентрации 100 мкМ (Yue и др., 1996). Тем не менее, в концентрации 100 мкМ 4-аминопиридин не вызывал видимых изменений в конфигурации электрической активности рабочего миокарда перепела, что позволяет сделать вывод об отсутствии вклада тока  $I_{Kur}$  в электрическую активность рабочего миокарда перепела.

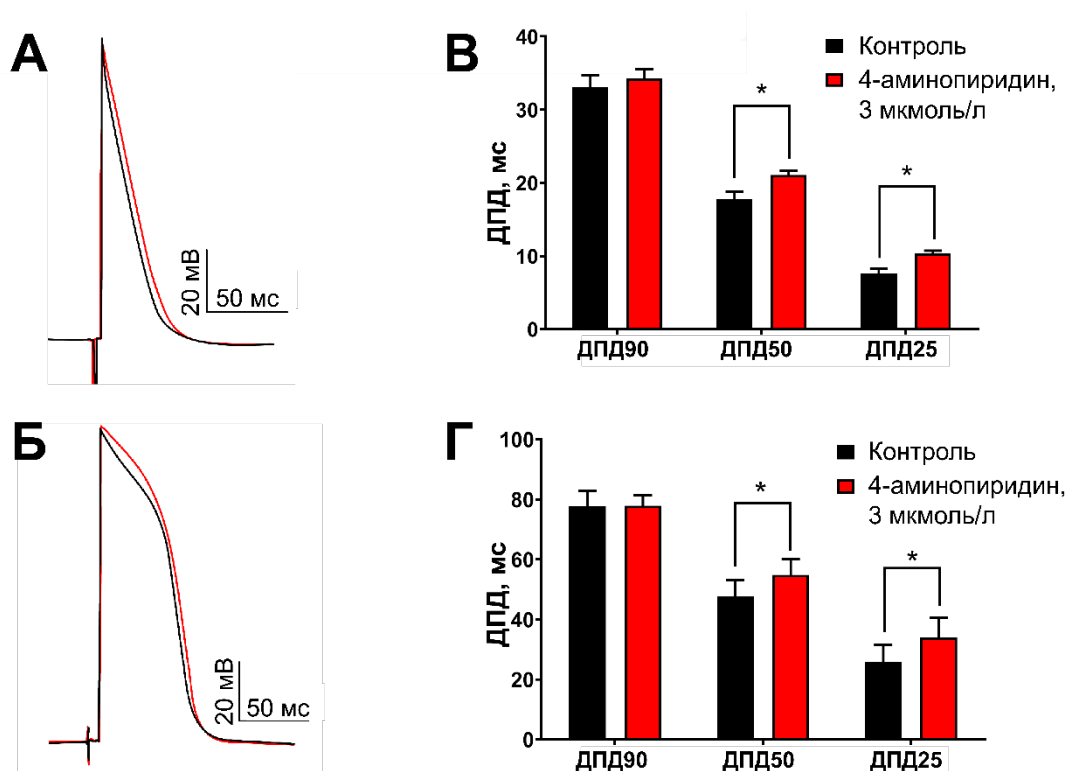


Рис. 29. А, Б – репрезентативные записи ПД в изолированных препаратах предсердного и желудочкового миокарда перепела, соответственно, в контрольных условиях (черный) и в присутствии 3 мМ блокатора тока  $I_{to}$  4-аминопиридина (красный). В, Г – изменение длительности ПД в предсердном ( $n = 5$ ,  $N = 5$ ) и желудочковом ( $n = 6$ ,  $N = 6$ ) миокарде перепела, соответственно, под действием 4-аминопиридина. \* -  $P < 0,05$ ; парный t-тест Стьюдента для связанных выборок.

#### 4.5.3. Молекулярные корреляты основных реполяризирующих калиевых токов в рабочем миокарде перепела

##### 4.5.3.1. Экспрессия мРНК основных каналов, переносящих токи $I_{Kr}$ ( $Kv11.1$ ), $I_{Ks}$ ( $Kv7.1$ ) и $I_{to}$ ( $Kv4.3$ )

Используя метод количественной ПЦР в реальном времени, мы оценили относительную экспрессию мРНК трех основных генов, соответствующих порообразующим субъединицам доминантных реполяризирующих калиевых токов в рабочем миокарде перепела:  $Kv11.1$

(соответствует каналам тока  $I_{Kr}$ ), Kv7.1 (соответствует каналам тока  $I_{Ks}$ ) и Kv4.3 (соответствует каналам тока  $I_{to}$ ). Данные гены экспрессировались как в предсердном, так и в желудочковом миокарде (рис. 30). Однако, разница в относительных уровнях экспрессии того или иного гена между предсердным и желудочковым миокардом была статистически незначимой ( $P = 0,2296$  для Kv11.1;  $P = 0,4691$  для Kv7.1;  $P = 0,7817$  для Kv4.3; t-тест Стьюдента для несвязанных выборок;  $n = 6$ ,  $N = 6$  для каждого сравнения).

Данные результаты отчасти противоречат данным, полученным методом пЭТЧ-кламп: принимая во внимание обнаруженную разницу в амплитуде тока  $I_{Ks}$  между желудочковыми и предсердными кардиомиоцитами, мы ожидали увидеть более высокий уровень экспрессии гена Kv7.1 в миокарде желудочков по сравнению с предсердной тканью.

Поскольку праймеры для данного исследования были сконструированы и синтезированы впервые, их относительная эффективность неизвестна, поэтому представляется невозможным провести прямое сравнение уровней относительной экспрессии между отдельными генами. Тем не менее, можно заметить, что уровень экспрессии Kv4.3, как в желудочковом, так и в предсердном миокарде, характеризуется несколько меньшими значениями и большим разбросом – что, в целом, соответствует высокогетерогенному распределению данных каналов среди обоих типов кардиомиоцитов, продемонстрированных в экспериментах с использованием метода пЭТЧ-кламп.

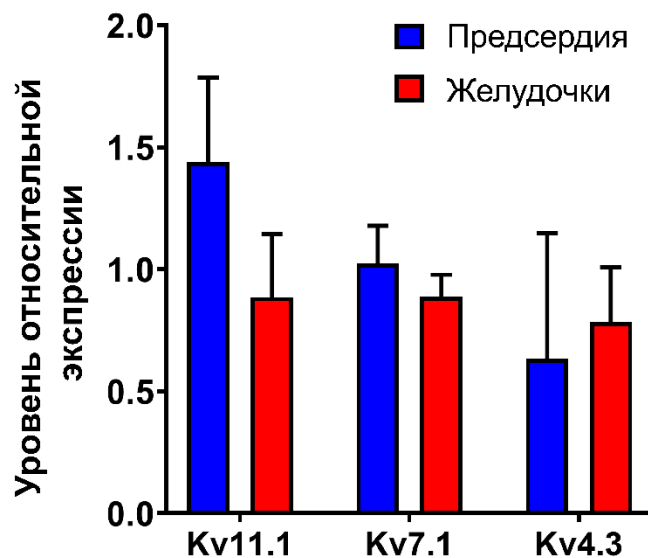


Рис. 30. Относительные уровни экспрессии генов Kv11.1, Kv7.1 и Kv4.3 в предсердном ( $n = 6$ ,  $N = 6$ ) и желудочковом ( $n = 6$ ,  $N = 6$ ) миокарде японского перепела.



#### 4.5.3.2. Иммуоцитохимическое окрашивание изолированных кардиомиоцитов перепела

Иммуоцитохимическое окрашивание показало, что изолированные кардиомиоциты птиц пригодны для окрашивания по крайней мере некоторыми антителами, произведенными против белков млекопитающих. На рис. 31 представлен результат окрашивания кардиомиоцитов перепела антителами против  $\alpha$ -актинина, эффективность которых была ранее показана для широкого спектра видов организмов (Svensson Holm и др., 2014). Зеленая флюоресценция, соответствующая красителю Alexa 488, конъюгированному со вторичными антителами, наблюдалась внутри клеток и формировала поперечную исчерченность на границах саркомерах, что соответствует локализации  $\alpha$ -актинина в клетках миокарда (Chopra и др., 2018). Таким образом, изолированные кардиомиоциты перепела в рамках данной работы были пригодны для иммуоцитохимической окраски.

Однако, окрашивание кардиомиоцитов антителами против  $\alpha$ -субъединиц калиевых каналов Kv11.1, Kv7.1, и Kv4.3 не было успешным. В кардиомиоцитах перепела, окрашенных с использованием данных антител, на клеточных мембранах не наблюдалось специфических меток, превышающих интенсивность фоновой флюоресценции.

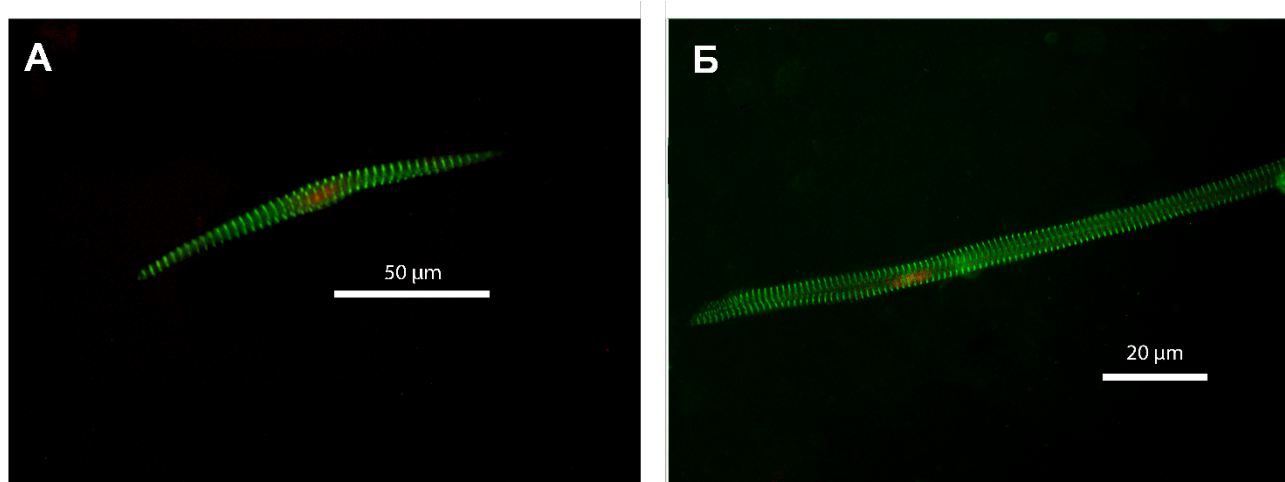


Рис. 31. Репрезентативные микрофотографии изолированных предсердного (А) и желудочкового (Б) кардиомиоцитов перепела, окрашенных с использованием антител против  $\alpha$ -актинина (Alexa 488). Ядра окрашены красным за счет присутствия в среде для монтирования иодида пропидия.

#### 4.5.3.3. Вестерн-блоттинг каналов Kv11.1, Kv7.1 и Kv4.3

Репрезентативные снимки результатов вестерн-блоттинга белков Kv11.1, Kv7.1 и Kv4.3 представлены на рис. 32. В образцах предсердного и желудочкового миокарда перепела, а также желудочкового миокарда морской свинки (контрольный образец) вестерн-блоттинг с

использованием антител против Kv11.1 выявил белок с молекулярной массой около 130 кДа, что приблизительно соответствует молекулярной массе  $\alpha$ -субъединицы канала Kv11.1 (Anderson и др., 2014).

Вестерн-блоттинг с использованием антител против Kv7.1 выявил в образцах желудочкового и предсердного миокарда перепела, а также желудочкового миокарда морской свинки белок с молекулярной массой около 65 кДа, что соответствует массе  $\alpha$ -субъединицы белка Kv7.1 (Zankov и др., 2019) – однако, также в пробах был выявлен связывающий те же антитела белок с молекулярной массой около 130 кДа, что, предположительно, может указывать на присутствие димеров Kv7.1 – или, что более вероятно, на неспецифическое связывание антитела с другим белком.

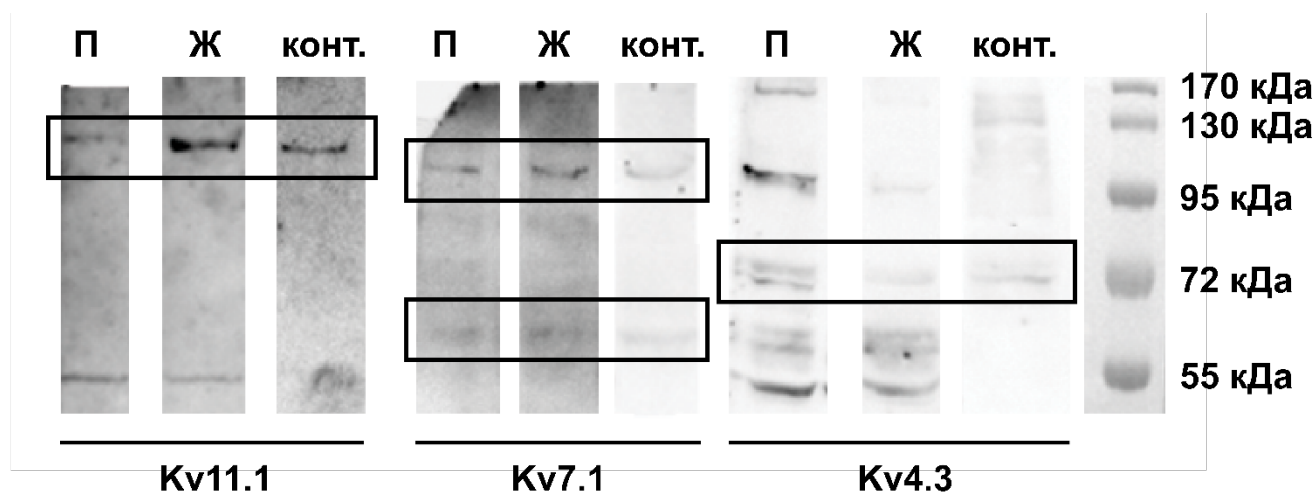


Рис. 32. Репрезентативные снимки мембран, полученных методом вестерн-блоттинга предсердного (П) и желудочкового (Ж) миокарда перепела с использованием антител против белков Kv11.1, Kv7.1 и Kv4.3. В качестве контрольного образца в зависимости от исследуемого белка использовали миокард морской свинки или крысы (см. текст).

В экспериментах с использованием антител против белка Kv4.3 в образцах предсердного и желудочкового миокарда перепела, а также в желудочковом миокарде крысы (контрольный образец) был выявлен белок с молекулярной массой в области 73 кДа, причем в предсердном миокарде перепела интенсивность окрашивания антителами была несколько более выраженной. Стоит отметить, что в предсердном миокарде перепела и миокарде крысы полоска на уровне 73 кДа была двойной – что может указывать на возможное фосфорилирование данного белка. Кроме того, в предсердном миокарде перепела окрашивание антителами к Kv4.3 выявило полоску белка с электрофоретической подвижностью на уровне 100 кДа, что может соответствовать гликозилированной форме белка (Oudit и др., 2001; Vicente и др., 2018).

Однако, использованные антитела, в особенности против Kv11.1 и Kv4.3, продемонстрировали высокую степень неспецифического связывания, в частности, в области молекулярной массы 55 кДа.

#### 4.5.4. Калиевые токи входящего выпрямления

##### 4.5.4.1. Фоновый калиевый ток входящего выпрямления $I_{K1}$

Токи входящего выпрямления регистрировали методом пэтч-кламп в изолированных кардиомиоцитах, в присутствии тетродотоксина, нифедипина и HMR 1556 для подавления, соответственно, быстрого натриевого тока, входящего кальциевого тока и медленного калиевого тока задержанного выпрямления  $I_{Ks}$ , которые могли бы исказить регистрируемый ток. Как в предсердных, так и в желудочковых кардиомиоцитах перепела, при изменении поддерживаемого потенциала по линейному протоколу (см. рис. 33, А, врезка) наблюдали не инактивирующийся со временем ток с заметным преобладанием выходящей компоненты над входящей. Амплитуда как входящей, так и выходящей компоненты тока в желудочковых кардиомиоцитах перепела была статистически значимо выше по сравнению с таковой в предсердных кардиомиоцитах (рис. 33, А, Б). Как в предсердных, так и в желудочковых миоцитах ток полностью подавлялся в присутствии 1 мМ ВаСl. Исходя из этих фактов в совокупности с формой вольт-амперной характеристики тока (рис. 33, А), данный ток был идентифицирован как фоновый ток входящего выпрямления  $I_{K1}$ .

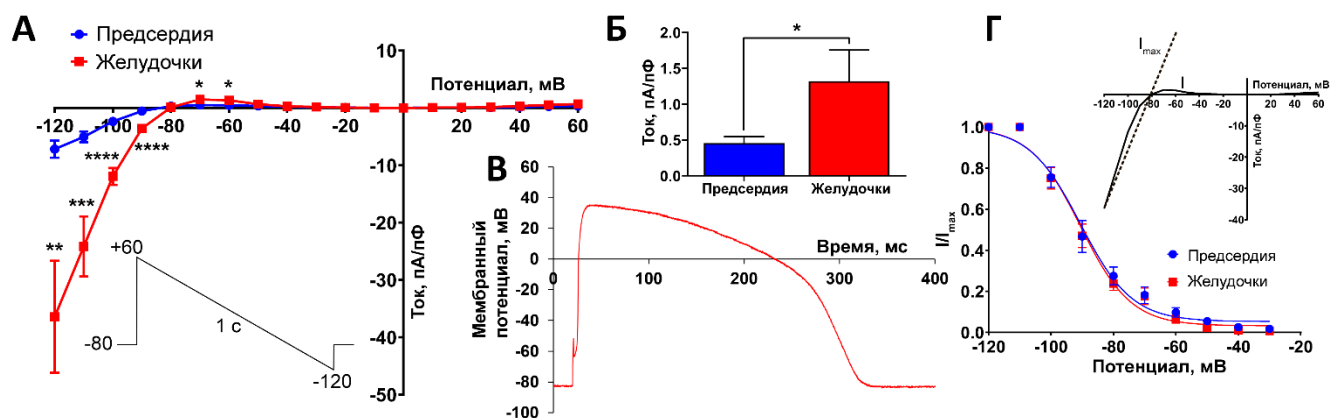


Рис. 33. А – вольт-амперные характеристики тока  $I_{K1}$  в предсердных ( $n = 9$ ,  $N = 4$ ) и желудочковых ( $n = 8$ ,  $N = 4$ ) кардиомиоцитах перепела. Б – средние амплитуды выходящей компоненты тока  $I_{K1}$  в предсердных и желудочковых кардиомиоцитах перепела при потенциале +60 мВ. В – потенциал действия в изолированном желудочковом кардиомиоците перепела. Г – зависимость степени выпрямления тока  $I_{K1}$  в предсердных и желудочковых миоцитах перепела от поддерживаемого потенциала. \* –  $P < 0,05$ ; \*\* –  $P < 0,01$ ; \*\*\* –  $P < 0,001$ ; \*\*\*\* –  $P < 0,0001$ ; t-тест Стьюдента для несвязанных выборок.

Благодаря значительной амплитуде тока  $I_{K1}$  желудочковые кардиоциты перепела оказались способными поддерживать стабильный отрицательный мембранный потенциал в режиме поддержания тока (current clamp), что в свою очередь позволило регистрировать потенциалы действия в изолированных клетках (рис. 33, В). Однако, в предсердных кардиомиоцитах амплитуда  $I_{K1}$  оказалась недостаточной, что делало регистрацию ПД с использованием методом пэтч-кламп невозможной – таким образом, во всех прочих сериях экспериментов, включающих регистрацию ПД, электрическую активность миокарда регистрировали с использованием стандартной микроэлектродной техники.

Оценка степени выпрямления тока  $I_{K1}$  показала, что зависимость данного параметра от поддерживаемого потенциала в предсердных и желудочковых миоцитах перепела была сходной (рис. 33, Г). Потенциал 50% выпрямления  $V_{0,5}$  в желудочковых кардиомиоцитах находился на уровне -90,51 мВ, в предсердных клетках – на уровне -90,49 мВ ( $P = 0,9878$ ; критерий Фишера).

#### 4.5.4.2. Ацетилхолинзависимый ток входящего выпрямления $I_{KACH}$

В изолированных предсердных кардиомиоцитах перепела аппликация 1 мкМ карбахола приводила к выраженному увеличению амплитуды входящей и выходящей компонент суммарного тока входящего выпрямления (рис. 34, А). Активируемый ток был чувствителен к селективному блокатору ацетилхолинзависимого тока входящего выпрямления  $I_{KACH}$  терциапину (1 мкМ), что позволяет идентифицировать его соответствующим образом. В желудочковых кардиомиоцитах карбахол не вызывал изменений в конфигурации тока входящего выпрямления (рис. 34, Б), что говорит об отсутствии тока  $I_{KACH}$  в желудочковом миокарде перепела. Терциапин в отсутствие карбахола также не вызывал видимых изменений тока входящего выпрямления в предсердных и желудочковых миоцитах, что свидетельствует об отсутствии конститутивно активного тока  $I_{KACH}$ .

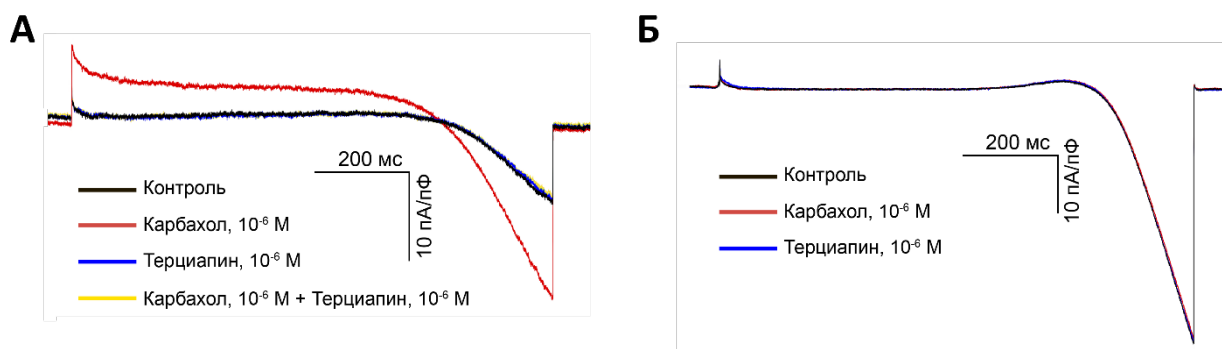


Рис. 34. Ацетилхолинзависимый ток  $I_{KACH}$  в рабочем миокарде перепела: оригинальные записи суммарного тока входящего выпрямления в предсердных (А) и желудочковых (Б) миоцитах перепела в контрольных условиях, в присутствии агониста ацетилхолинзависимых рецепторов карбахола (1 мкМ) и/или селективного блокатора тока  $I_{KACH}$  терциапина (1 мкМ).

В предсердных кардиомиоцитах перепела наблюдаемая в присутствии карбахола активация тока  $I_{KAcH}$  имела дозозависимый характер (рис. 35, А). Полумаксимальная эффективная концентрация ( $EC_{50}$ ) для карбахола составила 492,2 нМ (рис. 35, Б).

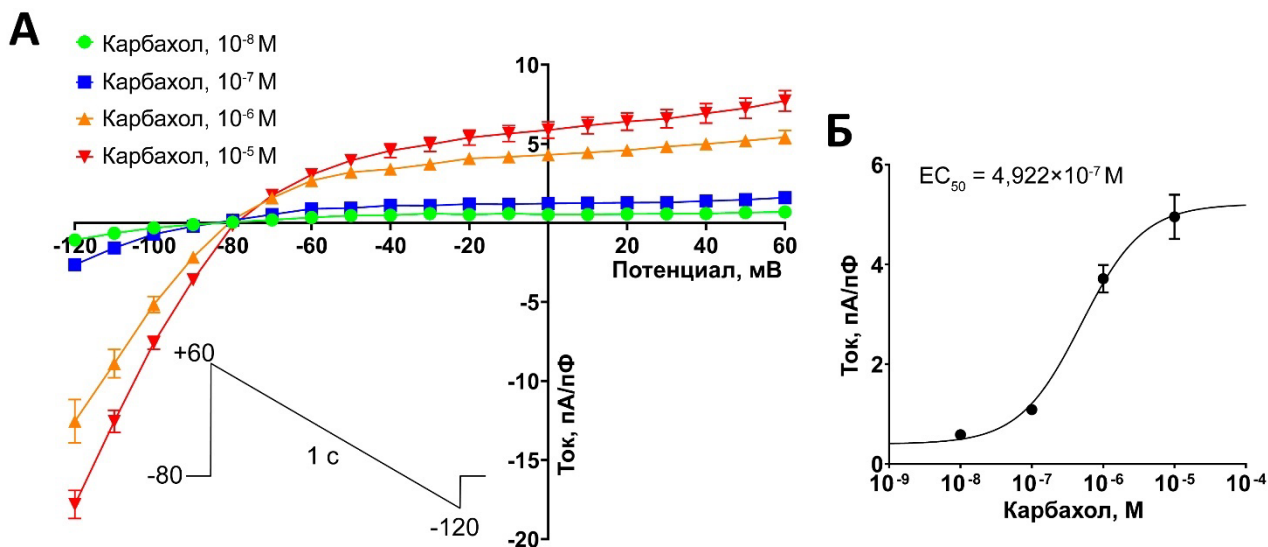


Рис. 35. А – вольт-амперные характеристики тока  $I_{KAcH}$  в присутствии карбахола в концентрациях  $10^{-8}$  ( $n = 6$ ),  $10^{-7}$  ( $n = 7$ ),  $10^{-6}$  ( $n = 8$ ) и  $10^{-5}$  М ( $n = 7$ ). Б – кривая дозозависимости активации тока  $I_{KAcH}$  карбахолом при потенциале -30 мВ.

#### 4.5.4.3. Вклад ацетилхолинзависимого тока $I_{KAcH}$ в формирование электрической активности миокарда перепела

Оценку вклада ацетилхолинзависимого тока  $I_{KAcH}$  в формирование электрической активности рабочего миокарда перепела оценивали на тканевых препаратах миокарда с использованием микроэлектродной техники. В препаратах предсердного миокарда аппликация карбахола вызывала гиперполяризацию и укорочение потенциалов действия (рис. 36, А). Сдвиг потенциала покоя миокарда и снижение длительности ПД на уровне 90% реполяризации были статистически значимыми (рис. 36, В, Г). В препаратах желудочкового миокарда аппликация карбахола не вызывала каких-либо изменений (рис. 36, Б), что позволяет сделать вывод об отсутствии каналов ацетилхолинзависимого тока входящего выпрямления  $I_{KAcH}$  в миокарде желудочков перепела.

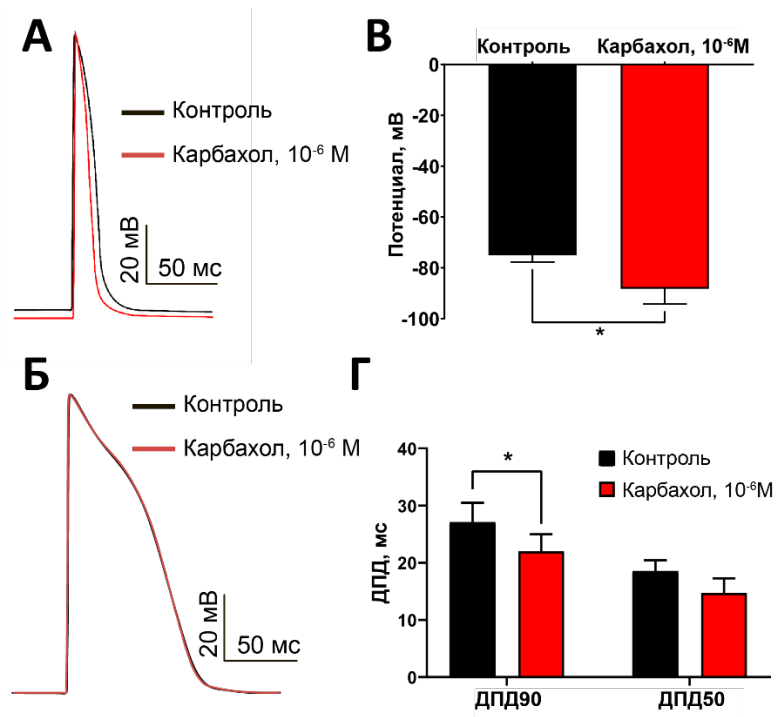


Рис. 36. А, Б – оригинальные записи потенциалов действия в предсердном и желудочковом миокарде в контрольных условиях (черный) и в присутствии 1 мкМ карбахола (красный). В, Г – мембранный потенциал покоя и длительность потенциалов действия, соответственно, в предсердном миокарде в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ карбахола ( $n = 6$ ,  $N = 6$ ). \* –  $P < 0,05$ ; критерий Вилкоксона.

#### 4.5.5. Кальциевые токи

Кальциевые токи в изолированных кардиомиоцитах перепела регистрировали с использованием прямоугольных деполяризующих импульсов от поддерживаемого потенциала  $-90$  мВ в присутствии тетродотоксина и в отсутствие ионов  $K^+$  во всех используемых растворах для подавления, соответственно, натриевого и калиевых токов. Сарколеммальный кальциевый ток  $I_{Ca}$  активировался при поддерживаемых потенциалах  $-40$  мВ и более положительных и присутствовал как в предсердных (рис. 37, А), так и в желудочковых (рис. 37, Б) кардиомиоцитах перепела. Пиковая амплитуда тока  $I_{Ca}$  была статистически значимо выше в желудочковых миоцитах по сравнению с предсердными (рис. 37, В). Максимальная пиковая амплитуда  $I_{Ca}$  наблюдалась при поддерживаемом потенциале  $0$  мВ; в желудочках она достигала  $-10,20 \pm 1,15$  пА/пФ. Как в предсердных, так и в желудочковых кардиомиоцитах ток  $I_{Ca}$  был чувствителен к действию нифедипина ( $50$  мкМ).

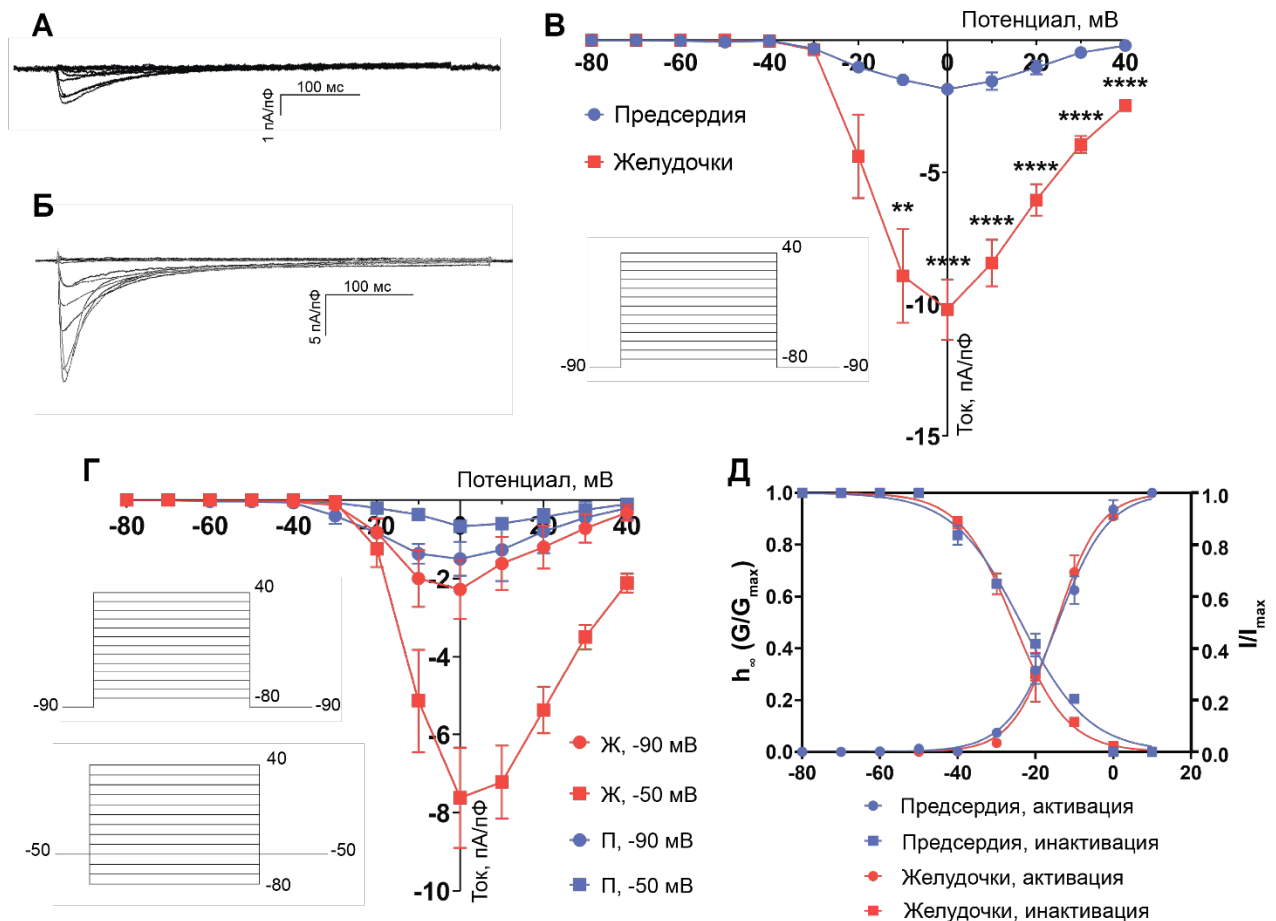


Рис. 37. А, Б – репрезентативные записи тока  $I_{Ca}$  в предсердных и желудочковых миоцитах перепела. В – вольт-амперные характеристики суммарного тока  $I_{Ca}$  в предсердных ( $n = 7$ ,  $N = 3$ ) и желудочковых ( $n = 8$ ,  $N = 3$ ) кардиомиоцитах перепела. Г – вольт-амперные характеристики компонент  $I_{Ca}$ , зарегистрированных от поддерживаемых потенциалов  $-50$  мВ (L) и  $-90$  мВ (T) в предсердных ( $n = 6$ ;  $N = 3$ ) и желудочковых ( $n = 7$ ,  $N = 3$ ) кардиомиоцитах перепела. Протоколы изменения мембранного потенциала показаны на врезках. Д – параметры стационарной кинетики тока  $I_{Ca}$  в предсердных ( $n = 9$ ;  $N = 4$ ) и желудочковых ( $n = 8$ ,  $N = 4$ ) кардиомиоцитах перепела.  $**P < 0,01$ ;  $****P < 0,0001$ ; t-тест Стьюдента для несвязанных выборок.

Несмотря на отсутствие видимого входящего тока при потенциалах отрицательнее  $-40$  мВ, для проверки предположения о возможном наличии кальциевого тока Т-типа в миокарде перепела мы попытались разделить возможные компоненты суммарного кальциевого тока, используя различные протоколы изменения мембранного потенциала. Исходя из того, что  $Ca^{2+}$  ток Т-типа активируется при более отрицательных мембранных потенциалах по сравнению с током L-типа и инактивируется при потенциалах положительнее  $-50$  мВ, мы предположили, что ток, регистрируемый от поддерживаемого потенциала  $-50$  мВ будет соответствовать  $Ca^{2+}$  току L-типа. Вычитание данной компоненты из суммарного  $Ca^{2+}$  тока, зарегистрированного

от поддерживаемого потенциала  $-90$  мВ, будет давать компоненту, соответствующую, по нашим предположениям,  $\text{Ca}^{2+}$  току Т-типа (рис. 37, Г, см. врезки).

Однако, несмотря на видимое различие в амплитуде двух компонент, как в предсердных, так и в желудочковых миоцитах перепела предполагаемые L- и Т-токи активировались при потенциалах положительнее  $-40$  мВ и имели максимум пиковой амплитуды тока при  $0$  мВ (рис. 37, Г). В совокупности с относительно высокой чувствительностью тока к нифедипину, это позволяет сделать вывод о том, что  $\text{Ca}^{2+}$  ток в рабочем миокарде перепела представлен только каналами L-типа, тогда как  $\text{Ca}^{2+}$  ток Т-типа отсутствует.

Анализ параметров стационарной кинетики (рис. 37, Д) показал, что параметры кривой активации тока  $I_{\text{Ca}}$  – наклон и потенциал 50% активации  $V_{50}$  – не различаются между предсердными и желудочковыми кардиомиоцитами перепела ( $P = 0,4515$  для  $V_{50}$ ;  $P = 0,133$  для наклона кривой; критерий Фишера). В предсердных миоцитах  $V_{50}$  составил  $-16,24$  мВ, в желудочковых  $-15,9$  мВ. Однако, параметры стационарной инактивации между популяциями клеток различались: в предсердных клетках потенциал 50% инактивации  $V_{50}$  был сдвинут в сторону более положительных значений ( $P = 0,0034$ ; критерий Фишера), как и коэффициент наклона кривой ( $P = 0,0007$ ; критерий Фишера). В предсердных клетках  $V_{50}$  составил  $-23,72$  мВ, в желудочковых  $-25,65$  мВ.

#### 4.5.6. Быстрый натриевый ток $I_{\text{Na}}$

Быстрый натриевый ток  $I_{\text{Na}}$  регистрировали с использованием прямоугольных деполяризующих импульсов от поддерживаемого потенциала  $-120$  мВ для предотвращения перехода части каналов в инактивированное состояние, в присутствии  $50$  мкМ нифедипина и в отсутствие ионов  $\text{K}^+$  во всех используемых растворах для подавления кальциевого и калиевых токов, соответственно. Используемый протокол (рис. 38, см. врезку) включал 2 ступени и был использован как для анализа вольт-амперной характеристики, так и для анализа параметров стационарной активации и инактивации.

Ток  $I_{\text{Na}}$  присутствовал как в предсердных (рис. 38, А), так и в желудочковых (рис. 38, Б) кардиомиоцитах перепела. Ток активировался при поддерживаемых потенциалах положительнее  $-50$  мВ, максимум пиковой амплитуды тока наблюдался при  $-30$  мВ (рис. 38, В). Несмотря на то, что в желудочковых кардиомиоцитах пиковая амплитуда тока имела тенденцию быть выше по сравнению с таковой в предсердных клетках, данные различия были статистически незначимыми (при  $-30$  мВ  $P = 0,076$ ; t-тест Стьюдента для несвязанных выборок).

Кинетика стационарной активации тока  $I_{\text{Na}}$  не различалась между желудочковыми и предсердными миоцитами; для потенциала 50% активации ( $V_{50}$ )  $P = 0,9305$ ; для наклона



кривой  $P = 0,1447$ , согласно критерию Фишера. Потенциал 50% активации в предсердных миоцитах составил  $-34,16$  мВ, в желудочковых  $-33,95$  мВ. Наклон кривой стационарной инактивации также не различался между исследованными популяциями кардиомиоцитов ( $P = 0,5807$ ; критерий Фишера). Однако, инактивационная кривая для предсердных кардиомиоцитов была сдвинута в сторону более положительных потенциалов (рис. 38, Г):  $V_{50}$  для предсердных клеток составил  $-47,23$  мВ, тогда как для желудочковых клеток он находился на уровне  $-53,23$  мВ ( $P = 0,0074$ ; критерий Фишера).

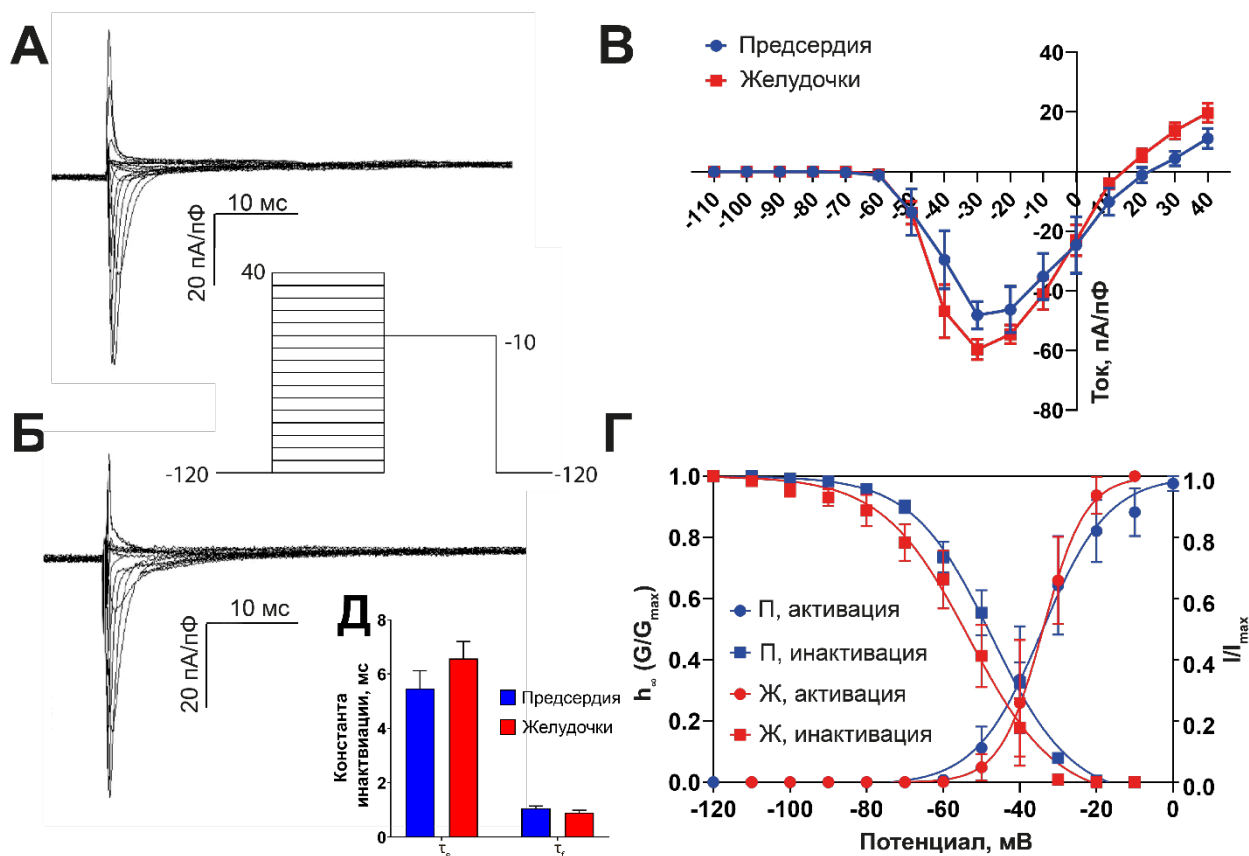


Рис. 38. А, Б – репрезентативные записи быстрого натриевого тока  $I_{Na}$  в предсердных и желудочковых миоцитах перепела, соответственно; В – вольт-амперные характеристики тока  $I_{Na}$ ; Г, Д – соответственно, параметры стационарной и инактивационной кинетики тока  $I_{Na}$  в предсердных ( $n = 6$ ,  $N = 3$ ) и желудочковых ( $n = 7$ ,  $N = 3$ ) кардиомиоцитах перепела.

Анализ констант инактивационной кинетики показал, что ни быстрая, ни медленная константы инактивации не различались между желудочковыми и предсердными клетками (рис. 38, Д). Медленная константа инактивации ( $\tau_s$ ) составляла  $6,57 \pm 0,63$  мс в желудочковых миоцитах перепела и  $5,46 \pm 0,66$  мс в предсердных миоцитах; быстрая константа инактивации ( $\tau_f$ ) составляла  $0,896 \pm 0,097$  мс в желудочковых клетках и  $1,065 \pm 0,085$  мс в предсердных.

#### 4.6. Круговорот ионов $\text{Ca}^{2+}$ в рабочем миокарде перепела

##### 4.6.1. Содержание $\text{Ca}^{2+}$ в СПР изолированных кардиомиоцитов

Содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР изолированных кардиомиоцитов оценивали по интегралу вызываемого аппликацией кофеина тока  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  обменника ( $I_{\text{NCX}}$ ) после определенного числа деполяризирующих пульсов, следующих с частотой 1 Гц. Поскольку в результате деполяризирующих импульсов активировался сарколеммальный ток  $I_{\text{Ca}}$ , и входящие ионы  $\text{Ca}^{2+}$  закачивались в СПР, накопление кальция в СПР по мере увеличения числа импульсов также росло (рис. 39, А).

Все исследованные кардиомиоциты в экспериментах накапливали  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР. В желудочковых кардиомиоцитах содержание  $\text{Ca}^{2+}$  достигало стационарных значений после 25 деполяризирующих импульсов (т.е. при дальнейшем увеличении числа импульсов изменения содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР были статистически незначимыми). В предсердных кардиомиоцитах стационарное содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР достигалось после 15 деполяризирующих импульсов (рис. 39, Б).

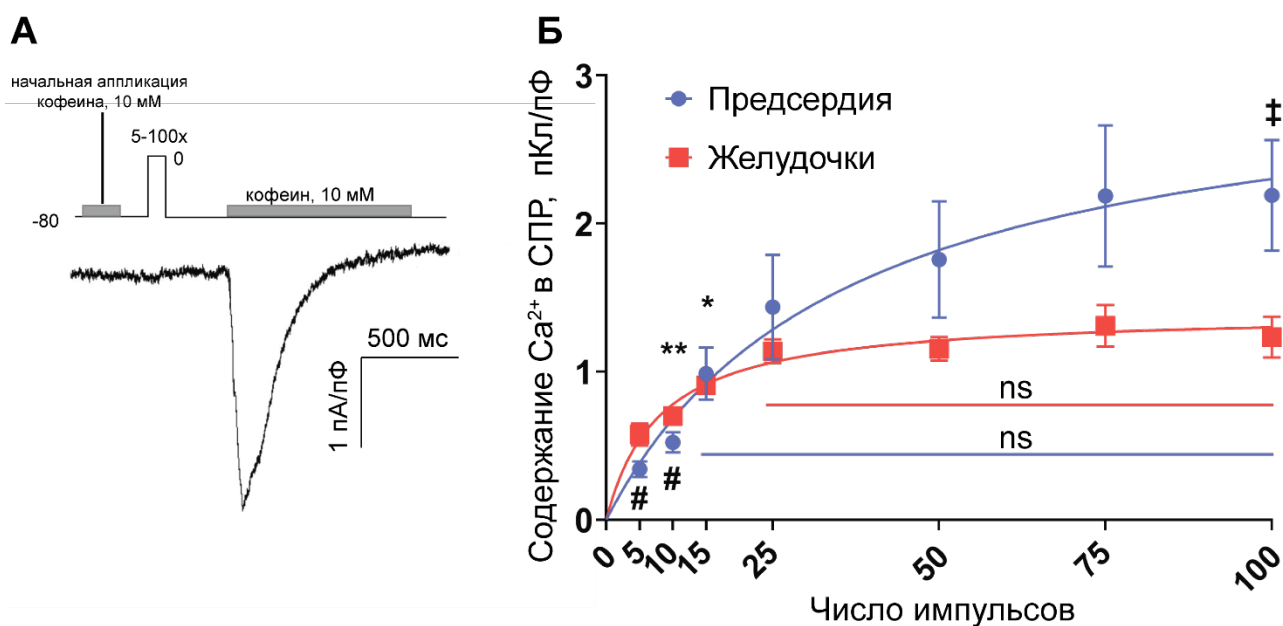


Рис. 39. А – схема эксперимента по оценке содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР кардиомиоцитов и репрезентативный пример тока  $I_{\text{NCX}}$ , индуцированного быстрой аппликацией 10 мМ кофеина. Б – динамика накопления  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР предсердных ( $n = 11$ ,  $N = 6$ ) и желудочковых ( $n = 13$ ,  $N = 5$ ) кардиомиоцитов перепела в зависимости от числа деполяризирующих импульсов; † $P < 0,05$ ; t-тест Стьюдента для несвязанных выборок. Стационарное содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в предсердных миоцитах достигалось после 15 импульсов (# $P < 0,05$ ; RM-ANOVA), в желудочковых миоцитах – после 25 пульсов (\* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; RM-ANOVA).

Содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР предсердных кардиомиоцитов перепела имело тенденцию быть выше по сравнению с таковым в желудочковых кардиомиоцитах. После 10 деполяризующих импульсов содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР желудочковых клеток достигало  $1,23 \pm 0,14$  пКл/пФ, в предсердных –  $2,19 \pm 0,37$  пКл/пФ ( $P < 0,05$ ; t-тест Стьюдента для несвязанных выборок).

Динамика накопления  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР кардиомиоцитах перепела, выраженная как концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в мкМ, отражена в таб. 5.

Таб. 5. Концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в пересчете на не занятый митохондриями объем клетки в изолированных предсердных ( $n = 11$ ,  $N = 6$ ) и желудочковых ( $n = 13$ ,  $N = 5$ ) кардиомиоцитах перепела после различного числа деполяризующих импульсов.

Число импульсов	5	10	15	25	50	75	100
Предсердия	$119,2 \pm 21,1$	$185,5 \pm 25,9$	$337,4 \pm 67,3$	$474,8 \pm 138,5$	$530,2 \pm 139,5$	$638,5 \pm 170,3$	$750,6 \pm 128,2$
Желудочки	$197,6 \pm 25,7$	$276,9 \pm 41,7$	$335,8 \pm 60,7$	$423,4 \pm 57,8$	$396 \pm 27,5$	$449,5 \pm 48,4$	$423,3 \pm 47,2$

#### 4.6.2. Взаимодействие между сарколеммальными $\text{Ca}^{2+}$ каналами и $\text{Ca}^{2+}$ депо СПР

Ввиду наличия механизма кальцийзависимой инактивации сарколеммального  $\text{Ca}^{2+}$  тока, после аппликации кофеина и последующего опустошения СПР, по мере повторного накопления  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР в результате подачи деполяризующих импульсов и в ответ на кальцийзависимый выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из СПР после деполяризации и активации  $I_{\text{Ca}}$ , в изолированных желудочковых миоцитах перепела наблюдали ускорение инактивации тока  $I_{\text{Ca}}$ , достигающее стационарного состояния после 10 импульсов (рис. 40, А).

Ускорение инактивации тока  $I_{\text{Ca}}$  сопровождалось снижением как быстрой ( $\tau_f$ ), так и медленной ( $\tau_s$ ) временных констант инактивации (рис. 40, В, Г);  $\tau_f$  и  $\tau_s$  достигали стационарных значений после 5 или 4 деполяризующих импульсов, соответственно (RM-ANOVA). Амплитуда тока  $I_{\text{Ca}}$  в ходе данного эксперимента не изменялась, что позволяет не связывать наблюдаемые изменения кинетики  $I_{\text{Ca}}$  с возможной потенциал- или кальцийзависимыми изменениями сарколеммального входа  $\text{Ca}^{2+}$ . Данный феномен свидетельствует о наличии эффективного взаимодействия между сарколеммальными  $\text{Ca}^{2+}$  каналами и рианодиновыми рецепторами на мембране СПР в желудочковых кардиомиоцитах перепела.

Однако, в изолированных предсердных миоцитах реаккумуляция ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР не сопровождалась аналогичными изменениями кинетики тока  $I_{\text{Ca}}$  (рис. 40, Б). Временные константы инактивации также не изменялись в зависимости от числа поданных деполяризующих импульсов (рис. 40, В, Г).

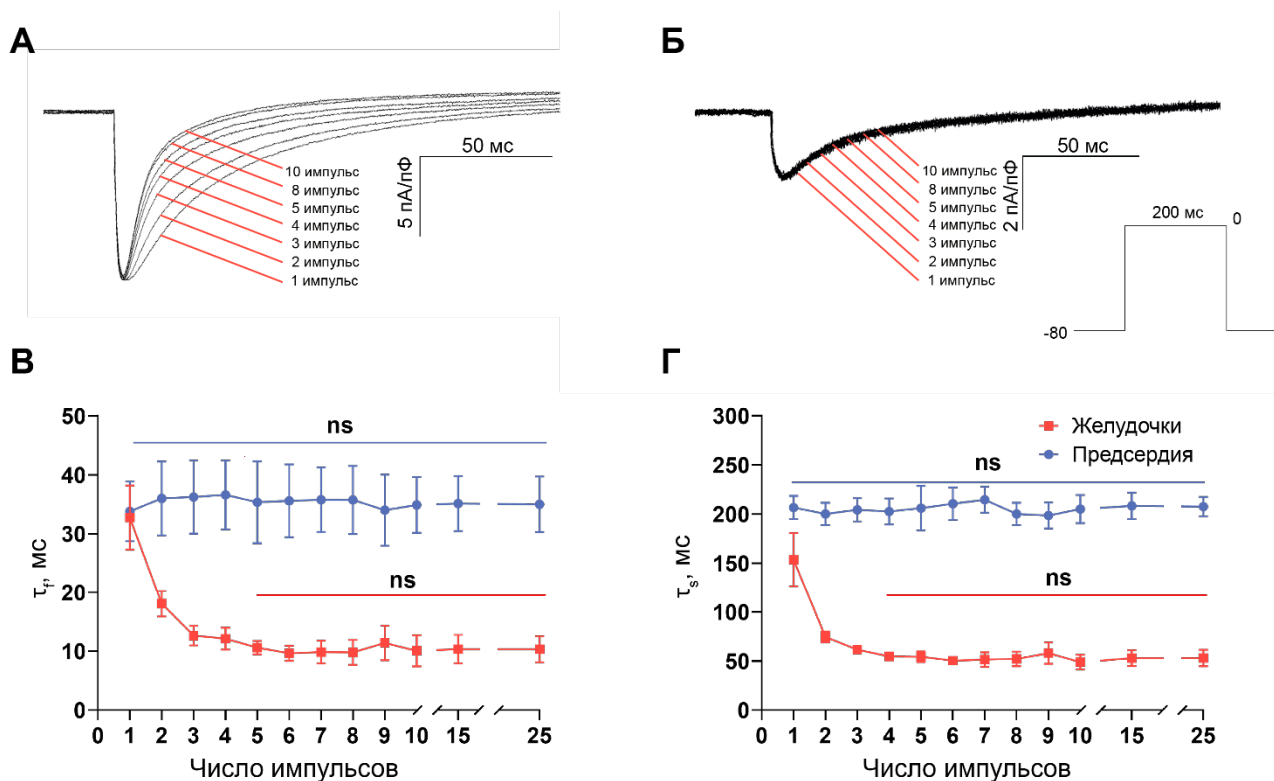


Рис. 40. А, Б – репрезентативные записи сарколеммального тока  $I_{Ca}$  в желудочковых и предсердных кардиомиоцитах, соответственно, в течение первых 10 деполяризирующих импульсов после опустошения  $Ca^{2+}$  депо СПР в результате аппликации 10 мМ кофеина. В, Г – динамика быстрой и медленной временных констант инактивации тока  $I_{Ca}$ , соответственно, в течение первых 25 деполяризирующих импульсов после аппликации кофеина в предсердных ( $n = 6$ ,  $N = 3$ ) и желудочковых ( $n = 7$ ,  $N = 3$ ) кардиомиоцитах перепела (RM-ANOVA).

#### 4.7. Характеристики пейсмекерного миокарда японского перепела

##### 4.7.1. Определение местоположения водителя ритма в сердце перепела методом оптического картирования

Для определения местоположения водителя ритма мы впервые провели оптическое картирование межвенной области правого предсердия перепела с использованием потенциалчувствительного флуоресцентного красителя di-4-ANNEPS. Во всех исследованных тканевых препаратах межвенной области, расположенной в регионе вхождения в правое предсердие полых вен (двух верхних и одной нижней полой вены), в отсутствие внешней стимуляции наблюдали регулярную электрическую активность с частотой генерации потенциалов действия  $5,7 \pm 0,8$  Гц ( $n = 6$ ,  $N = 6$ ). Точки наиболее ранней активации располагались в области между входами правой верхней и нижней полых вен, чаще в основании правой верхней полой вены. На рис. 41 представлена репрезентативная изохронная карта, отражающая возникновение и распространение возбуждения в межвенной области правого предсердия перепела.

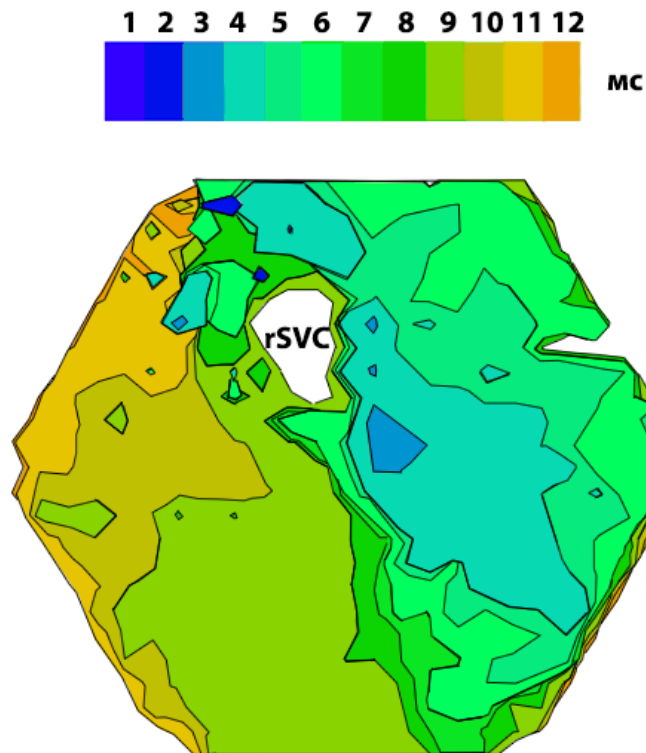


Рис. 41. Репрезентативная изохронная карта, иллюстрирующая возникновение и распространение возбуждения в межвенной области правого предсердия перепела. rSVC – правая верхняя полая вена.

#### 4.7.2. Характеристики биоэлектрической активности пейсмекерного миокарда перепела

Для подтверждения данных, полученных с помощью метода оптического картирования, мы изучили электрическую активность в тканевых препаратах межвенной области правого предсердия перепела с помощью стандартной микроэлектродной техники. В области вхождения нижней и правой верхней полых вен зарегистрированная электрическая активность имела характерную для пейсмекерного миокарда конфигурацию. В клетках данной области препарата отсутствовал стабильный потенциал покоя, между потенциалами действия наблюдалась медленная диастолическая деполяризация (МДД), скорость которой ( $V_{\text{мдд}}$ ) составляла  $215,0 \pm 10,5$  мВ/с, максимальный негативный потенциал между потенциалами действия составил  $-69,9 \pm 2,6$  мВ. Длительность потенциалов действия на уровне 50% реполяризации составила  $26,15 \pm 4,41$  мс. Скорость нарастания переднего фронта потенциалов действия была ниже, чем в рабочем миокарде (см. раздел 4.3.2) и составляла  $60,85 \pm 8,98$  В/с ( $P < 0,001$  для желудочковых потенциалов действия,  $P < 0,0001$  для предсердных потенциалов действия, t-тест Стьюдента); амплитуда потенциалов действия составляла  $64,65 \pm 5,43$  мВ ( $n = 6$ ,  $N = 6$ ). Частота генерации потенциалов действия препаратами межвенной области в базальных условиях составляла  $6,85 \pm 0,26$  Гц. Характерная конфигурация пейсмекерных потенциалов действия в препаратах миокарда перепела отражена на рис. 42, А.

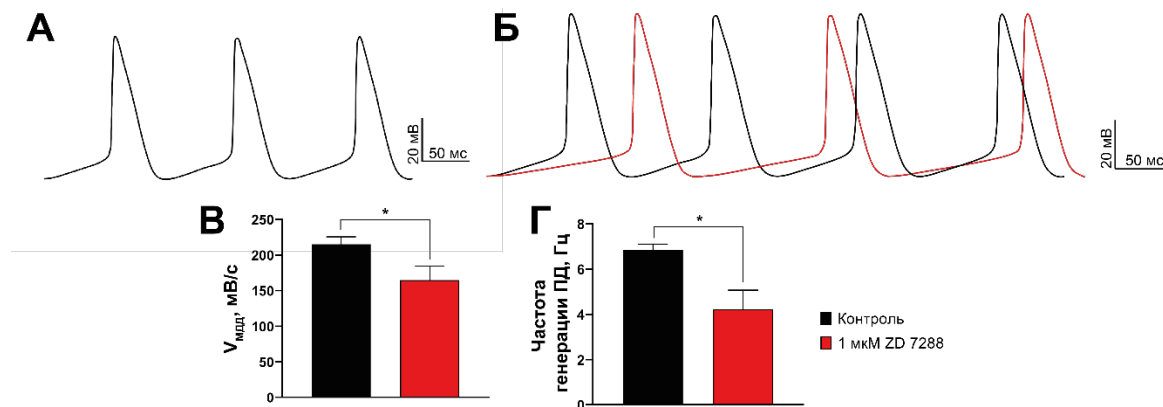


Рис. 42. А, Б – репрезентативные записи электрической активности в препаратах межвенной области правого предсердия перепела в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ блокатора тока  $I_f$  ZD 7288. В, Г – изменение  $V_{MDP}$  и частоты генерации потенциалов действия в препаратах межвенной области правого предсердия перепела под действием 1 мкМ ZD 7288. \* $P < 0,05$ ; критерий Вилкоксона.

Мы также изучили действие блокатора характерного для пейсмекерного миокарда позвоночных тока  $I_f$  (активируемый гиперполяризацией «funny»-ток) – ZD 7288. В препаратах межвенной области правого предсердия перепела ZD 7288 в концентрации 1 мкМ вызывал замедление МДД и снижение частоты генерации потенциалов действия препаратами (рис. 42, Б). МДД в присутствии ZD 7288 замедлялась до  $164,7 \pm 19,4$  мВ/с ( $P < 0,05$ ; критерий Вилкоксона,  $n = 6$ ; рис. 42, В), частота генерации потенциалов действия – до  $4,23 \pm 0,84$  Гц ( $P < 0,05$ ; критерий Вилкоксона,  $n = 6$ ; рис. 42, Г).

При аппликации ацетилхолина (1 мкМ) в препаратах межвенной области происходила миграция водителя ритма и трансформация истинного водителя ритма в латентный. Это сопровождалось замедлением генерации потенциалов действия на  $24,46 \pm 4,97$  % ( $P < 0,01$ ; критерий Вилкоксона;  $n = 5$ ,  $N = 5$ ; рис. 43, А). При использовании более высоких концентраций ацетилхолина (10 мкМ) генерация потенциалов действия пейсмекерным миокардом прекращалась (рис. 43, Б).

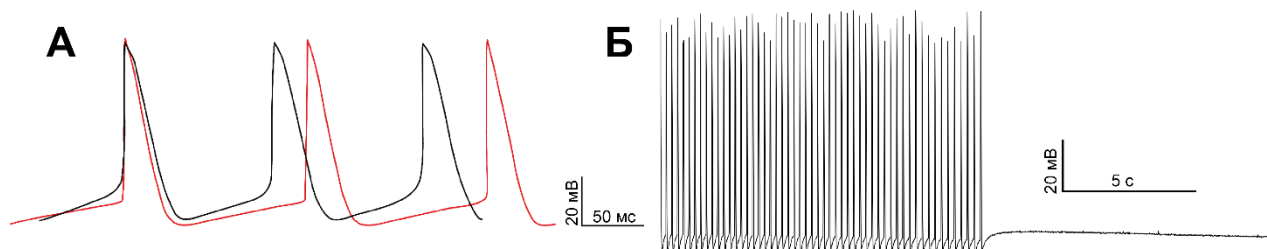


Рис. 43. Репрезентативные записи, демонстрирующие влияние 1 мкМ (А) и 10 мкМ (Б) ацетилхолина на электрическую активность межвенной области правого предсердия перепела.

### 4.7.3. Ионные токи в изолированных пейсмекерных кардиомиоцитах перепела

#### 4.7.3.1. Изолированные пейсмекерные кардиомиоциты

Для формирования более полной характеристики пейсмекерного миокарда перепела мы изучили ионные токи в кардиомиоцитах, выделенных из межвенной области правого предсердия. Методика выделения пейсмекерных клеток не отличалась от методики выделения кардиомиоцитов из рабочего миокарда. Изолированные пейсмекерные кардиомиоциты не отличались по внешнему виду от предсердных кардиомиоцитов, и представляли собой веретеновидные клетки с поперечной исчерченностью. Однако, пейсмекерные клетки были несколько меньше по сравнению с рабочими кардиомиоцитами, что выражалось в меньшей электрической емкости клеток:  $24,97 \pm 1,67$  пФ,  $n = 23$  ( $P < 0,05$  для предсердных клеток;  $P < 0,0001$  для желудочковых клеток; ANOVA).

#### 4.7.3.2. Активируемый гиперполяризацией «funny»-ток $I_f$ в пейсмекерных кардиомиоцитах перепела

В изолированных пейсмекерных кардиомиоцитах перепела при использовании калийсодержащих экспериментальных растворов гиперполяризация вызывала активацию медленно активирующегося высокоамплитудного входящего тока (рис. 44, А). Ток был чувствителен к селективному блокатору ZD 7288 (5 мкМ), что позволило определить его как пейсмекерный «funny»-ток  $I_f$ . Вольт-амперная характеристика тока  $I_f$  в пейсмекерных кардиомиоцитах перепела представлена на рис. 44, Б.

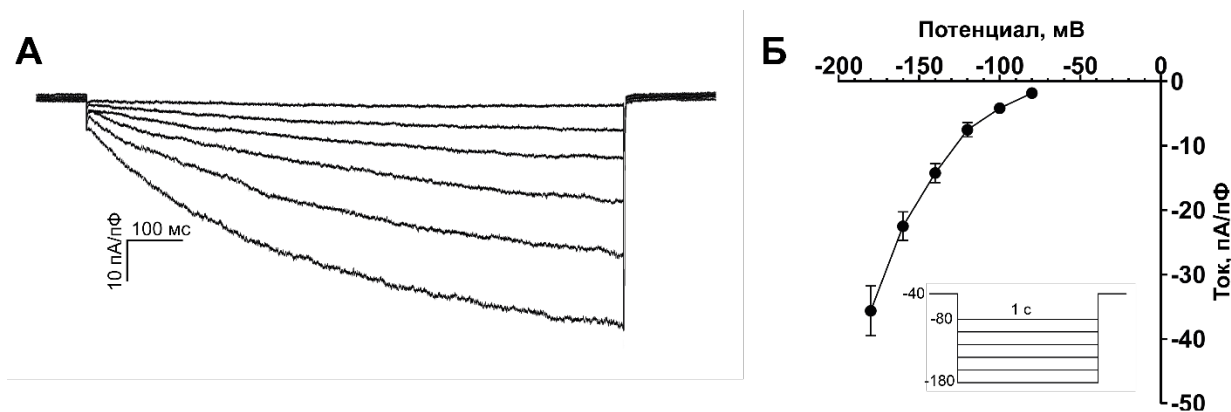


Рис. 44. Репрезентативные записи (А) и вольт-амперная характеристика (Б) пейсмекерного «funny»-тока  $I_f$  в кардиомиоцитах, изолированных из межвенной области правого предсердия перепела ( $n = 9$ ,  $N = 3$ ).

#### 4.7.3.3. Фоновый ток входящего выпрямления $I_{K1}$ в пейсмекерных кардиомиоцитах перепела

В отличие от рабочих кардиомиоцитов, выделенных из предсердий и желудочков сердца перепела, пейсмекерные кардиомиоциты характеризовались крайне малой амплитудой

фонового тока входящего выпрямления  $I_{K1}$  (рис. 45, А). Входящая компонента тока при поддерживаемом потенциале  $-120$  мВ не превышала по своей амплитуде  $3$  пА/пФ; выходящая компонента тока, регистрируемая при поддерживаемом потенциале  $-60$  мВ, не превышала  $0,3$  пА/пФ.

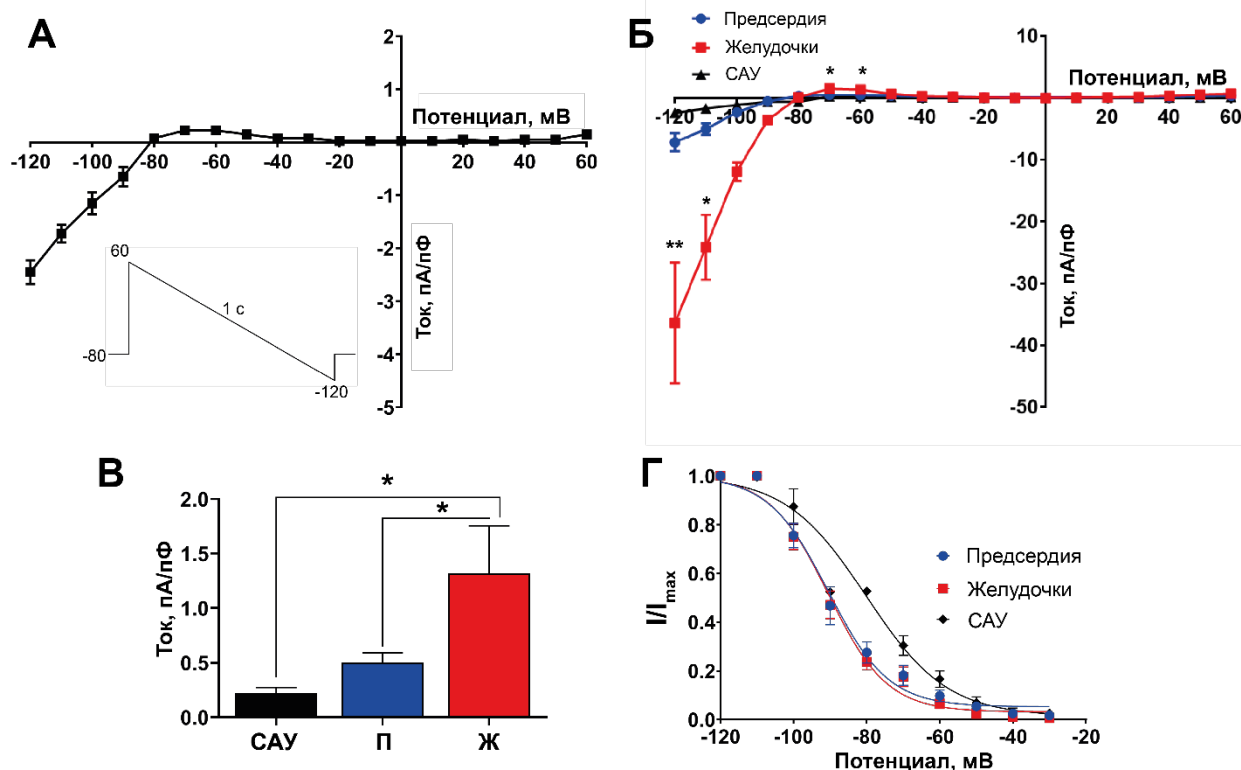


Рис. 45. А – вольт-амперная характеристика фонового тока входящего выпрямления  $I_{K1}$  в кардиомио кардиомиоцитах, изолированных из межвенной области правого предсердия перепела ( $n = 8$ ;  $N = 3$ ); Б – она же в сравнении с вольт-амперными характеристиками данного тока в рабочем миокарде перепела; В – сравнение амплитуды выходящей компоненты тока  $I_{K1}$  при  $-60$  мВ в рабочем и пейсмекерном миокарде; Г – сравнение зависимости входящего выпрямления тока  $I_{K1}$  от поддерживаемого потенциала в пейсмекерных и рабочих миоцитах.  $**P < 0,01$ ;  $*P < 0,05$ ; ANOVA.

Сравнение амплитуды тока  $I_{K1}$  при разных поддерживаемых потенциалах в пейсмекерных и рабочих кардиомиоцитах перепела показало, что как входящая, так и выходящая компоненты  $I_{K1}$  в пейсмекерном миокарде имели статистически значимо меньшую амплитуду по сравнению с амплитудой  $I_{K1}$  в желудочковом миокарде (рис. 45, Б, В). Несмотря на то, что различия в амплитуде  $I_{K1}$  между предсердными и пейсмекерными кардиомиоцитами перепела были статистически незначимыми, как входящая, так и выходящая компоненты тока  $I_{K1}$  в предсердных клетках имели тенденцию быть выше по сравнению с таковыми в пейсмекерных миоцитах.



Анализ зависимости входящего выпрямления тока  $I_{K1}$  от поддерживаемого потенциала показал, что в пейсмекерных кардиомиоцитах данная зависимость имеет иную форму, нежели в рабочих миоцитах (рис. 45, Г): потенциал 50% выпрямления тока  $I_{K1}$   $V_{0,5}$  в пейсмекерных клетках был сдвинут в сторону более положительных потенциалов (-80,12 мВ), а коэффициент наклона кривой был сдвинут в сторону отрицательных значений ( $P < 0,0001$ ; критерий Фишера).

#### 4.7.3.4. *Реполяризирующие калиевые токи в пейсмекерных кардиомиоцитах перепела*

В изолированных пейсмекерных кардиомиоцитах перепела при использовании калийсодержащих экспериментальных растворов деполяризация от поддерживаемого потенциала приводила к активации выходящих токов. Приблизительно в 70% клеток обнаруживался быстро активирующийся и быстро инактивирующийся ток, чувствительный к 4-аминопиридину (3 мМ) – данный ток был определен как транзиторный выходящий ток  $I_{to}$  (рис. 46, А). Форма вольт-амперной зависимости и амплитуда тока  $I_{to}$  в пейсмекерных кардиомиоцитах перепела были сходны с аналогичными характеристиками тока в рабочих кардиомиоцитах, описанных в разделе 4.5.2.1 (рис. 46, Б).

Помимо тока  $I_{to}$ , деполяризация вызывала в пейсмекерных кардиомиоцитах перепела активацию выходящего тока с более медленной кинетикой активации (рис. 46, В), который был определен как калиевый ток задержанного выпрямления. Как и в рабочих кардиомиоцитах, данный выходящий ток включал две компоненты. Апликация селективного блокатора E-4031 (10 мкМ) приводила к снижению амплитуды тока задержанного выпрямления, разница между током в контрольных условиях и в присутствии E-4031 была определена как быстрый ток задержанного выпрямления  $I_{Kr}$ . Вольт-амперные характеристики тока  $I_{Kr}$  в пейсмекерных миоцитах перепела, полученные на первой ступени протокола и для хвостового тока, отражены на рис. 46 Г, Д.

Основной компонентой тока задержанного выпрямления в пейсмекерных кардиомиоцитах перепела, как и в рабочих, являлся медленный ток задержанного выпрямления  $I_{Ks}$ . Ток был чувствителен к блокатору HMR 1556 (10 мкМ). Вольт-амперные характеристики тока  $I_{Ks}$  продемонстрированы на рис. 46 Г, Д. Амплитуда тока  $I_{Ks}$  в пейсмекерных кардиомиоцитах перепела была сравнима с таковой в желудочковых клетках и превышала амплитуду тока в предсердных миоцитах (см. раздел 4.5.1.3).

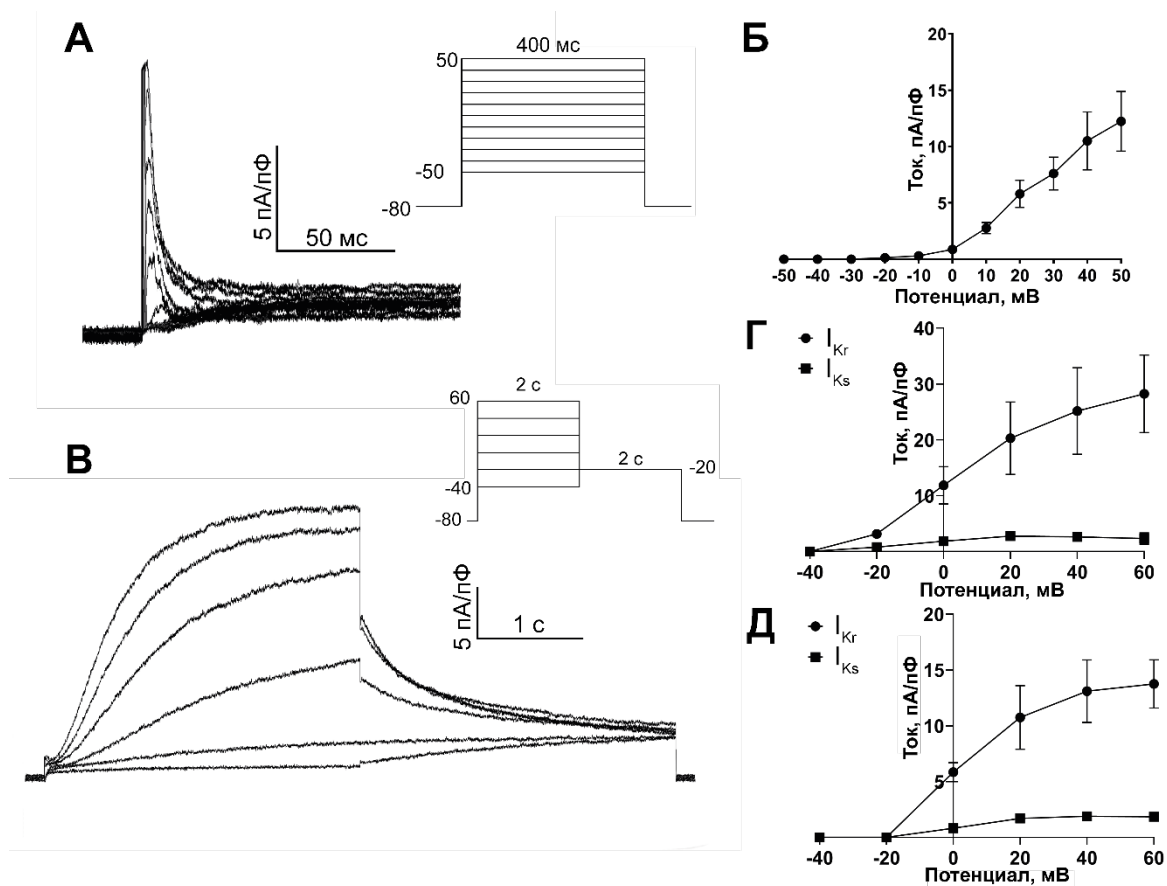


Рис. 46. А, Б – репрезентативные записи и вольт-амперная характеристика выходящего транзиторного тока  $I_{to}$  в кардиомиоцитах, изолированных из межвенной области правого предсердия перепела ( $n = 6$ ,  $N = 3$ ). В – репрезентативные записи суммарного тока задержанного выпрямления; Г, Д – также вольт-амперные характеристики токов  $I_{Kr}$  и  $I_{Ks}$  в кардиомиоцитах, изолированных из межвенной области правого предсердия перепела, на первой ступени протокола и хвостового тока, соответственно ( $n = 8$ ;  $N = 3$  для каждой группы).

## 5. ОБСУЖДЕНИЕ

### 5.1. Функционирование сердца перепела in vivo

Конфигурация электрокардиограммы птиц и, в частности, перепела, ранее рассматривалась в научной литературе – хотя бы по той причине, что электрокардиография является наиболее доступным и неинвазивным методом изучения электрической активности сердца. В данном исследовании зарегистрированная нами электрокардиограмма перепела имела типичную конфигурацию, описанную ранее для различных видов птиц (Sturkie, 1949; Szabuniewicz, McCrady, 1974; Yogeshpriya и др., 2018). Более того, характерные длительности основных электрокардиографических интервалов, полученные нами в результате анализа электрокардиограммы перепела, совпали с аналогичными значениями, полученными ранее в предыдущей работе, выполненной на японских перепелах (Szabuniewicz, McCrady, 1974) - таким образом, описанная в данной работе конфигурация электрокардиограммы японского перепела, по всей видимости, является типичной для животных данного вида. Более низкая частота сердечных сокращений, показанная в настоящей работе, по сравнению с приведенным выше исследованием, возможно, объясняется исключением стрессогенного повышения частоты сердечных сокращений благодаря применению изофлурановой анестезии.

Частота сокращений сердца перепела в базальных условиях близка к частоте сокращений сердца у крыс в норме (Barnard, Corre, Cho, 1976; Perlini и др., 1995) – однако, по-видимому, сердце перепела может развивать более высокую частоту сокращений при фармакологической стимуляции, по сравнению с сердцем крысы (Bolter, Atkinson, 1988). При этом электрокардиограмма перепела по своей конфигурации и соотношению длительностей характерных интервалов при этом отличается от электрокардиограмм крыс и мышей и в большей степени напоминает таковую для морской свинки, кролика и человека благодаря отставленной во времени Т-волне (Konopelski, Ufnal, 2016; Lombard, 1952; Szabuniewicz, Hightower, Kuzar, 1971). Стоит, однако, отметить, что это нельзя экстраполировать на все виды птиц: например, электрокардиограмма зяблика в большей степени близка к электрокардиограмме мыши по своей конфигурации (Offerhaus и др., 2021).

В соответствии с математической моделью, предложенной С.М. Bishop, максимальная частота сокращений сердца перепела со средней массой тела около 250 граммов должна составлять порядка 615-650 уд./мин. (Bishop, 1997), что заметно выше, чем показанная в настоящей работе максимальная частота сокращений перепела при симпатической нагрузке в совокупности с подавлением парасимпатических влияний. Учитывая, что предложенная в работе С.М. Bishop модель основана на данных, полученных от активно летающих птиц во время полета в аэродинамической трубе, возможно, экстраполяция данной модели на перепелов, для которых не характерен продолжительный активный полет, не вполне

релевантна. Кроме того, принимая во внимание данные, полученные на крысах, есть основания полагать, что физическая нагрузка может вызывать более выраженное увеличение частоты сердечного ритма по сравнению с инъекцией изопротеренола (Bolter, Atkinson, 1988). Возможно, в условиях интенсивной физической нагрузки сердце перепела также может сокращаться с большей частотой. Максимальная частота сокращений сердца перепела при фармакологической нагрузке, показанная в данной работе, была близка к значениям частоты сердечных сокращений перепела при эмоциональном стрессе, вызванном иммобилизацией (Valance и др., 2008). Особого внимания заслуживает изменение конфигурации электрокардиограммы перепела при фармакологической нагрузке: в основном оно происходило за счет укорочения интервалов между циклами и сокращения интервалов Tr-Te и QT, тогда как, например, длительность интервала PR практически не изменилась. У млекопитающих и, в частности, человека, как фармакологическая, так и физическая нагрузка вызывают изменение всех интервалов электрокардиограммы (Amin и др., 2009; O'Sullivan и др., 1998). Прояснение этого несоответствия потребует дальнейших электрокардиографических исследований на различных видах птиц с разными размерами тела.

При этом, по всей видимости, симпатические влияния играют большую роль в модуляции функционирования сердца птиц – что, возможно, связано с полетом: плотность симпатических волокон в миокарде перепела была заметно выше по сравнению с таковой в миокарде млекопитающих (Kuzmin и др., 2021a; Kuzmin и др., 2021b). Нельзя, впрочем, отвергать гипотезу о том, что симпатическая иннервация может быть наиболее важна именно для плохо летающих птиц, использующих способность к полету в основном для коротких перелетов при бегстве от хищников – что характерно для перепела. Для выяснения этого вопроса необходимы аналогичные исследования с применением окрашивания глиоксиловой кислотой на видах птиц с отличным образом жизни.

## **5.2. Морфология и ультраструктура кардиомиоцитов японского перепела**

О сходстве морфологических характеристик кардиомиоцитов птиц и рептилий было известно более 50 лет благодаря исследованиям с использованием электронной микроскопии (Hirakow, 1970). Изолированные кардиомиоциты японского перепела, характеристики которых описаны выше в разделе 4.2, напоминают по своему внешнему виду изолированные кардиомиоциты холоднокровных позвоночных, включая рыб (Shiels и др., 2004; Vornanen, 1997) и рептилий (Galli, Lipnick, Block, 2009; Galli, Taylor, Shiels, 2006), а также других видов птиц (Akester, 1981; Bogdanov и др., 1995; Bossen, Sommer, Waugh, 1978; Kim и др., 2000). Кроме того, как и у большинства других видов позвоночных, предсердные кардиомиоциты перепела оказались меньше по размерам, чем желудочковые (Shiels, Galli, 2014). Крайне маленькая ширина (и, следовательно, диаметр) кардиомиоцитов перепела означает, что,

несмотря на отсутствие Т-трубочек в кардиомиоцитах птиц, ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , входящие через сарколеммальные каналы, преодолевают незначительное расстояние, прежде чем достигают риаодиновых рецепторов на мембране СПР и запускают процесс кальцийзависимого выброса  $\text{Ca}^{2+}$ . Поскольку Т-трубочки, характерные для кардиомиоцитов млекопитающих, заметно улучшают временные и пространственные характеристики кальциевых транзиентов и, следовательно, сократительной активности клеток, считается, что кардиомиоциты, обладающие Т-трубочками, характеризуются более интенсивным круговоротом кальция – то есть, более резким подъемом уровня  $\text{Ca}^{2+}$  при сокращении, большей амплитудой  $\text{Ca}^{2+}$  транзиентов, что ведет к более интенсивным сокращениям – по сравнению с веретенообразными кардиомиоцитами холоднокровных позвоночных (Shiels, Galli, 2014). Таким образом, в сердце птиц архаичные узкие кардиомиоциты сочетаются с высокой сократительной активностью.

По всей видимости, именно ширина кардиомиоцитов определяет наличие или отсутствие Т-трубочек в миокарде млекопитающих. Желудочковые кардиомиоциты взрослых млекопитающих (вне зависимости от размера сердца) в среднем имеют ширину более 25 мкм (Loughrey, Smith, MacEachern, 2004); и также известно, что предсердные миоциты крупных млекопитающих также обладают Т-трубочками, причем выраженность системы Т-трубочек коррелирует с шириной предсердных кардиомиоцитов: чем больший диаметр имеет клетка, тем более выражена в ней данная структура (Bootman и др., 2006; Mackenzie и др., 2004; Richards и др., 2011).

Стоит также отметить, что, несмотря на очевидные преимущества уменьшенной ширины кардиомиоцитов в отсутствие системы Т-трубочек, кардиомиоциты птиц не отличаются по своей ширине от кардиомиоцитов рыб и рептилий, для которых типичная ширина кардиомиоцитов составляла от 5 до 7 мкм (Galli, Taylor, Shiels, 2006; Galli, Warren, Shiels, 2009; Vornanen, 1997; Vornanen и др., 1998) – то есть, какие-либо имевшие место быть изменения, по всей видимости, происходили в ходе эволюции птиц на ультраструктурном уровне.

### **5.3. Базовые параметры электрической активности миокарда перепела**

#### **5.3.1. Потенциал покоя**

Несмотря на то, что ключевой особенностью данной работы является детальный анализ электрофизиологического фенотипа сердца птиц, анализ базовых показателей электрической активности миокарда также представляется необходимым.

Мембранный потенциал покоя ранее был изучен в эмбриональном миокарде птиц. Подобные исследования показывают, что потенциал покоя в рабочем миокарде эмбрионов птиц имеет менее отрицательные значения и, как правило, положительнее -70 мВ (Parrano,

1976; Sperelakis, Shigenobu, 1972). С одной стороны, было показано, что в ходе онтогенеза потенциал покоя миокард птиц может постепенно гиперполяризоваться, достигая значений, характерных для миокарда взрослых особей (Sperelakis, Shigenobu, 1972). С другой стороны, более поздние исследования, задействовавшие более совершенные экспериментальные методики и техники, свидетельствуют о том, что значения потенциала покоя в эмбриональном миокарде птиц весьма близки к таковым в миокарде взрослых птиц (Nouchi и др., 2011; Sorota и др., 1985). В литературе отсутствует информация касательно потенциала покоя в миокарде взрослых птиц других видов, поэтому нет данных, с которыми можно было бы соотнести полученные в данной работе результаты. Однако, можно по меньшей мере утверждать, что потенциал покоя рабочего миокарда птиц не отличается от такового для прочих представителей позвоночных (Abramochkin, Kuzmin, 2018; Abramochkin, Matchkov, Wang, 2020; Haverinen, Vornanen, 2009a; Pustovit, Kuzmin, Abramochkin, 2016).

Хотя разница в потенциале покоя между предсердным и желудочковым миокарда перепела оказалась статистически незначимой, потенциал покоя в желудочках имеет тенденцию быть несколько более отрицательным, что является общим трендом для большинства позвоночных (Abramochkin, Matchkov, Wang, 2020; Haverinen, Vornanen, 2009a; Trautwein и др., 1962). Причиной этой разницы является различное распределение каналов фонового тока входящего выпрямления  $I_{K1}$ : амплитуда входящей и выходящей компонент тока  $I_{K1}$  в желудочковых миоцитах перепела значительно превышает таковую в предсердных клетках – как и у прочих позвоночных (Abramochkin, Kuzmin, 2018; Abramochkin, Matchkov, Wang, 2020; Abramochkin, Vornanen, 2014; Badr и др., 2017; Giles, Imaizumi, 1988). Стоит, однако, отметить, что выявленная разница в амплитуде тока  $I_{K1}$  между предсердными и желудочковыми миоцитами перепела была гораздо более значительной, чем разница в потенциале покоя между данными типами миокарда. Возможной причиной является разница в размере предсердных и желудочковых кардиомиоцитов и, соответственно, электрической емкости их мембран. Предсердные миоциты перепела имеют меньшую емкость мембраны – соответственно, для изменения разности потенциалов на мембране требуется меньший по силе ток.

### **5.3.2. Конфигурация потенциалов действия**

Общая конфигурация потенциалов действия, зарегистрированных в миокарде взрослого перепела, не отличалась от таковой для электрической активности эмбрионального миокарда птиц, зарегистрированной в предыдущих исследованиях. С другой стороны, прямое сравнение этих данных невозможно, поскольку при регистрации ПД в миокарде эмбрионов птиц были использованы более низкие частоты стимуляции (0,3 – 3,5 Гц) – из-за этого ПД имели большую длительность по сравнению с зарегистрированными в данной работе при частоте

стимуляции 6 Гц (Lieberman, Paes De Carvalho, 1965; Nouchi и др., 2011; Sorota и др., 1985; Sperelakis, Shigenobu, 1972).

Описанное для японского перепела соотношение длительностей ПД в желудочковом и предсердном миокарде также хорошо согласуется с аналогичными данными для других видов позвоночных: у большинства исследованных видов желудочковые ПД значительно длиннее (Abramochkin, Matchkov, Wang, 2020; Giles, Imaizumi, 1988; Vornanen, Ryökkynen, Nurmi, 2002). Однако, прямое сравнение данных, полученных в данной работе, с предыдущими электрофизиологическими исследованиями миокарда взрослых птиц также оказывается невозможным. N.E. Moore регистрировал ПД в препаратах миокарда со спонтанной активностью (частота генерации ПД препаратом не указана) при температуре 28-30°C (Moore, 1965); В.И. Прошева и Н.Н. Касева в своей работе не рассматривали разницу в конфигурации электрической активности между предсердным и желудочковым миокардом (Prosheva, Kaseva, 2016).

Сравнение конфигурации электрической активности рабочего миокарда перепела с таковыми у различных видов млекопитающих показывает, что общая форма ПД и соотношение длительностей ПД в предсердном и желудочковом миокарде японского перепела близко к таковому у морских свинок и кроликов (Brückner и др., 1985; Masumiya и др., 1999), но не у крыс и мышей (Pacher и др., 1999; Pustovit, Kuzmin, Abramochkin, 2016). У более крупных млекопитающих, таких как собака и человек, эта разница в длительности ПД между предсердиями и желудочками выражена меньше (Carlsson, Chartier, Nattel, 2006; Trautwein и др., 1962), а в потенциалах действия их предсердного миокарда более выражена фаза плато по сравнению с конфигурацией ПД в предсердиях перепела (Carlsson, Chartier, Nattel, 2006; Dangman и др., 1982; Gelband и др., 1972; Trautwein и др., 1962). Соотношения между длительностью ПД на уровне 50% реполяризации в желудочковом и предсердном миокарде для японского перепела (на основе данных, полученных в настоящей работе) и различных видов млекопитающих (на основе данных, полученных в предыдущих исследованиях) представлены в таб. 6:

Таб. 6. Соотношение длительностей ПД на уровне 50% реполяризации в предсердном и желудочковом миокарде японского перепела и различных видов млекопитающих (Carlsson, Chartier, Nattel, 2006; Giles, Imaizumi, 1988; Masumiya и др., 1999; Pustovit, Kuzmin, Abramochkin, 2016; Trautwein и др., 1962).

Вид	Перепел	Морская свинка	Кролик	Крыса	Собака	Человек
ДПД50п/ДПД50ж	0,346	0,176	0,197	1,163	0,617	0,846

Таким образом, описанная конфигурация электрической активности делает перепела, несмотря на достаточно высокий по сравнению с таковым у крупных млекопитающих и человека сердечный ритм, потенциально пригодным модельным объектом для экспериментальной кардиологии. С другой стороны, сердце рыб по конфигурации электрической активности и частоте сердечных сокращений может в значительной степени напоминать человеческий – и тем не менее, электрофизиологический фенотип их миокарда значительно отличается от человеческого (Hassinen, Abramochkin, Vornanen, 2014; Vornanen, Hassinen, 2016). Поэтому дальнейший подробный анализ паттерна мажорных ионных токов в миокарде перепела и его сравнение с таковым у других видов животных также необходимы.

#### **5.4. Паттерн реполяризирующих калиевых токов в миокарде перепела и электрофизиологический фенотип сердца**

##### **5.4.1. Калиевые токи задержанного выпрямления**

Паттерн – то есть набор и количественное соотношение – реполяризирующих калиевых токов является ключевым, хоть и не единственным, параметром, определяющим валидность той или иной экспериментальной модели в кардиологии. В миокарде человека, а также собаки и кролика, считающихся «эталонными» модельными объектами в подобных исследованиях, мажорными токами являются  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$ ,  $I_{Kr}$  и  $I_{Ks}$  (Cui и др., 2011; Li и др., 1996a; Li и др., 1996b; Nerbonne, 2000; Sasaki и др., 1995; Shibata и др., 1989; Tsuji и др., 2000; Wang, Fermini, Nattel, 1994). В настоящей работе было показано присутствие трех мажорных реполяризирующих калиевых токов –  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$  и  $I_{to}$  – в изолированных кардиомиоцитах японского перепела. Мы также показали различный вклад трех этих токов в формирование электрической активности в тканевых препаратах предсердного и желудочкового миокарда японского перепела.  $I_{Kr}$  и  $I_{Ks}$  принимали участие в поздней реполяризации миокарда перепела, тогда как  $I_{to}$  обеспечивал фазу ранней реполяризации. Полученные данные согласуются также с данными, полученными ранее для эмбрионального миокарда птиц, постулируя  $I_{Kr}$  как главного игрока в реполяризации миокарда птиц в норме, тогда как подавление тока  $I_{Ks}$  вызывает лишь незначительные изменения в конфигурации электрической активности тканевых препаратов (Nouchi и др., 2011).

В сердце человека быстрый ток задержанного выпрямления  $I_{Kr}$  также является наиболее важным реполяризирующим током в базальных условиях. Jost с соавторами показал в своем исследовании, что аппликация различных блокаторов тока  $I_{Ks}$  весьма слабо влияет на конфигурацию потенциалов действия в миокарде человека, тогда как блокаторы тока  $I_{Kr}$  в значительной степени увеличивают длительность ПД в препаратах человеческого миокарда при частоте генерации ПД, соответствующей нормальному сердечному ритму человека (Jost и др., 2005). Весьма незначительный вклад тока  $I_{Ks}$  в формирование электрической активности



человеческого сердца в базальных условиях был подтвержден также в экспериментах с использованием метода пэтч-кламп. При использовании протокола изменения мембранного потенциала, имитирующего форму конвенционального потенциала действия, характерного для человеческого миокарда,  $I_{Ks}$ , в силу особенностей кинетики канала, не успевает активироваться полностью. Однако, в условиях адренергической стимуляции и/или искусственного увеличения длительность ПД с помощью фармакологического воздействия блокаторы тока  $I_{Ks}$  оказывают гораздо более выраженное воздействие (Jost и др., 2005). Это также было показано в аналогичных экспериментах на миокарде собаки и кролика, обладающих сходным электрофизиологическим фенотипом (Han, Wang, Nattel, 2001; Lengyel и др., 2001; Lu и др., 2001; O'Hara, Rudy, 2012; Varró и др., 2000).

Кардиомиоциты птиц, так же, как и кардиомиоциты рептилий, характеризуются относительно небольшой амплитудой быстрого тока задержанного выпрямления  $I_{Kr}$  (Abramochkin, Matchkov, Wang, 2020; Stecyk и др., 2007; Warren и др., 2010a) по сравнению с таковой в кардиомиоцитах рыб, амфибий (Hassinen, Haverinen, Vornanen, 2015; Haverinen, Vornanen, 2009a; Sauviat, Colas, Pages, 2002) и млекопитающих (Jost и др., 2005; Sanguinetti, Jurkiewicz, 1990). Например, в рабочем миокарде человека соотношение амплитуд токов  $I_{Kr}$  и  $I_{Ks}$  при поддерживаемом потенциале 10 мВ (соответствует максимальной амплитуде тока  $I_{Kr}$  в кардиомиоцитах человека) близко к 1 – то есть амплитуды  $I_{Kr}$  и  $I_{Ks}$  практически равны (Li и др., 1996a; Wang, Fermini, Nattel, 1994). В миокарде перепела, по результатам данной работы, отношение амплитуды  $I_{Kr}$  к амплитуде  $I_{Ks}$  в области максимума тока  $I_{Kr}$  (соответствует поддерживаемому потенциалу 20 мВ) составляет 0,53 в предсердных миоцитах и 0,29 в желудочковых. Учитывая описываемую разницу в амплитудах  $I_{Kr}$  и  $I_{Ks}$  можно было бы ожидать, что  $I_{Ks}$  должен вносить более заметный вклад в реполяризацию миокарда птиц. Однако, вопреки нашим ожиданиям, подавление тока  $I_{Ks}$  приводило к весьма ограниченному увеличению длительности ПД: в препаратах желудочкового миокарда перепела аппликация NMR 1556 вызывала увеличение ДПД90 всего на  $11,73 \pm 1,44$  %, тогда как в папиллярных мышцах морской свинки при сходной частоте генерации ПД (5-7 Гц) аппликация NMR 1556 вызывала увеличение длительности ДП более чем на 20% (Gogelein и др., 2000). Таким образом, вклад токов  $I_{Kr}$  и  $I_{Ks}$  в формирование электрической активности миокарда перепела близки к таковым в миокарде относительно крупных млекопитающих – таких, как человек или собака.

Можно предположить, что в миокарде птиц, так же как в миокарде млекопитающих,  $I_{Ks}$  играет роль так называемого реполяризационного резерва: его влияние практически незаметно в условиях нормального функционирования организма, однако он может быть необходим для предотвращения аритмических событий – таких как ранние постдеполяризации (Jost, Papp,

Varró, 2007; Roden, 2006). Многочисленные исследования показали, что именно  $I_{Ks}$ , а не  $I_{Kr}$ , в миокарде различных видов млекопитающих усиливается под действием  $\beta$ -адренергической стимуляции (Jost и др., 2005; Lengyel и др., 2001; Sanguinetti и др., 1991; Varró и др., 2000; Wilders и др., 2010). При активации симпатического отдела автономной нервной системы и при увеличении частоты сердечных сокращений и амплитуды кальциевого тока,  $I_{Ks}$  предотвращает избыточное увеличение длительности ПД, влекущее за собой возможное возникновение ранних постдеполяризаций. Данный механизм может иметь большое значение для перепелов, которые используют свою способность к активному полету почти исключительно для коротких и интенсивных полетов при бегстве от хищников – весьма вероятно, что это происходит в комплексе с активацией симпатической системы (Biewener, Corning, Tobalske, 1998). На это также косвенно указывают показанные в данной работе изменения электрокардиограммы перепела при симпатической нагрузке – а именно укорочение интервалов QT и Tr-Te, указывающее на ускорение реполяризации – и высокая плотность симпатической иннервации в миокарде перепела. Другой возможной ролью тока  $I_{Ks}$  как реполяризационного резерва может быть усиление реполяризации при его участии в случаях, когда длительность ПД значительно увеличивается, тем самым давая  $I_{Ks}$  достаточно времени для полной активации. Подобные ситуации могут наблюдаться при фармакологической блокаде  $I_{Kr}$  (Jost и др., 2005; Lengyel и др., 2009; Varró и др., 2000) или у некоторых видов млекопитающих при сниженной частоте сердечных сокращений (Varró и др., 2000). На данный момент навряд ли можно спекулировать, как часто птицы сталкиваются с ситуациями увеличения длительности потенциалов действия в их миокарде, однако, описываемые свойства и возможная роль  $I_{Ks}$  могут влиять на выживание птиц в состоянии торпора (Wentworth, Cigan, Schaaf, 2009).

#### **5.4.2. Транзиторный выходящий ток $I_{to}$ в миокарде перепела**

Одним из ключевых результатов данной работы является обнаружение транзиторного выходящего тока  $I_{to}$  в миокарде перепела и выявление его участия в формировании электрической активности сердца птиц. Известно, что ток  $I_{to}$  принимает участие в ранней фазе реполяризации миокарда у относительно крупных млекопитающих – таких как человек, собака, кролик (Nerbonne, 2000; Sun, Wang, 2005; Varro, Nanasi, Lathrop, 1993) – тогда как у мелких грызунов с высокой частотой сердечных сокращений, таких как крыса и мышь,  $I_{to}$  играет ключевую роль в реполяризации миокарда (Guo и др., 2000; Gussak и др., 2000; Oudit и др., 2001). Более ранние исследования свидетельствуют о том, что  $I_{to}$  отсутствует в миокарде прочих классов позвоночных животных (Abramochkin, Matchkov, Wang, 2020; Giles и др., 1989; Haverinen, Vornanen, 2009a). Хотя Н. Satoh обнаруживал схожий по характеристикам ток в своих исследованиях на эмбриональных кардиомиоцитах курицы (Satoh, 1995b; Satoh, 1995a),

данные результаты нельзя прямо экстраполировать на наши представления о функционировании сердца взрослых животных. Таким образом, наличие функционального тока  $I_{to}$  в миокарде взрослых птиц было показано впервые в данной работе.

В миокарде млекопитающих ток  $I_{to}$  при более подробном рассмотрении может быть опосредован двумя разными видами каналов и ионов. В составе  $I_{to}$  выделяют кальцийнезависимый калиевый ток  $I_{to1}$ , чувствительный к 4-аминопиридину, и кальцийзависимый хлорный ток  $I_{to2}$  (Ravesloot, Rombouts, 2000; Tseng, Hoffman, 1989). Принимая во внимание независимость обнаруженного тока от ионов  $Ca^{2+}$  и его чувствительность к 4-аминопиридину, мы сопоставили его с током  $I_{to1}$ , на котором будем фокусироваться в дальнейшем (далее обозначен как  $I_{to}$ ).

Ток  $I_{to}$ , зарегистрированный в кардиомиоцитах японского перепела, имел кинетические характеристики и вольт-амперную конфигурацию сходные с таковыми для тока в миокарде млекопитающих (Wang, Duff, 1997; Wettwer и др., 1993). Интересно отметить, что данный ток присутствовал лишь примерно в 20% исследованных клеток. Это может быть результатом гетерогенного распределения каналов, опосредующих ток  $I_{to}$ . В сердце млекопитающих распределение  $I_{to}$  различается между различными участками предсердий (Qi и др., 1994), а также между различными слоями желудочкового миокарда: наибольшая амплитуда тока  $I_{to}$  характерна для эпикардальных слоев (Näbauer и др., 1996; Volk и др., 1999). Поскольку в данной работе при энзиматическом выделении кардиомиоцитов клетки из правого и левого желудочков не разделяли, можно предполагать, что основная масса желудочковых миоцитов принадлежала к достаточно толстому среднему слою миокарда левого желудочка – таким образом, процент эпикардальных миоцитов, которые могли бы обладать выраженным током  $I_{to}$ , был невелик. Другим вероятным объяснением может быть возможное повреждение каналов при обработке ферментами: известно, что, по крайней мере, некоторые калиевые каналы чувствительны к действию протеолитических ферментов (Rajamani и др., 2006).

Принимая во внимание высокую частоту сокращения сердца у птиц, сравнимую с таковой у мелких грызунов (Cogger, Otis, Ringer, 1974; Molcan, Vesela, Zeman, 2016; Skinner и др., 2019; Valance и др., 2008), можно было бы по аналогии предположить, что  $I_{to}$  должен играть ключевую роль в реполяризации миокарда птиц. Однако, проведенные эксперименты показали, что  $I_{to}$  вносит вклад в реполяризацию миокарда перепела до уровня 50% реполяризации – то есть, участвует в ранней фазе реполяризации, что в большей степени соответствует роли данного тока в миокарде более крупных животных – и, в том числе, человека. Тем не менее, нельзя отрицать, что  $I_{to}$  может вносить более значительный вклад в реполяризацию миокарда более мелких видов птиц с гораздо более высокой частотой сокращений сердца.

У крупных млекопитающих ток  $I_{to}$ , обеспечивая раннюю реполяризацию миокарда (Sun, Wang, 2005), выполняет несколько важных регуляторных функций. Во-первых, есть свидетельства в пользу того, что  $I_{to}$  может принимать участие в регуляции электромеханического сопряжения в кардиомиоцитах.  $I_{to}$  фактически определяет мембранный потенциал кардиомиоцита на момент окончания ранней реполяризации и начала фазы плато. Поскольку амплитуда кальциевого тока  $I_{Ca}$  зависит от потенциала на мембране,  $I_{to}$  таким образом может опосредованно регулировать вход кальция в клетку (Bouchard, Clark, Giles, 1995; Sah и др., 2002; Sah, Ramirez, Backx, 2002) и, соответственно,  $Ca^{2+}$ -зависимый выброс  $Ca^{2+}$  из СПР кардиомиоцитов, а также наполнение СПР ионами  $Ca^{2+}$  (Han, Schiefer, Isenberg, 1994; Kaprielian и др., 1999). Поскольку в миокарде млекопитающих кальциевые депо СПР являются основным источником  $Ca^{2+}$  при сокращении (Bers, 1985; Bers, Bridge, 1989; Ravens и др., 1997), описываемое взаимодействие может заметно влиять на сократимость миокарда. Предыдущие работы показали, что в миокарде птиц кальциевые депо СПР также играют ведущую роль в электромеханическом сопряжении (Tanaka, Takagi, Shigenobu, 1995). Поскольку в данной работе было также показано взаимодействие между кальциевыми депо СПР, имеющими большую емкость, и кальциевыми каналами на сарколемме кардиомиоцитов перепела, можно предположить, что ранняя реполяризация миокарда, опосредованная током с быстрой кинетикой (таким как  $I_{to}$ ) является необходимой для животных, задействующих  $Ca^{2+}$  из СПР при сокращении сердца, – то есть, для птиц и млекопитающих. Однако, проверка данного предположения требует дальнейших, более подробных исследований, включающих другие виды птиц.

Другой важной функцией  $I_{to}$  является регуляция длительности ПД и, соответственно, рефрактерного периода. Конфигурация электрической активности миокарда в значительной степени зависит от ее частоты, и эта взаимная зависимость критична для эффективного проведения возбуждения и электромеханического сопряжения в сердце (Greenspan, Edmands, Fisch, 1967; Miller, Wallace, Feezor, 1971). Ранее было показано, что  $I_{to}$ , за счет время-зависимого восстановления после инактивации, определяет зависимость электрической активности сердца от частоты сердечных сокращений и ее рефрактерность (Hou и др., 2018; Litovsky, Antzelevitch, 1989). Данная функция  $I_{to}$  может быть особенно важна для птиц и млекопитающих в аспекте распространения возбуждения в сердце. Показано, что паттерн активации желудочкового миокарда птиц и млекопитающих значительно отличается от такового в сердцах холоднокровных позвоночных (Jensen и др., 2012; Jensen и др., 2013a; Jensen и др., 2013b). Можно предположить, что возможное гетерогенное расположение каналов тока  $I_{to}$  и соответствующие различия в конфигурации электрической активности

между слоями желудочкового миокарда могут быть критичными для описанного паттерна активации – однако, проверка данной гипотезы потребует дальнейших исследований.

#### **5.4.3. Молекулярные корреляты основных реполяризирующих калиевых токов в миокарде перепела**

Использование ПЦР в реальном времени, а также иммунохимических методов, позволило нам в данной работе изучить возможные каналы, опосредующие основные реполяризирующие калиевые токи в миокарде перепела. Поскольку большинство ионных каналов на мембранах клеток состоят из нескольких субъединиц, взаимодействие которых может в известной степени менять характеристики результирующего ионного тока, в данной работе мы затрагивали только порообразующие  $\alpha$ -субъединицы исследуемых каналов.

Поскольку ERG (Kv11.1) и KvLQT1 (Kv7.1), опосредующие токи  $I_{Kr}$  и  $I_{Ks}$ , соответственно, являются весьма древним эволюционным приобретением позвоночных и присутствуют уже в миокарде круглоротых и рыб (Hassinen и др., 2011; Haverinen, Egginton, Vornanen, 2014; Haverinen, Vornanen, 2009a), наличие данных каналов в миокарде птиц не стало неожиданностью. В данной работе мы показали экспрессию мРНК этих каналов и наличие соответствующих белков в миокарде птиц – хотя это нельзя назвать прямыми доказательствами опосредования токов  $I_{Kr}$  и  $I_{Ks}$  именно этими каналами. Предположительно, каналы ERG были напрямую унаследованы птицами от их предков, относившихся к группе рептилий – хотя на сегодняшний день наличие данных каналов в миокарде пресмыкающихся показано только с использованием физиологических, но не молекулярно-биологических методов (Abramochkin, Matchkov, Wang, 2020; Warren и др., 2010a). Однако, в миокарде птиц также присутствуют каналы KvLQT1, предположительно опосредующие ток  $I_{Ks}$  – а он в миокарде ныне живущих рептилий отсутствует (Abramochkin, Matchkov, Wang, 2020; Stecyk и др., 2007; Warren и др., 2010a). Поскольку KvLQT1 и ERG опосредуют токи задержанного выпрямления  $I_{Kr}$  и  $I_{Ks}$ , являющиеся также доминантными реполяризирующими токами в миокарде человека, и мутации в соответствующих генах сопряжены с нарушениями реполяризации, аритмиями – в том числе синдромом удлиненного интервала QT (Splawski и др., 2000; Vincent, Michael, 1998) – обнаружение данных каналов в миокарде птиц делает последних потенциально пригодным экспериментальным объектом для изучения сердечных аритмий, ассоциированных с данными генами, или тестирования препаратов, действующих на эти каналы. Однако, стоит отметить, что для этого необходимы дальнейшие исследования для выяснения набора вспомогательных субъединиц, ассоциированных в миокарде птиц с каналами ERG и KvLQT1.

Как уже упоминалось выше, поскольку праймеры для изучения экспрессии каналов ERG и KvLQT1 в миокарде птиц были синтезированы впервые, сравнить и прокомментировать

относительный уровень экспрессии разных видов каналов не представляется возможным. Однако несмотря на то, что в экспериментах на изолированных кардиомиоцитах было показано, что ток  $I_{Ks}$  значительно сильнее выражен в желудочковых клетках, по сравнению с предсердными, уровень экспрессии каналов KvLQT1 между предсердным и желудочковым миокардом не различался. Возможной причиной данного расхождения могут быть различия в трансляции каналов в предсердной и желудочковой ткани (ввиду слабой селективности выбранных антител вестерн-блоттинг позволял получить лишь качественную информацию о присутствии канальных  $\alpha$ -субъединиц), а также различие в паттернах экспрессии вспомогательных субъединиц каналов KvLQT1 в предсердной и желудочковой ткани. Так, известно, что белок KCNE4 при ассоциации с KvLQT1 может подавлять ток  $I_{Ks}$ , опосредуемый этими каналами (Manderfield, George, 2008) – в то же время, например, для вспомогательной субъединицы того же канала minK показан разный уровень экспрессии в разных типах кардиомиоцитов – например, в рабочих миоцитах желудочков и волокнах Пуркинье (Han и др., 2002).

Результаты экспериментов по оценке чувствительности токов  $I_{Kr}$  и  $I_{Ks}$  к их селективным блокаторам также предоставляют косвенную информацию о молекулярной природе опосредующих их каналов. Чувствительность тока  $I_{Ks}$  к блокатору HMR 1556 в кардиомиоцитах перепела не отличалась от таковой в миокарде млекопитающих – например, морской свинки и собаки (Gogelein и др., 2000; Thomas, Gerlach, Antzelevitch, 2003). Тем не менее, чувствительность тока  $I_{Kr}$  в миокарде перепела к селективному блокатору E-4031, помимо того, что различалась между желудочковыми и предсердными кардиомиоцитами, оказалась также ниже по сравнению с соответствующими значениями для млекопитающих – так, в миокарде морской свинки  $IC_{50}$  подавления тока  $I_{Kr}$  блокатором E-4031 составляет 397 нМ (Sanguinetti, Jurkiewicz, 1990) – что может указывать на некоторые изменения в структуре канала.

Обнаружение тока  $I_{to}$  в миокарде перепела было неожиданным – однако, еще более неожиданным стало обнаружение в миокарде перепела каналов Kv4.3. Данная изоформа калиевых каналов в миокарде млекопитающих опосредует ток  $I_{to}$ . Хотя другие изоформы каналов – такие как Kv4.2 и Kv1.4 – также могут участвовать в формировании тока  $I_{to}$ , именно каналы Kv4.3 всегда присутствуют в наборе каналов, опосредующих  $I_{to}$  в миокарде того или иного вида животного, тогда как другие изоформы каналов могут отсутствовать (Dixon и др., 1996; Dixon, McKinnon, 1994; Oudit и др., 2001; Patel, Campbell, 2005; Rosati и др., 2001; Rosati и др., 2003). В человеческом же миокарде Kv4.3 являются основной изоформой каналов, опосредующих ток  $I_{to}$  (Gaborit и др., 2007). Однако, по всей видимости, паттерн экспрессии Kv4.3 в миокарде птиц характеризуется большой гетерогенностью и, возможно,

вариабельностью, как можно судить по большому разбросу уровней экспрессии, и отличается от такового в сердце человека: в предсердном миокарде человека уровень экспрессии Kv4.3 в значительной степени превышает таковой в желудочковом миокарде (Gaborit и др., 2007). Можно также предположить, что паттерн экспрессии данных каналов в миокарде птиц может быть более сложным и находиться под регуляцией вспомогательных субъединиц – например, KChIP2 (Rosati и др., 2001).

Kv4.3, как и другие каналы, относящиеся к этому семейству, широко распространены в нервной системе позвоночных (Casavant, Colbert, Dryer, 2004; Jerng, Pfaffinger, Covarrubias, 2004; Nakamura, Coetzee, 2008), и на данный момент неизвестно, какие факторы отвечают за их экспрессию в миокарде птиц и млекопитающих и как это связано с их гомойотермией. Ответ на этот вопрос, по крайней мере, отчасти, может быть найден в дальнейших исследованиях на представителях другой группы архозавров – крокодилов, которые имеют полную межжелудочковую перегородку и специализированные проводящие пути в желудочковом миокарде, в отличие от прочих рептилий, и все же остаются пойкилотермными организмами (Jensen и др., 2013a; Jensen и др., 2018).

### **5.5. Калиевые токи входящего выпрямления в миокарде перепела**

В работе было показано присутствие фонового тока входящего выпрямления  $I_{K1}$  как в желудочковых, так и в предсердных миоцитах перепела. Большая амплитуда входящей и выходящей компонент тока  $I_{K1}$  в желудочковых клетках по сравнению с предсердными является общим трендом среди позвоночных животных, как уже упоминалось выше в разделе 5.2.1. Кроме того, соотношение амплитуды  $I_{K1}$  в желудочковых и предсердных миоцитах перепела близко к таковому в желудочковых и предсердных миоцитах человека (Ehrlich, 2008; Varro, Nanasi, Lathrop, 1993). Стоит также отметить, что, по сравнению с холоднокровными позвоночными, предсердный миокард птиц характеризуется относительно высокой амплитудой тока  $I_{K1}$  (Abramochkin, Matchkov, Wang, 2020; Haverinen, Vornanen, 2009a), что может служить для противодействия возникновению аритмий в связи с более высокой частотой сокращений сердца птиц. С другой стороны, по сравнению с млекопитающим, при относительно равной амплитуде тока  $I_{K1}$  в желудочковых миоцитах, ток  $I_{K1}$  в предсердных миоцитах перепела оказывается меньше, чем  $I_{K1}$  в предсердных миоцитах мыши и морской свинки (Panama, McLerie, Lopatin, 2007; Ward и др., 1997). Более выраженная разница в амплитуде  $I_{K1}$  между предсердиями и желудочками перепела может быть обусловлена филогенетическими факторами и более поздним отделением птиц от группы рептилий в ходе эволюции. Для проверки данной гипотезы, однако, необходим анализ токов входящего выпрямления в миокарде других представителей группы архозавров, крокодилов. С другой стороны, при сниженной (по сравнению с млекопитающими) амплитуде тока  $I_{K1}$  в

предсердных миоцитах перепела роль реполяризационного резерва могут брать на себя другие токи – например медленный ток задержанного выпрямления  $I_{Ks}$ . Однако, стоит отметить, что при меньшей амплитуде токов  $I_{K1}$  и  $I_{Ks}$  предсердия птиц могут оказаться более уязвимыми для аритмических событий по сравнению с желудочковым миокардом.

В отличие от амплитуды тока, зависимость степени входящего выпрямления  $I_{K1}$  от мембранного потенциала была одинакова в предсердных и желудочковых миоцитах перепела, как можно судить по отсутствию различий в форме кривых зависимости и их параметров (например,  $V_{0.5}$ ). Это позволяет сделать вывод о том, что, вероятно, состав изоформ каналов, опосредующих ток  $I_{K1}$  в желудочковых и предсердных клетках, не различается: известно, что различные изоформы каналов входящего выпрямления характеризуются разной формой вольт-амперной зависимости и, соответственно, различаются по зависимости входящего выпрямления от поддерживаемого потенциала (Hassinen и др., 2015). Однако, данное утверждение требует дальнейшей проверки с использованием молекулярно-биологических методов.

Также в рамках данной работы был исследован еще один ток входящего выпрямления, вносящий вклад в электрическую активность сердца в норме, – ацетилхолинзависимый ток  $I_{KACH}$ . Как в экспериментах с тканевыми препаратами миокарда перепела, так и в опытах на изолированных кардиомиоцитах было показано наличие тока  $I_{KACH}$ , активирующегося под действием ацетилхолина и его аналогов, в предсердном, но не в желудочковом миокарде перепела, что также является общим трендом среди большинства позвоночных животных (Abramochkin, Matchkov, Wang, 2020; Ehrlich, 2008; Skarsfeldt и др., 2018). Стоит отметить, что аналогичные результаты были получены ранее группой под руководством A.J. Pappano на препаратах миокарда двухнедельных цыплят (Inoue, Nachisu, Pappano, 1983) – однако, двухнедельных цыплят нельзя отнести к взрослым особям; кроме того, в данной работе ацетилхолинзависимый ток  $I_{KACH}$  был исследован более подробно с использованием различных методов. Амплитуда входящей и выходящей компонент ацетилхолинзависимого тока в предсердных кардиомиоцитах перепела были близки к аналогичным значениям для других видов позвоночных животных (Abramochkin, Vornanen, 2017; Lomax, Rose, Giles, 2003). Как и у прочих позвоночных, активация ацетилхолинзависимого тока  $I_{KACH}$  под действием фармакологических агентов в миокарде перепела была дозозависимой. Полуэффективная концентрация активации  $I_{KACH}$  под действием карбахола в предсердных кардиомиоцитах перепела была близка к аналогичным значениям  $EC_{50}$ , полученных в предыдущих исследованиях на других видах животных, в том числе на человеческом миокарде (Abramochkin, Vornanen, 2017; Dobrev и др., 2001). Исходя из полученных результатов в сравнении с данными других исследований, выполненных на различных видах позвоночных



животных, можно заключить, что характеристики и распределение каналов токов входящего выпрямления в миокарде позвоночных слабо менялись в результате эволюции, и в сердце перепела они близки к таковым в сердце млекопитающих.

Несмотря на то, что конститутивно активный ацетилхолинзависимый ток не был обнаружен ни в предсердиях, ни в желудочках перепела, нельзя отвергать возможность его участия в тех или иных патологических состояниях миокарда – например, при фибрилляции предсердий (Bassil и др., 2014; Ehrlich, 2008). Однако, принимая во внимание возможность минорной экспрессии каналов ацетилхолинзависимого тока  $I_{KACH}$  в желудочковом миокарде, показанную для некоторых видов млекопитающих (Dobrzynski и др., 2001; Liang и др., 2014), нельзя полностью отвергать гипотезу о возможном наличии данных каналов в желудочковом миокарде птиц. В норме ток  $I_{KACH}$  может быть замаскирован фоновым током входящего выпрямления  $I_{K1}$ , который в желудочковом миокарде имеет большую амплитуду. В таком случае ацетилхолинзависимый ток будет активироваться только в условиях подавления тока  $I_{K1}$ , противодействуя, таким образом, развитию аритмий при снижении реполяризационного резерва (Beckmann и др., 2008). Помимо этого, нужно учитывать возможное гетерогенное распределение каналов ацетилхолинзависимого тока  $I_{KACH}$  в желудочковом миокарде перепела. Известно, что в желудочковом миокарде человека каналы  $I_{KACH}$  распределены неоднородно и отсутствуют в срединном слое (Liang и др., 2014). Поскольку при выделении изолированных кардиомиоцитов большинство полученных желудочковых клеток относятся именно к срединному слою миокарда, вероятность обнаружить возможный ток  $I_{KACH}$  таким методом крайне низка. Таким образом, несмотря на то что в данной работе присутствие тока  $I_{KACH}$  было показано только для предсердного миокарда перепела, дальнейшие более детальные исследования с применением молекулярно-биологических методов могут выявить данный ток и в желудочковом миокарде птиц.

#### **5.6. Быстрый натриевый ток в миокарде перепела**

Быстрый натриевый ток  $I_{Na}$  был ранее зарегистрирован в желудочковых кардиомиоцитах взрослого перепела (Vornanen, Hassinen, Haverinen, 2011), а также более детально изучен в эмбриональных кардиомиоцитах курицы (Fujii, Ayer, DeHaan, 1988; Gold, Strichartz, 1991; Satoh, 1995d). Тем не менее, в данной работе впервые проведено сравнение характеристик тока  $I_{Na}$  в желудочковых и предсердных кардиомиоцитах взрослых птиц, а также описаны параметры кинетики стационарной активации и активации тока. В рамках данной работы не проводился анализ чувствительности тока  $I_{Na}$  в кардиомиоцитах перепела к тетродотоксину, поскольку эта информация была получена в рамках сравнительно-физиологического исследования, выполненного группой под руководством М. Vornanen (Vornanen, Hassinen, Haverinen, 2011) – однако, поскольку в данной работе  $I_{Na}$  полностью подавлялся

тетродотоксином в концентрации 1 мкМ, можно предположить, что расхождений с литературными данными нет.

Вольт-амперная характеристика быстрого натриевого тока в кардиомиоцитах перепела, описанная в рамках настоящей работы, слабо отличалась от аналогичной вольт-амперной кривой для желудочковых кардиомиоцитов перепела, описанной в предыдущем исследовании (Vornanen, Hassinen, Haverinen, 2011). Незначительные различия касаются расположения максимума и значения пиковой амплитуды  $I_{Na}$ : в данной работе максимум тока располагался на уровне поддерживаемого потенциала -30 мВ, при данном потенциале пиковая амплитуда  $I_{Na}$  составляла  $-59,62 \pm 3,43$  пА/пФ – тогда как в работе М. Vornanen и соавторов максимум амплитуды  $I_{Na}$  в желудочковых кардиомиоцитах перепела находился на уровне -40 мВ и составлял немногим менее -80 пА/пФ. Описываемые различия могут быть связаны с различиями в экспериментальных протоколах и составе растворов: в данной работе концентрация ионов  $Na^+$  в перфузионном растворе, окружающем изолированные кардиомиоциты, была искусственно снижена до 20 мМ, а во внутриклеточном растворе – увеличена до 10 мМ, тогда как в работе М. Vornanen и соавторов концентрации  $Na^+$  снаружи и внутри исследуемых клеток составляли, соответственно, 150 мМ и 5 мМ – столь высокий трансмембранный градиент концентрации ионов  $Na^+$  в сочетании с большой амплитудой тока могут при недостаточной электрической компенсации сопротивления контакта может исказить форму вольт-амперной характеристики и сместить максимум амплитуды тока в сторону более отрицательных потенциалов. Стоит отметить, что в прочих работах максимум вольт-амперной кривой  $I_{Na}$  в кардиомиоцитах птиц находится на уровне -30 или -20 мВ (Fujii, Ayer, DeNaan, 1988; Josephson, Sperelakis, 1989; Satoh, 1995d).

В целом, быстрый натриевый ток в кардиомиоцитах птиц, по всей видимости, отличается крайней высокой амплитудой по сравнению с таковой в миокарде других позвоночных. На это указывает исследование М. Vornanen и соавторов, охватывающее широкий спектр видов (Vornanen, Hassinen, Haverinen, 2011); в эмбриональных кардиомиоцитах птиц амплитуда  $I_{Na}$  тоже весьма велика (Satoh, 1995d), и в ходе эмбриогенеза она постепенно растет (Fujii, Ayer, DeNaan, 1988). Несмотря на то, что разница в максимальной пиковой амплитуде  $I_{Na}$  между предсердными и желудочковыми миоцитами перепела была статистически незначимой, прослеживается общая тенденция более низкой амплитуды  $I_{Na}$  в предсердных клетках. Это также является общим трендом для некоторых других позвоночных животных (Abramochkin, Matchkov, Wang, 2020; Filatova, Abramochkin, Shiels, 2019a) – однако, у некоторых млекопитающих наблюдается обратная ситуация (Chen и др., 2016; Li, Lau, Shrier, 2002).

Стационарная кинетика активации и инактивации  $I_{Na}$  ранее не была исследована в кардиомиоцитах взрослых птиц и была впервые описана в рамках данной работы. Сравнение

полученных данных с литературными данными работ, выполненных на эмбриональных кардиомиоцитах курицы, показывает, что потенциал 50% активации  $I_{Na}$  не различается между исследованиями и всегда находится на уровне приблизительно -30 мВ (Fujii, Ayer, DeNaan, 1988; Gold, Strichartz, 1991). Однако, параметры кинетики стационарной инактивации, полученные в этой работе, отличаются от литературных данных: в кардиомиоцитах перепела кривая инактивации  $I_{Na}$  была сдвинута в сторону более положительных потенциалов, со значениями  $V_{50}$  для тока в предсердных и желудочковых клетках, соответственно, -47,23 мВ и -53,23 мВ, тогда как в эмбриональных кардиомиоцитах курицы  $V_{50}$  находился в пределах -90-80 мВ (Fujii, Ayer, DeNaan, 1988; Gold, Strichartz, 1991). Хотя в работе S. Fujii не показана тенденция сдвига инактивационной кривой вправо в ходе онтогенеза, это может произойти на более поздних этапах развития эмбриона, поскольку в описываемой работе были исследованы эмбрионы возрастом до 7 дней инкубации (Fujii, Ayer, DeNaan, 1988). Функциональная значимость таких особенностей стационарной инактивации  $I_{Na}$  в миокарде перепела остается неясной. С одной стороны, сдвиг кривой инактивации  $I_{Na}$  в миокарде перепела в сторону более положительных потенциалов облегчает возбуждение клетки при деполяризации, с другой стороны – увеличивает так называемый «оконный ток», что, в свою очередь, увеличивает риск развития аритмий (Magistretti, Alonso, 1999). Учитывая, что в предсердных миоцитах перепела кривая стационарной инактивации была дополнительно сдвинута в область более положительных потенциалов, что должно соответствовать большему оконному току натрия, в совокупности со сниженной амплитудой реполяризирующих токов  $I_{Ks}$  и  $I_{K1}$  предсердия перепела могут быть особенно уязвимы к риску возникновения аритмических событий – например, ранних постдеполяризаций. Стоит отметить, что в миокарде млекопитающих, напротив, кривая инактивации  $I_{Na}$  в предсердных клетках сдвинута в сторону более отрицательных потенциалов.

## **5.7. Круговорот $Ca^{2+}$ в миокарде перепела**

### **5.7.1. Сарколеммальные $Ca^{2+}$ каналы**

Сарколеммальный кальциевый ток, зарегистрированный в изолированных кардиомиоцитах японского перепела, имел конвенциональную вольт-амперную характеристику, с активацией тока при потенциалах положительнее -30 мВ и максимумом пиковой амплитуды в области 0 мВ; обнаруженная разница в пиковой амплитуде тока между предсердными и желудочковыми кардиомиоцитами также является общим феноменом для сердец позвоночных животных (Abramochkin, Matchkov, Wang, 2020; Badr и др., 2018; Filatova, Abramochkin, Shiels, 2019b; Hatano и др., 2006; Mewes, Ravens, 1994). Особо стоит отметить большую амплитуду кальциевого тока в желудочковых кардиомиоцитах перепела. Эти результаты хорошо коррелируют с данными, полученными в аналогичном сравнительно-физиологическом

исследовании, выполненном на кардиомиоцитах зяблика и крысы: пиковая амплитуда  $I_{Ca}$  в миоцитах зяблика превышала таковую в клетках крыс на 52% (Bogdanov и др., 1995). Ранее в работах А. Fabiato было показано, что чем больше амплитуда сарколеммального  $I_{Ca}$ , тем сильнее следующий за этим выброс  $Ca^{2+}$  из СПР (Fabiato, 1983; Fabiato, 1985). Таким образом, высокая амплитуда  $I_{Ca}$  в миокарде птиц может обеспечивать за счет этого механизма сильные и быстрые сокращения.

Стоит отметить, что амплитуда  $I_{Ca}$  в кардиомиоцитах перепела оказалась значительно выше таковой в миокарде холоднокровных позвоночных (Badr и др., 2018; Galli, Taylor, Shiels, 2006; Galli, Warren, Shiels, 2009; Haworth и др., 2014; Vornanen и др., 1998), которые не задействуют  $Ca^{2+}$  депо СПР при электромеханическом сопряжении (Shiels, Galli, 2014; Shiels, Sitsapesan, 2015). Однако, стоит отметить, что рыбы семейства Скумбриевых (различные виды тунцов), известные своим высоким уровнем активности, интенсивным метаболизмом и способностью задействовать  $Ca^{2+}$  депо СПР при сокращении сердца, также характеризуются высокой амплитудой  $I_{Ca}$ . В экспериментальных условиях, сходных с таковыми в данной работе (комнатная температура, 5 мМ ЭГТА в пипеточном растворе) желудочковые кардиомиоциты японской скумбрии *Scomber japonicas* и обыкновенного тунца *Thunnus thynnus* демонстрировали сравнительно высокую амплитуду  $I_{Ca}$  (Galli и др., 2011; Shiels и др., 2004). Таким образом, это поддерживает выдвинутую выше гипотезу о том, что высокоамплитудный сарколеммальный ток  $I_{Ca}$  может быть характерным свойством кардиомиоцитов, активно использующих при сокращении  $Ca^{2+}$  депо СПР, в особенности при отсутствии системы Т-трубочек. Интересно, что эта закономерность не касается беспозвоночных видов с высоким уровнем активности – например, головоногих моллюсков. Кардиомиоциты их системного сердца характеризуются высоким содержанием  $Ca^{2+}$  в СПР, и значительным вкладом СПР в сократительную активность миокарда – однако, сарколеммальный ток  $I_{Ca}$  в этих клетках имеет относительно небольшую амплитуду (Altimiras, Hove-Madsen, Gesser, 1999).

Важно отметить, что температура может оказывать значительное влияние на  $I_{Ca}$ . При температуре, характерной для температуры тела организмов *in vivo*, пиковая амплитуда  $I_{Ca}$  предположительно должна оказаться еще выше, чем по результатам данной работы, где ток регистрировали при комнатной температуре. Значения  $Q_{10}$  для пиковой амплитуды  $I_{Ca}$  у позвоночных, как правило, приблизительно равны 2:  $Q_{10} \sim 2$  для радужной форели (Shiels, Vornanen, Farrell, 2000);  $Q_{10} \sim 1,8$  для суслика Ричардсона (Herve и др., 1992);  $Q_{10} \sim 2,7$  для желудочков кролика (Shimoni, Vanno, 1993). Таким образом, поскольку амплитуда сарколеммального  $I_{Ca}$  важна для усиления кальциевого транзientа, при температуре тела кальцийзависимый выброс  $Ca^{2+}$  в кардиомиоцитах птиц будет сильнее.

На сегодняшний день нет четкого мнения о том, какие токи опосредуют транссарколеммальный вход  $\text{Ca}^{2+}$  в кардиомиоциты птиц. Некоторые исследования утверждают, что отчасти вход  $\text{Ca}^{2+}$  в миокарде птиц опосредуется  $\text{Ca}^{2+}$  каналами Т-типа – как у взрослых особей (Bogdanov и др., 1995), так и у эмбрионов (Brotto, Creazzo, 1996; Creazzo, Burch, Godt, 2004; Kitchens, Burch, Creazzo, 2003) – тогда как другие исследователи данный ток в миокарде птиц не обнаружили (Kim и др., 2000). Поскольку  $\text{Ca}^{2+}$  ток Т-типа также характерен для эмбриональных кардиомиоцитов млекопитающих, не имеющих Т-трубочек (Xu, Best, 1992), в работе К. Богданова и соавторов была выдвинута гипотеза, что данный ток может быть необходим для успешного электромеханического сопряжения в кардиомиоцитах с плохо развитым СПР в отсутствие Т-трубочек. Это отчасти подтверждается результатами работ на эмбрионах птиц, которые показали, что в эмбриональных кардиомиоцитах птиц также присутствует  $\text{Ca}^{2+}$  ток Т-типа – однако, его амплитуда и относительный вклад в общий транссарколеммальный вход  $\text{Ca}^{2+}$  снижаются в ходе онтогенеза (Creazzo, Burch, Godt, 2004; Kawano, DeNaap, 1991). В данной работе  $\text{Ca}^{2+}$  ток Т-типа не был выявлен в рабочем миокарде взрослых птиц – по крайней мере, полученные электрофизиологические данные показывают, что ток со сходными характеристиками в кардиомиоцитах перепела отсутствует. Исходя из полученных данных, мы предполагаем, что  $I_{\text{Ca}}$  в миокарде перепела опосредуется только  $\text{Ca}^{2+}$  каналами L-типа – предположительно, судя по форме вольт-амперной характеристики и расположению максимума пиковой амплитуды тока, на мембране кардиомиоцитов перепела могут присутствовать каналы изоформ  $\text{Cav}1.2$  и  $\text{Cav}1.3$  (Park и др., 2015). При этом, принимая во внимание обнаруженные нами различия в стационарной кинетике инактивации кальциевого тока между предсердными и желудочковыми клетками, изоформный состав каналов, а также набор вспомогательных субъединиц, могут различаться между разными областями сердца. Тем не менее, нельзя отвергать возможность того, что  $\text{Ca}^{2+}$  ток Т-типа может присутствовать в кардиомиоцитах мелких видов птиц, с более высокой, по сравнению с таковой у перепела, частотой сердечных сокращений – как это было показано для зяблика – для обеспечения которой требуется  $\text{Ca}^{2+}$  ток с более быстрыми кинетическими характеристиками (Bogdanov и др., 1995).

### **5.7.2. $\text{Ca}^{2+}$ депо СПР в миокарде перепела**

Имеющиеся литературные данные указывают на то, что, несмотря на отсутствие системы Т-трубочек, кардиомиоциты птиц в значительной степени используют  $\text{Ca}^{2+}$  депо СПР при сокращении (Creazzo, Burch, Godt, 2004; Tanaka, Takagi, Shigenobu, 1995), а  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза SERCA на мембранах их СПР демонстрирует весьма высокую активность. (Gwathmey и др., 1999). Однако, ранее емкость  $\text{Ca}^{2+}$  депо СПР была оценена только в эмбриональных

кардиомиоцитах птиц (Creazzo, Burch, Godt, 2004), тогда как функционирование СПР и круговорот  $\text{Ca}^{2+}$  в миокарде взрослых птиц оставались слабо изученными.

В данной работе впервые была произведена оценка стационарного содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в депо СПР в кардиомиоцитах взрослых птиц; эксперименты показали весьма высокие значения содержания  $\text{Ca}^{2+}$ , что хорошо согласуется с приведенными выше фактами. После 15 деполяризующих импульсов рост содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР предсердных и желудочковых миоцитов замедлялся, концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в обеих популяциях клеток достигала приблизительно 425 мкМ. Эти значения сравнимы с полученными в экспериментах на эмбриональных кардиомиоцитах птиц – 400 мкМ (Creazzo, Burch, Godt, 2004). Более высокое содержание  $\text{Ca}^{2+}$ , депонированного в предсердных миоцитах, по сравнению с таковым в желудочковых является общим трендом для других позвоночных, как пойкилотермных, так и гомойотермных (Haverinen, Vornanen, 2009b; Walden, Dibb, Trafford, 2009). Хотя прямые сравнения полученных данных с предыдущими исследованиями провести затруднительно из-за различий в экспериментальных условиях и протоколах, стационарное содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР кардиомиоцитов перепела достигалось после 15-25 импульсов, в зависимости от типа клеток, – тогда как для стационарной загрузки СПР кардиомиоцитов холоднокровных позвоночных требуется более 25 импульсов (Haverinen, Vornanen, 2009b; Shiels, Vornanen, Farrell, 2002), для кардиомиоцитов млекопитающих всего 5-10 импульсов (Delbridge, Bassani, Bers, 1996; Ginsburg, Weber, Bers, 1998).

С другой стороны, стационарное содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР кардиомиоцитов птиц сравнимо с таковым в большинстве исследованных видов рыб, включая радужную форель, скумбрию и тунцов (Haverinen, Vornanen, 2009b; Shiels, Galli, 2014), и значительно превосходит аналогичные значения для млекопитающих: у последних стационарное содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР кардиомиоцитов составляет 50-200 мкМ (Negretti, Varro, Eisner, 1995; Venetucci и др., 2006). В кардиомиоцитах рыб незначительное участие  $\text{Ca}^{2+}$  депо СПР в электромеханическом сопряжении при столь высоком содержании  $\text{Ca}^{2+}$  объясняется низкой плотностью рианодиновых рецепторов и особенностями их расположения относительно сарколеммальных  $\text{Ca}^{2+}$  каналов (Shiels, Sitsapasan, 2015); в кардиомиоцитах млекопитающих низкое содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР также объясняется особенностями расположения рианодиновых рецепторов и регуляции СПР (Venetucci и др., 2006). В то же время, обнаружение значительного содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР кардиомиоцитов птиц в сочетании со значительным участием СПР в электромеханическом сопряжении отличается от модели круговорота  $\text{Ca}^{2+}$  в миокарде холоднокровных позвоночных и в миокарде млекопитающих. Известно, что несмотря на отсутствие Т-трубочек, кардиомиоциты птиц характеризуются особым строением СПР и паттерном расположения рианодиновых рецепторов на нем. Кардиомиоциты птиц обладают

хорошо развитыми специализированными компартментами СПР, в том числе корбулярным СПР, которые содержат расположенные вдоль Z-линий рианодиновые рецепторы (Perni, Iyer, Franzini-Armstrong, 2012; Sheard и др., 2019; Sommer, Jennings, 1986). По всей видимости, эти ультраструктурные особенности обеспечивают эффективное сопряжение транссарколеммального входа  $\text{Ca}^{2+}$  и выброса  $\text{Ca}^{2+}$  из СПР.

Несмотря на то, что о буферной емкости для  $\text{Ca}^{2+}$  в сердце птиц известно весьма мало, было показано, что в эмбриональных кардиомиоцитах птиц буферная емкость ниже по сравнению с таковой в кардиомиоцитах млекопитающих (Creazzo, Burch, Godt, 2004). Таким образом, маловероятно, что низкий уровень буферной емкости цитозоля (25 мкМ ЭГТА в пипеточном растворе) был причиной ошибочно завышенной оценки содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР кардиомиоцитов перепела в данной работе. Кроме того, плотность рианодиновых рецепторов в кардиомиоцитах птиц и их чувствительность к цитозольному уровню  $\text{Ca}^{2+}$  близки к таковым в кардиомиоцитах млекопитающих (Junker, Sommer, Meissner, 1994). Однако, также было показано, что буферная емкость для  $\text{Ca}^{2+}$  в кардиомиоцитах птиц имеет тенденцию расти в ходе эмбриогенеза (Creazzo, Burch, Godt, 2004) – таким образом, перспективы дальнейших исследований касаются оценки буферной емкости кардиомиоцитов взрослых птиц, а также чувствительности их рианодиновых рецепторов к концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР и цитозоле при температуре тела птиц.

### **5.7.3. Взаимодействие сарколеммальных $\text{Ca}^{2+}$ каналов и рианодиновых рецепторов**

Обнаруженное в данной работе взаимодействие между сарколеммальным  $I_{\text{Ca}}$  и рианодиновыми рецепторами свидетельствует о функциональном сопряжении сарколеммы и СПР. Многочисленные исследования с использованием электронной микроскопии показали, что две эти мембранные структуры в кардиомиоцитах птиц расположены близко друг к другу, а в межмембранном пространстве присутствуют рианодиновые рецепторы (Akester, 1981; Bossen, Sommer, Waugh, 1978; Hirakow, 1970; Junker, Sommer, Meissner, 1994; Perni, Iyer, Franzini-Armstrong, 2012). Однако, функциональная оценка взаимодействия между ними ранее не проводилась.

В данной работе было показано влияние степени заполнения СПР кальцием на кинетические характеристики  $I_{\text{Ca}}$  – однако, описываемое взаимодействие между  $\text{Ca}^{2+}$  каналами на сарколемме и рианодиновыми рецепторами в выбранных экспериментальных условиях было продемонстрировано только для желудочковых кардиомиоцитов перепела. В предсердных кардиомиоцитах в условиях эксперимента в ответ на активацию  $I_{\text{Ca}}$  не происходил выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из СПР – соответственно, не происходил резкий подъем концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме, влияющий на инактивацию  $I_{\text{Ca}}$ . Отсутствие наблюдаемого взаимодействия в предсердных кардиомиоцитах может быть объяснено как менее

благоприятным расположением рианодиновых рецепторов и  $\text{Ca}^{2+}$  каналов друг относительно друга, так и более низкой амплитудой  $I_{\text{Ca}}$  в предсердных миоцитах – что, соответственно, могло ослабить кальцийзависимый выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из СПР. Вторая гипотеза подтверждается результатами работы С. Cros и соавторов на кардиомиоцитах радужной форели – было показано, что кальцийзависимый выброс  $\text{Ca}^{2+}$  и взаимодействие между рианодиновыми рецепторами и сарколеммальными каналами могут быть усилены при адренергической стимуляции, увеличивающей амплитуду  $I_{\text{Ca}}$ . Для успешного сопряжения этих двух источников  $\text{Ca}^{2+}$  в кардиомиоцитах форели амплитуда  $I_{\text{Ca}}$  должна была составлять не менее 6 пА/пФ (Cros и др., 2014). Стоит также учитывать температурный фактор: в аналогичных экспериментах при температуре тела птиц амплитуда  $I_{\text{Ca}}$  в предсердных кардиомиоцитах может оказаться достаточной для наблюдения взаимодействия между рианодиновыми рецепторами и сарколеммальными  $\text{Ca}^{2+}$  каналами – таким образом, дальнейшие исследования, нацеленные на изучение круговорота  $\text{Ca}^{2+}$  в миокарде птиц, должны проводиться при более высокой температуре. Неспособность  $I_{\text{Ca}}$  в предсердных кардиомиоцитах вызвать выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из СПР в условиях эксперимента может объяснять более высокий уровень содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР предсердных клеток, а также подразумевает, что рианодиновые рецепторы в предсердных кардиомиоцитах птиц не открываются спонтанно при высоких концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  в СПР – аналогичная ситуация описана для кардиомиоцитов рыб (Shiels, Sitsapesan, 2015). К сожалению, о регуляции функции СПР и рианодиновых рецепторов в сердце птиц на сегодняшний день ничего неизвестно, поэтому дальнейшие исследования в этой области также необходимы.

На степень взаимодействия между сарколеммальными  $\text{Ca}^{2+}$  каналами и рианодиновыми рецепторами указывает то, насколько быстро параметры инактивации  $I_{\text{Ca}}$  достигают стационарных значений. Проводить прямые сравнения полученных результатов с предыдущими исследованиями на других видах позвоночных сложно из-за различий в экспериментальных протоколах. Однако, известно, что в кардиомиоцитах млекопитающих в аналогичных экспериментах инактивация  $I_{\text{Ca}}$  достигает стационарного состояния приблизительно за 5 деполяризующих импульсов (Adachi-Akahane, Cleemann, Morad, 1996; Sham, 1997) – тогда как в желудочковых кардиомиоцитах перепела стационарные значения достигались приблизительно за 4-5 импульсов, а в кардиомиоцитах рыб в аналогичных условиях – за 20 импульсов (Shiels, Vornanen, Farrell, 2002). Повышение температуры в условиях эксперимента предположительно ускорит достижение стационарных значений кинетики инактивации  $I_{\text{Ca}}$ . Для более полного понимания круговорота  $\text{Ca}^{2+}$  в миокарде птиц и его изменений в ходе эволюции позвоночных животных необходимы дальнейшие исследования, которые позволили бы разделить вклад сарколеммального входа  $\text{Ca}^{2+}$  и



регуляции риаодиновых рецепторов и СПР в обнаруженное взаимодействие между ними в миокарде птиц.

## **5.8. Электрофизиологические характеристики пейсмекерного миокарда перепела**

### **5.8.1. Местоположение водителя ритма сердца птиц**

В данной работе впервые с использованием метода оптического картирования было показано местоположение источника возбуждения в сердце птиц. Большинство более ранних исследований были выполнены с использованием менее современных методов с меньшей разрешающей способностью, либо включали гистологическое описание области водителя ритма сердца. Большинство исследователей сходятся во мнении, что источником возбуждения в сердце птиц, как и в сердце млекопитающих, является отграниченный от прочего миокарда коллагеновой капсулой синоатриальный узел, ведущий свое происхождение от венозного синуса, инкорпорированного у большинства птиц в предсердия. При этом, стоит отметить, что, хотя домашняя курица (*Gallus domesticus*) и японский перепел (*Coturnix japonica*) являются эволюционно достаточно близкими видами, в данной исследовании мы не обнаружили имеющегося у курниц венозного синуса в сердце перепела (Jensen и др., 2014; Parto, Tadjalli, Ghazi, 2010). Одно из наиболее подробных иммуногистохимических исследований в этой области, выполненное на сердцах различных видов птиц, показало, что экспрессия транскрипционного фактора *Isl1*, традиционно считающегося маркером пейсмекерного миокарда, характерна для области, прилегающей ко входу правой верхней полой вены, отделенному от правого предсердия синоатриальным клапаном (Kroneman и др., 2019). В данной работе мы также наблюдали генерацию возбуждения, распространяющегося в дальнейшем в тканевом препарате, в области, прилегающей к синоатриальному клапану, что соответствует данным предыдущих исследований. Есть также данные о том, что створки синоатриального клапана, имеющие мышечное строение и демонстрирующие сократительную активность, также могут участвовать в генерации электрического возбуждения и, по крайней мере, демонстрируют электрическую активность пейсмекерного типа, однако, эта гипотеза требует более внимательного рассмотрения (Feige, 1993; Moore, 1965).

### **5.8.2. Электрическая активность и электрофизиологический фенотип пейсмекерного миокарда перепела**

Данных касательно параметров электрической активности пейсмекерной ткани сердца взрослых птиц в литературе крайне мало. Так, E.N. Moore в своей пионерской работе показал генерацию потенциалов действия пейсмекерного действия в области синоатриального клапана (в том числе его мышечными створками) в правом предсердии курицы – однако, не представил подробного описания параметров данной электрической активности (Moore, 1965). Прошева

и Касева в своей работе описали параметры электрической активности клеток пейсмекерного типа из атриовентрикулярного кольца сердца курицы – однако, очевидно, данная область миокарда не является истинным пейсмекером, ввиду крайне малой скорости МДД по сравнению с таковой, полученной в данном исследовании (Prosheva, Kaseva, 2016). Таким образом, данная работа впервые описывает параметры электрической активности пейсмекерного миокарда взрослого перепела. В целом, конфигурация пейсмекерных потенциалов действия в миокарде перепела была типичной для большинства позвоночных. Однако, стоит обратить особое внимание на крайне высокую скорость медленной диастолической деполяризации:  $V_{МДД}$  в миокарде перепела превышает  $V_{МДД}$  в пейсмекерном миокарде мыши и крысы более чем в 2 раза (Pustovit, Kuzmin, Sukhova, 2015; Абрамочкин, 2013). Однако, сравнение амплитуды пейсмекерного тока  $I_f$  дает противоположный результат: амплитуда данного тока у крыс, нормированная по емкости кардиомиоцитов, оказывается выше (D'Souza и др., 2014). С одной стороны, это косвенно указывает на то, что хотя каналы HCN4, опосредующие ток  $I_f$ , являются одним из маркеров пейсмекерного миокарда птиц, роль тока  $I_f$  как деполяризующего пейсмекерного тока в миокарде птиц снижена по сравнению с таковой в миокарде млекопитающих (Vicente-Steijn и др., 2011). С другой стороны, это может также указывать на возможные особенности круговорота  $Ca^{2+}$  и работы «кальциевых часов» в пейсмекерном миокарде птиц, и данная гипотеза требует дальнейших, более подробных исследований.

Такие особенности электрофизиологического фенотипа как отсутствие быстрого натриевого тока и крайне низкая амплитуда фонового тока входящего выпрямления  $I_{K1}$  также характерны для пейсмекерных кардиомиоцитов большинства позвоночных (Cho, Takano, Noma, 2003; Satoh, 2003). Низкая амплитуда тока  $I_{K1}$  делала возможным отсутствие стабильного потенциала покоя и наличие МДД в пейсмекерных клетках. Однако, зависимость степени выпрямления тока  $I_{K1}$  от поддерживаемого потенциала в пейсмекерных клетках перепела отличалась от таковой в рабочем миокарде, что может указывать на различный изоформный состав каналов данного тока в пейсмекерном и рабочем миокарде птиц – подобная разница характерна и для других позвоночных (Marionneau и др., 2005).

Стоит также отметить, что хотя набор реполяризующих калиевых токов в пейсмекерном миокарде перепела не отличался от такового в рабочем миокарде, амплитуда медленного тока задержанного выпрямления  $I_{Ks}$  в пейсмекерных клетках была весьма высока и сравнима с таковой в желудочковых клетках. Это может быть связано с тем, что ток  $I_{Ks}$ , как обсуждалось выше, предположительно выполняет в миокарде птиц роль реполяризационного резерва – и, таким образом, предотвращает возникновение аритмических событий, что особенно важно для водителя ритма сердца. Кроме того, поскольку для тока  $I_{Ks}$  характерна сильно выраженная

адренергическая регуляция, он может в значительной степени опосредовать укорочение потенциалов действия при активации симпатической системы и, таким образом, также предотвращать возникновение постдеполяризаций (Wilders и др., 2010).

## 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа посвящена детальному изучению электрической активности миокарда взрослых птиц на примере японского перепела, а также основных ионных каналов и структур, вносящих вклад в ее формирование. Ввиду большой эволюционной дистанции между птицами и человеком, физиология птиц и, в частности, физиология их сердца изучены хуже по сравнению с особенностями физиологии млекопитающих. Основная часть исследований, касающаяся физиологии птиц, выполнена на эмбрионах птиц и культурах их клеток, что не позволяет перенести полученные данные на взрослые организмы. Однако, с фундаментальной точки зрения, миокард птиц представляет собой крайне интересное сочетание архаичной морфологии и структуры кардиомиоцитов и высокого уровня производительности, в некоторых случаях превышающего таковой у млекопитающих. Независимое приобретение четырехкамерного сердца, способности к полету и способности к поддержанию температуры тела птицами в ходе эволюции предполагает, что функционирование сердца птиц должно в известной степени отличаться как от рептилий, так и от млекопитающих. С другой стороны, современная физиология сердца требует поиска новых модельных объектов для исследования регуляции функций миокарда и тестирования новых кардиотропных препаратов в норме и в патологических условиях. Поэтому данная работа также ставила целью оценку перспектив использования миокарда птиц в экспериментальной кардиологии.

Наряду с определением местоположения водителя ритма в сердце перепела и описанием базовых характеристик электрической активности рабочего и пейсмекерного миокарда перепела в базальных условиях, нами впервые было показано наличие токов задержанного выпрямления  $I_{Kr}$  и  $I_{Ks}$  в кардиомиоцитах птиц, а также их вклад в реполяризацию миокарда. Эти же токи обеспечивают позднюю реполяризацию миокарда человека, причем, так же, как и в миокарде перепела, основной вклад в реполяризацию кардиомиоцитов в норме вносит  $I_{Kr}$ . В данной работе впервые было показано наличие транзиторного выходящего калиевого тока  $I_{to}$  в миокарде взрослых птиц. Поскольку данный ток отсутствует в сердцах холоднокровных позвоночных, ранее он считался исключительным эволюционным приобретением млекопитающих. Однако, в миокарде перепела отсутствовал ультрабыстрый ток задержанного выпрямления  $I_{Kur}$ , характерный для миокарда человека. Сравнение с рептилиями показывает, что помимо тока  $I_{to}$  в миокарде птиц также появился ток  $I_{Ks}$  – или же ныне живущие представители класса пресмыкающихся потеряли его в ходе эволюции. Таким образом, электрофизиологический фенотип сердца птиц несет как следы приспособления к новой экологической нише, так и отпечаток особенностей филогенеза.

Также в данной работе впервые было показано присутствие в миокарде перепела белков Kv11.1 (ERG), Kv7.1 (KvLQT1) и Kv4.3. Поскольку в миокарде млекопитающих и других

позвоночных данные каналы опосредуют токи  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$  и  $I_{to}$ , нами было сделано предположение об аналогичной молекулярной природе данных токов в миокарде птиц. Однако, данная гипотеза требует подтверждения – секвенирования обнаруженных транскриптов и создания линий нокаутных животных. Поскольку именно набор реполяризирующих калиевых токов определяет реполяризацию миокарда животного, эффективность использования тех или иных кардиотропных препаратов и, соответственно, релевантность модельного объекта, данный вопрос требует наиболее подробного рассмотрения в дальнейших исследованиях. Однако, на основании полученных нами данных уже можно заключить, что миокард перепела по своим электрическим характеристикам на клеточном уровне достаточно близок к миокарду человека – по крайней мере, ближе, чем миокард крысы и мыши – и, следовательно, является перспективным модельным объектом для экспериментальной кардиологии.

Вопреки предположениям, основанным на результатах предыдущих исследований, вход  $Ca^{2+}$  в кардиомиоцитах перепела обеспечивался только каналами L-типа, тогда как  $Ca^{2+}$  ток T-типа в рабочем миокарде отсутствовал. Однако, каналы T-типа могут вносить вклад в функционирование рабочего миокарда более мелких видов птиц с высокой частотой сокращения сердца. Еще одной особенностью рабочего миокарда птиц является обеспечение эффективного и интенсивного кальцийзависимого выброса  $Ca^{2+}$  из СПР в ходе электромеханического сопряжения, несмотря на архаичную структуру кардиомиоцитов и отсутствие системы поперечных трубочек. В данной работе впервые была проведена оценка емкости  $Ca^{2+}$  депо СПР кардиомиоцитов птиц и продемонстрировано функциональное взаимодействие между  $Ca^{2+}$  каналами на сарколемме и рианодиновыми рецепторами на мембране СПР кардиомиоцитов птиц. Несмотря на отсутствие T-трубочек, взаимодействие  $Ca^{2+}$  каналов и рианодиновых рецепторов в миокарде птиц не менее тесно, чем в миокарде млекопитающих. По всей видимости, наряду с особым паттерном расположения рианодиновых рецепторов, роль в этом играет высокая амплитуда сарколеммального  $Ca^{2+}$  тока.

Выявленное нами с помощью метода оптического картирования местоположение водителя ритма в сердце перепела совпадает с результатами гистологических и иммунохимических исследований. Мы также впервые подробно описали электрическую активность и электрофизиологический фенотип пейсмекерных клеток, выделенных из области водителя ритма. Однако, хотя набор ионных токов и их амплитуда в пейсмекерном миокарде перепела по сравнению с таковыми в рабочем миокарде были вполне характерны для большинства позвоночных, необходимы дальнейшие исследования круговорота кальция и механизма «кальциевых часов» в пейсмекерных кардиомиоцитах.

## 7. ВЫВОДЫ

1. Электрокардиограмма японского перепела имела типичную для птиц конфигурацию. Частота сокращений сердца в покое была близка к таковой у мелких млекопитающих (например, крысы), однако, при фармакологической нагрузке сердце перепела развивало более высокую частоту сокращений; изменение частоты сокращений сердца на электрокардиограмме происходило за счет ускорения реполяризации и укорочения межцикловых интервалов.
2. Рабочий миокард перепела имеет сильно отрицательный потенциал покоя, различий в уровне потенциала покоя между предсердным и желудочковым миокардом нет. Потенциалы действия в желудочковом миокарде имеют большую длительность по сравнению с предсердиями; соотношение длительностей потенциалов действия в желудочковом и предсердном миокарде перепела близко к таковому у млекопитающих средних размеров (морская свинка, кролик).
3. Основными реполяризующими токами в миокарде перепела являются быстрый и медленный токи задержанного выпрямления  $I_{Kr}$  и  $I_{Ks}$ , а также транзиторный выходящий ток  $I_{to}$ . Блокаторы данных токов вызывают замедление реполяризации миокарда перепела. Данный набор реполяризующих токов отличается от такового в миокарде человека, собаки и кролика отсутствием тока  $I_{Kur}$  – однако, ближе к нему по сравнению с электрофизиологическим фенотипом крысы и морской свинки, что делает миокард перепела перспективным модельным объектом для экспериментальной физиологии сердца.
4. В рабочем миокарде перепела экспрессируются и транслируются белки Kv11.1, Kv7.1 и Kv4.3, опосредующие токи  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$  и  $I_{to}$  в миокарде млекопитающих, соответственно, и являющиеся потенциальными молекулярными коррелятами каналов, опосредующих эти токи в миокарде перепела.
5. В базальных условиях токи входящего выпрямления в миокарде перепела представлены током  $I_{K1}$ ; в желудочковом миокарде  $I_{K1}$  выражен сильнее по сравнению с предсердным. Ацетилхолинзависимый ток входящего выпрямления  $I_{KACH}$  активируется в присутствии ацетилхолина и его аналогов, чувствителен к селективному блокатору терциапину и присутствует только в предсердном миокарде перепела. Конститутивно активный ток  $I_{KACH}$  в рабочем миокарде перепела отсутствует.
6. Сарколеммальный кальциевый ток в желудочковых кардиомиоцитах имеет значительную амплитуду. Вход  $Ca^{2+}$  в кардиомиоциты перепела опосредован кальциевыми каналами L-типа, кальциевый ток T-типа в рабочем миокарде взрослого перепела отсутствует. Емкость кальциевых депо саркоплазматического ретикулума в рабочем миокарде перепела сопоставима с таковой у холоднокровных позвоночных и

значительно превышает таковую у млекопитающих. Впервые показано наличие функционального взаимодействия между  $\text{Ca}^{2+}$  каналами на сарколемме и риаудиновыми рецепторами в желудочковых кардиомиоцитах перепела.

7. Электрическое возбуждение в сердце перепела генерируется миокардом в области входа правой верхней поллой вены в правое предсердие. Электрическая активность данной области характеризуется высокой скоростью медленной диастолической деполяризации. Электрофизиологический фенотип пейсмекерных клеток сходен с таковым у прочих позвоночных и характеризуется отсутствием тока  $I_{\text{Na}}$ , присутствием активируемого гиперполяризацией тока  $I_f$  и низкой амплитудой фонового тока входящего выпрямления  $I_{\text{K1}}$ .

## 8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abdalla F. Y. O., Wu L., Ullah H., Ren G., Noor A., Mkindu H., Zhao Y. Deep convolutional neural network application to classify the ECG arrhythmia // *Signal, Image Video Process.* 2020. С. 1–9.
2. Abramochkin D., Kuzmin V. Electrophysiological differences in cholinergic signaling between the hearts of summer and winter frogs (*Rana temporaria*) // *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 2018. Т. 188. № 4. С. 649–656.
3. Abramochkin D. V., Matchkov V., Wang T. A characterization of the electrophysiological properties of the cardiomyocytes from ventricle, atrium and sinus venosus of the snake heart // *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 2020. Т. 190. № 1. С. 63–73.
4. Abramochkin D. V., Vornanen M. Inhibition of the cardiac ATP-dependent potassium current by KB-R7943 // *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* 2014. Т. 175. № 1. С. 38–45.
5. Abramochkin D. V., Vornanen M. Seasonal changes of cholinergic response in the atrium of Arctic navaga cod (*Eleginus navaga*) // *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 2017. Т. 187. № 2. С. 329–338.
6. Adachi-Akahane S., Cleemann L., Morad M. Cross-signaling between L-type Ca<sup>2+</sup> Channels and Ryanodine Receptors in Rat Ventricular Myocytes // *J. Gen. Physiol.* 1996. Т. 108. С. 435–454.
7. Akester A. R. Intercalated discs, nexuses, sarcoplasmic reticulum and transitional cells in the heart of the adult domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). // *J. Anat.* 1981. Т. 133. № Pt 2. С. 161–79.
8. Alexander S. M., Jackson K. J., Bushnell K. M., McGuire P. G. Spatial and temporal expression of the 72-kDa type IV collagenase (MMP-2) correlates with development and differentiation of valves in the embryonic avian heart // *Dev. Dyn.* 1997. Т. 209. № 3. С. 261–268.
9. Altimiras J., Lindgren I., Giraldo-Deck L. M., Matthei A., Garitano-Zavala Á. Aerobic performance in tinamous is limited by their small heart. A novel hypothesis in the evolution of avian flight // *Sci. Rep.* 2017. Т. 7. С. 15964.
10. Altimiras J., Giraldo-Deck L. M., Garitano-Zavala Á. The small heart of the Ornate Tinamou is compatible with endothermy and flight but compromises aerobic metabolism and thermoregulation during recovery from exhaustive activity // *FASEB J.* 2013. Т. 27. С. 1149.18.
11. Altimiras J., Hove-Madsen L., Gesser H. Ca<sup>2+</sup> uptake in the sarcoplasmic reticulum from the systemic heart of octopod cephalopods // *J. Exp. Biol.* 1999. Т. 202. № 18. С. 2531–2537.
12. Altman P. L., Dittmer D. S. *Respiration and circulation.* Bethesda: Federation of American



Societes for Experimental Biology, 1971. 930 c.

13. Amin A. S., Groot E. A. A. de, Ruijter J. M., Wilde A. A. M., Tan H. L. Exercise-Induced ECG Changes in Brugada Syndrome // *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.* 2009. T. 2. № 5. C. 531–539.
14. Anderson C. L., Kuzmicki C. E., Childs R. R., Hintz C. J., Delisle B. P., January C. T. Large-scale mutational analysis of Kv11.1 reveals molecular insights into type 2 long QT syndrome // *Nat. Commun.* 2014. T. 5. № 1. C. 1–13.
15. Arlock P., Mow T., Sjöberg T., Arner A., Steen S., Laursen M. Ion currents of cardiomyocytes in different regions of the Göttingen minipig heart // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2017. T. 86. C. 12–18.
16. Asahi M., Sugita Y., Kurzydowski K., Leon S. De, Tada M., Toyoshima C., MacLennan D. H. Sarcolipin regulates sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) by binding to transmembrane helices alone or in association with phospholamban // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003. T. 100. № 9. C. 5040–5045.
17. Badr A., Hassinen M., El-Sayed M. F., Vornanen M. Effects of seasonal acclimatization on action potentials and sarcolemmal K<sup>+</sup> currents in roach (*Rutilus rutilus*) cardiac myocytes // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2017. T. 205. C. 15–27.
18. Badr A., Korajoki H., Abu-Amra E. S., El-Sayed M. F., Vornanen M. Effects of seasonal acclimatization on thermal tolerance of inward currents in roach (*Rutilus rutilus*) cardiac myocytes // *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 2018. T. 188. № 2. C. 255–269.
19. Bal N. C., Periasamy M. Uncoupling of sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase pump activity by sarcolipin as the basis for muscle non-shivering thermogenesis // *Philos. Trans. R. Soc. B.* 2020. T. 375. № 1793.
20. Barbot T., Montigny C., Decottignies P., Maire M. le, Jaxel C., Jamin N., Beswick V. Functional and Structural Insights into Sarcolipin, a Regulator of the Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases // *Regulation of Ca<sup>2+</sup>-ATPases, V-ATPases and F-ATPases / под ред. S. Chakraborti, N. S. Dhalla. : Springer, Cham, 2016. C. 153–186.*
21. Barhanin J., Lesage F., Guillemare E., Fink M., Lazdunski M., Romey G. K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current // *Nature.* 1996. T. 384. № 6604. C. 78–80.
22. Barnard R. J., Corre K., Cho H. Effect of training on the resting heart rate of rats // *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 1976. T. 35. № 4. C. 285–289.

23. Bassil G., Haburcak M., Takemoto Y., Slough D., Karas R., Jalife J., Lin Y., Noujaim S. Structural and molecular bases for the constitutive activity of IKACH in chronic atrial fibrillation // *Hear. Rhythm*. 2014. T. 11. № 11. C. 2131.
24. Baudinette R. V., Seymour R. S., Orbach J. Cardiovascular Responses to Exercise in the Brush-tailed Possum // *J. Comp. Physiol. - B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 1978. T. 124. C. 143–147.
25. Bech C., Nomoto S. Cardiovascular changes associated with treadmill running in the Pekin duck // *J. Exp. Biol.* 1982. T. 97. № 1. C. 345–358.
26. Beckmann C., Rinne A., Littwitz C., Mintert E., Bosche L. I., Kienitz M.-C., Pott L., Bender K. G Protein-Activated (GIRK) Current in Rat Ventricular Myocytes is Masked by Constitutive Inward Rectifier Current (IK1) // *Cell. Physiol. Biochem.* 2008. T. 21. № 4. C. 259–268.
27. Ben-Hamo M., McCue M. D., McWilliams S. R., Pinshow B. Dietary fatty acid composition influences tissue lipid profiles and regulation of body temperature in Japanese quail // *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 2011. T. 181. № 6. C. 807–816.
28. Bennett A. F. A comparison of activities of metabolic enzymes in lizards and rats // *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.* 1972. T. 42. № 4. C. 637–647.
29. Bennett A., Ruben J. Endothermy and activity in vertebrates // *Science (80-. )*. 1979. T. 206. № 4419. C. 649–654.
30. Bernhard W., Gebert A., Vieten G., Rau G. A., Hohlfeld J. M., Postle A. D., Freihorst J. Pulmonary surfactant in birds: coping with surface tension in a tubular lung // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2001. T. 281. № 1. C. R327–R337.
31. Bers D. M. Ca influx and sarcoplasmic reticulum Ca release in cardiac muscle activation during postrest recovery // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 1985. T. 17. № 3. C. H366–H381.
32. Bers D. M. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. Maywood, IL, USA: Kluwer Academic Press, 2001. Вып. 2nd.
33. Bers D. M., Bridge J. H. B. Relaxation of rabbit ventricular muscle by Na-Ca exchange and sarcoplasmic reticulum calcium pump. Ryanodine and voltage sensitivity // *Circ. Res.* 1989. T. 65. № 2. C. 334–342.
34. Bettex D. A., Pretre R., Chassot P.-G. Is our heart a well-designed pump? The heart along animal evolution // *Eur. Heart J.* 2014. T. 35. № 34. C. 2322–2332.
35. Biewener A. A., Corning W. R., Tobalske B. W. In vivo pectoralis muscle force-length behavior during level flight in pigeons (*Columba livia*) // *J. Exp. Biol.* 1998. T. 201. № 24. C. 3293–3307.

36. Bishop C., Butler P. Physiological modelling of oxygen consumption in birds during flight // *J. Exp. Biol.* 1995. T. 198. № 10. C. 2153–2163.
37. Bishop C. M. Heart mass and the maximum cardiac output of birds and mammals: implications for estimating the maximum aerobic power input of flying animals // *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* 1997. T. 352. № 1352. C. 447–456.
38. Bishop C. M. The maximum oxygen consumption and aerobic scope of birds and mammals: getting to the heart of the matter // *Proc. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* 1999. T. 266. № 1435. C. 2275–2281.
39. Bishop C. M., Butler P. J. Flight // *Sturkie's Avian Physiology* / под ред. C. G. Scanes. : Academic Press, 2015. Вып. 6. C. 919–974.
40. Bogdanov K. Y., Ziman B. D., Spurgeon H. A., Lakatta E. G. L- and T-type Calcium Currents Differ in Finch and Rat Ventricular Cardiomyocytes // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1995. T. 27. C. 2581–2593.
41. Bogusch G. Investigations on the fine structure of purkinje fibres in the atrium of the avian heart // *Cell Tissue Res.* 1974. T. 150. № 1. C. 43–56.
42. Bolter C. P., Atkinson K. J. Maximum heart rate responses to exercise and isoproterenol in the trained rat // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 1988. T. 254. № 5. C. R834–R839.
43. Bootman M. D., Higazi D. R., Coombes S., Roderick H. L. Calcium signalling during excitation-contraction coupling in mammalian atrial myocytes // *J. Cell Sci.* 2006. T. 119. № 19. C. 3915–3925.
44. Bossen E. H., Sommer J. R., Waugh R. A. Comparative stereology of the mouse and finch left ventricle // *Tissue Cell.* 1978. T. 10. № 4. C. 773–784.
45. Bouchard R. A., Clark R. B., Giles W. R. Effects of Action Potential Duration on Excitation-Contraction Coupling in Rat Ventricular Myocytes // *Circ. Res.* 1995. T. 76. № 5. C. 790–801.
46. Boukens B. J. D., Kristensen D. L., Filogonio R., Carreira L. B. T., Sartori M. R., Abe A. S., Currie S., Joyce W., Conner J., Opthof T., Crossley D. A., Wang T., Jensen B. The electrocardiogram of vertebrates: Evolutionary changes from ectothermy to endothermy // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2019. T. 144. C. 16–29.
47. Brackenbury J. H., el-Sayed M. S. Comparison of running energetics in male and female domestic fowl // *J. Exp. Biol.* 1985. T. 117. № 1. C. 349–355.
48. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. T. 72. № 1–2. C. 248–

254.

49. Brand M. D., Couture P., Else P. L., Withers K. W., Hulbert A. J. Evolution of energy metabolism. Proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria is greater in a mammal than in a reptile // *Biochem. J.* 1991. T. 275. № 1. C. 81–86.
50. Brotto M., Creazzo T. L. Ca<sup>2+</sup> transients in embryonic chick heart: Contributions from Ca<sup>2+</sup> channels and the sarcoplasmic reticulum // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 1996. T. 270. № 2. C. H518–H525.
51. Brückner R., Fenner A., Meyer W., Nobis T. M., Schmitz W., Scholz H. Cardiac effects of adenosine and adenosine analogs in guinea-pig atrial and ventricular preparations: evidence against a role of cyclic AMP and cyclic GMP. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1985. T. 234. № 3. C. 766–774.
52. Brush A. H. Avian Heart Size and Cardiovascular Performance // *Auk*. 1966. T. 83. № 2. C. 266–273.
53. Bundle M. W., Hoppeler H., Vock R., Tester J. M., Weyand P. G. High metabolic rates in running birds // *Nature*. 1999. T. 397. C. 31–32.
54. Burggren W., Farrell A., Lillywhite H. Vertebrate Cardiovascular Systems // *Compr. Physiol.* 1997. C. 215–308.
55. Burggren W., Farrell A., Lillywhite H. Vertebrate Cardiovascular Systems // *Comprehensive Physiology*. : John Wiley & Sons, Inc., 2011. C. 215–308.
56. Burt D. W., Bruley C., Dunn I. C., Jones C. T., Ramage A., Law A. S., Morrice D. R., Paton I. R., Smith J., Windsor D., Sazanov A., Fries R., Waddington D. The dynamics of chromosome evolution in birds and mammals // *Nature*. 1999. T. 402. № 6760. C. 411–413.
57. Butler P. J. Exercise in Birds // *J. Exp. Biol.* 1991. T. 160. № 1. C. 233–262.
58. Butler P. J. The physiological basis of bird flight // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2016. T. 371. № 1704.
59. Butler P. J., West N. H., Jones D. R. Respiratory and Cardiovascular Responses of the Pigeon to Sustained, Level Flight in a Wind-Tunnel // *J. Exp. Biol.* 1977. T. 71. № 1. C. 7–26.
60. Butler P. J., Woakes A. J. Heart Rate, Respiratory Frequency and Wing Beat Frequency of Free Flying Barnacle Geese *Branta Leucopsis* // *J. Exp. Biol.* 1980. T. 85. № 1. C. 213–226.
61. Butler P. J., Woakes A. J., Bishop C. M. Behaviour and Physiology of Svalbard Barnacle Geese *Branta leucopsis* during Their Autumn Migration // *J. Avian Biol.* 1998. T. 29. № 4. C. 536.

62. Calder W. A., Dawson T. J. Resting metabolic rates of ratite birds: The kiwis and the emu // *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 1978. T. 60. № 4. C. 479–481.
63. Cannon B., Nedergaard J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance // *Physiol. Rev.* 2004. T. 84. № 1. C. 277–359.
64. Carlsson L., Chartier D., Nattel S. Characterization of the In Vivo and In Vitro Electrophysiological Effects of the Novel Antiarrhythmic Agent AZD7009 in Atrial and Ventricular Tissue of the Dog // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2006. T. 47. № 1. C. 123–132.
65. Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: From channels to arrhythmias // *Physiol. Rev.* 1999. T. 79. № 3. C. 917–1017.
66. Carrier D. R. The evolution of locomotor stamina in tetrapods: circumventing a mechanical constraint // *Paleobiology.* 1987. T. 13. № 3. C. 326–341.
67. Casavant R. H., Colbert C. M., Dryer S. E. A-Current Expression is Regulated by Activity but not by Target Tissues in Developing Lumbar Motoneurons of the Chick Embryo // *J. Neurophysiol.* 2004. T. 92. № 5. C. 2644–2651.
68. Cavero I. Native and cloned ion channels from human heart: laboratory models for evaluating the cardiac safety of new drugs // *Eur. Hear. J. Suppl.* 2001. T. 3. № K. C. K53–K63.
69. Chai P., Dudley R. Limits to flight energetics of hummingbirds hovering in hypodense and hypoxic gas mixtures. // *J. Exp. Biol.* 1996. T. 199. № 10. C. 2285–2295.
70. Chatterjee S. *The rise of birds: 225 million years of evolution.* : JHU Press, 2015.
71. Chen K. H., Xu X. H., Sun H. Y., Du X. L., Liu H., Yang L., Xiao G. S., Wang Y., Jin M. W., Li G. R. Distinctive property and pharmacology of voltage-gated sodium current in rat atrial vs ventricular myocytes // *Hear. Rhythm.* 2016. T. 13. № 3. C. 762–770.
72. Cho H.-S., Takano M., Noma A. The Electrophysiological Properties of Spontaneously Beating Pacemaker Cells Isolated from Mouse Sinoatrial Node // *J. Physiol.* 2003. T. 550. № 1. C. 169–180.
73. Chopra A., Kutys M. L., Zhang K., Polacheck W. J., Sheng C. C., Luu R. J., Eyckmans J., Hinson J. T., Seidman J. G., Seidman C. E., Chen C. S. Force Generation via  $\beta$ -Cardiac Myosin, Titin, and  $\alpha$ -Actinin Drives Cardiac Sarcomere Assembly from Cell-Matrix Adhesions // *Dev. Cell.* 2018. T. 44. № 1. C. 87–96.
74. Cinar A., Bagci C., Belge F., Uzun M. The electrocardiogram of the Pekin duck // *Avian Dis.* 1996. T. 40. № 4. C. 919–923.
75. Clarke A., Pörtner H.-O. Temperature, metabolic power and the evolution of endothermy // *Biol.*

Rev. 2010. T. 85. № 4. C. 703–727.

76. Clarke A., Rothery P. Scaling of body temperature in mammals and birds // *Funct. Ecol.* 2008. T. 22. № 1. C. 58–67.

77. Clozel J.-P., Ertel E. A., Ertel S. I. Voltage-Gated T-Type Ca<sup>2+</sup> Channels and Heart Failure // *Proc. Assoc. Am. Physicians.* 1999. T. 111. № 5. C. 429–437.

78. Cogger E. A., Otis R. E., Ringer R. K. Heart rates in restrained and freely-moving Japanese quail via radio telemetry. // *Poult. Sci.* 1974. T. 53. № 1. C. 430–431.

79. Cook A. C., Tran V.-H., Spicer D. E., Rob J. M. H., Sridharan S., Taylor A., Anderson R. H., Jensen B. Sequential segmental analysis of the crocodilian heart // *J. Anat.* 2017. T. 231. № 4. C. 484–499.

80. Creazzo T. L., Burch J., Godt R. E. Calcium Buffering and Excitation-Contraction Coupling in Developing Avian Myocardium // *Biophys. J.* 2004. T. 86. № 2. C. 966–977.

81. Crompton A. W., Taylor C. R., Jagger J. A. Evolution of homeothermy in mammals // *Nat.* 1978. T. 272. № 5651. C. 333–336.

82. Cros C., Sallé L., Warren D. E., Shiels H. A., Brette F. The calcium stored in the sarcoplasmic reticulum acts as a safety mechanism in rainbow trout heart // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2014. T. 307. № 12. C. R1493–R1501.

83. Cui Y., Wilson C., Turner S., Graham S., McMahon N., Heath B. Possible role of the ultra-rapid delayed rectifier potassium current (I<sub>Kur</sub>) in action potential repolarisation in rabbit heart // *Heart.* 2011. T. 97. C. e2.

84. Cyr N. E., Dickens M. J., Romero L. M. Heart Rate and Heart-Rate Variability Responses to Acute and Chronic Stress in a Wild-Caught Passerine Bird // *Physiol. Biochem. Zool.* 2009. T. 82. № 4. C. 332–344.

85. D'Souza A., Bucchi A., Johnsen A. B., Logantha S. J. R. J., Monfredi O., Yanni J., Prehar S., Hart G., Cartwright E., Wisloff U., Dobryznski H., DiFrancesco D., Morris G. M., Boyett M. R. Exercise training reduces resting heart rate via downregulation of the funny channel HCN4 // *Nat. Commun.* 2014. T. 5. № 1. C. 1–12.

86. Daan S., Masman D., Groenewold A. Avian basal metabolic rates: their association with body composition and energy expenditure in nature // <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1990.259.2.R333>. 1990. T. 259. № 2. C. R333–R340.

87. Dangman K. H., Danilo P., Hordof A. ., Mary-Rabine L., Reder R. F., Rosen M. R.

- Electrophysiologic Characteristics of Human Ventricular and Purkinje Fibers // *Circulation*. 1982. T. 65. № 2. C. 362–368.
88. Davies F. The Conducting System of the Bird's Heart. // *J. Anat.* 1930. T. 64. № Pt 2. C. 129-146.7.
89. Davies F., Francis E. T. B. The conducting system of the vertebrate heart // *Biol. Rev.* 1946. T. 21. № 4. C. 173–188.
90. Delbridge L. M. D., Bassani J. W. M., Bers D. M. Steady-state twitch Ca<sup>2+</sup> fluxes and cytosolic Ca<sup>2+</sup> buffering in rabbit ventricular myocytes // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 1996. T. 270. № 1. C. C192–C199.
91. Deschênes I., Tomaselli G. F. Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits // *FEBS Lett.* 2002. T. 528. № 1–3. C. 183–188.
92. Dixon J. E., Shi W., Wang H.-S., McDonald C., Yu H., Wymore R. S., Cohen I. S., McKinnon D. Role of the Kv4.3 K<sup>+</sup> Channel in Ventricular Muscle // *Circ. Res.* 1996. T. 79. № 4. C. 659–668.
93. Dixon J. E., McKinnon D. Quantitative analysis of potassium channel mRNA expression in atrial and ventricular muscle of rats. // *Circ. Res.* 1994. T. 75. № 2. C. 252–260.
94. Dobrev D., Graf E., Wettwer E., Himmel H. M., Hála O., Doerfel C., Christ T., Schüler S., Ravens U. Molecular basis of downregulation of G-protein -coupled inward rectifying k<sup>+</sup> current (ik,ach) in chronic human atrial fibrillation decrease in GIRK4 mrna correlates with reduced IK,ACh and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials // *Circulation*. 2001. T. 104. № 21. C. 2551–2557.
95. Dobrzynski H., Marples D. D. R., Musa H., Yamanushi T. T., Henderson Z., Takagishi Y., Honjo H., Kodama I., Boyett M. R. Distribution of the muscarinic K<sup>+</sup> channel proteins Kir3.1 and Kir3.4 in the Ventricle, atrium, and sinoatrial node of heart // *J. Histochem. Cytochem.* 2001. T. 49. № 10. C. 1221–1234.
96. Dodgson J. B. Avian genomics // *Sturkie's Avian Physiology / под ред. G. Scanes. : Academic Press, 2015. Вып. 6. C. 3–13.*
97. Durfee W. K. Cardiovascular reflex mechanisms in the fowl // 1964.
98. Dzialowski E., Crossley D. The cardiovascular system // *Sturkie's Avian Physiology / под ред. C. G. Scanes. San Diego: Academic Press, 2015. Вып. 6. C. 199–201.*
99. Ehrlich J. R. Inward Rectifier Potassium Currents as a Target for Atrial Fibrillation Therapy // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2008. T. 52. № 2. C. 129–135.

100. Einthoven W. G., Fahr G., Waart A. De. Über die Richtung und die manifeste Grösse der Potentialschwankungen im menschlichen Herzen und über den Einfluss der Herzlage auf die Form des Elektrokardiogramms // Pflüger's Arch. für die gesamte Physiol. des Menschen und der Tiere. 1913. T. 150. № 6. C. 275–315.
101. Ellerby D. J., Henry H. T., Carr J. A., Buchanan C. I., Marsh R. L. Blood flow in guinea fowl *Numida meleagris* as an indicator of energy expenditure by individual muscles during walking and running // J. Physiol. 2005. T. 564. № 2. C. 631–648.
102. Ellington C. P. Limitations on Animal Flight Performance // J. Exp. Biol. 1991. T. 160. № 1. C. 71–91.
103. Else P. L., Hulbert A. J. An allometric comparison of the mitochondria of mammalian and reptilian tissues: the implications for the evolution of endothermy // J. Comp. Physiol. B. 1985. T. 156. № 1. C. 3–11.
104. Emre Y., Hurtaud C., Ricquier D., Bouillaud F., Hughes J., Criscuolo F. Avian UCP: The Killjoy in the Evolution of the Mitochondrial Uncoupling Proteins // J. Mol. Evol. 2007 654. 2007. T. 65. № 4. C. 392–402.
105. Estacion M., Choi J. S., Eastman E. M., Lin Z., Li Y., Tyrrell L., Yang Y., Dib-Hajj S. D., Waxman S. G. Can robots patch-clamp as well as humans? Characterization of a novel sodium channel mutation // J. Physiol. 2010. T. 588. № 11. C. 1915–1927.
106. Evans D. L., Rose R. J. Cardiovascular and respiratory responses in Thoroughbred horses during treadmill exercise // J. Exp. Biol. 1988. T. 134. № 1. C. 397–408.
107. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum // Am. J. Physiol. - Cell Physiol. 1983. T. 14. № 1.
108. Fabiato A. Effects of ryanodine in skinned cardiac cells // Fed. Proc. 1985. T. 44. № 15. C. 2970–2976.
109. Feige B. D. An electrophysiological and histological study of the SA valve in the avian heart // 1993.
110. Fick A. Über die Messung des Blutquantums in den Herzventrikeln // Sitz. Phys. Med. Ges. 1870. T. 2. C. 16–17.
111. Filatova T. S., Abramochkin D. V., Shiels H. A. Thermal acclimation and seasonal acclimatization: A comparative study of cardiac response to prolonged temperature change in shorthorn sculpin // J. Exp. Biol. 2019a. T. 222. № 16.



112. Filatova T. S. T. S., Abramochkin D. V. D. V., Shiels H. A. H. A. Thermal acclimation and seasonal acclimatization: A comparative study of cardiac response to prolonged temperature change in shorthorn sculpin // *J. Exp. Biol.* 2019b. T. 222. № 16.
113. Fingl E., Woodbury L. A., Hecht H. H. Effects of innervation and drugs upon direct membrane potentials of embryonic chick myocardium // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1952. T. 104. № 1. C. 103–114.
114. Forbes M. S., Mock O. B., Niel E. E. Van. Ultrastructure of the myocardium of the least shrew, *Cryptotis parva* say // *Anat. Rec.* 1990. T. 226. № 1. C. 57–70.
115. Fregly M. J., Simpson C. F., Palmore W. P. Some  $\beta$ -Adrenergic Responses to Administration of d,l-Isoproterenol to Turkeys1: // *Exp. Biol. Med.* 1976. T. 152. № 3. C. 348–353.
116. Fujii S., Ayer R. K., DeHaan R. L. Development of the fast sodium current in early embryonic chick heart cells // *J. Membr. Biol.* 1988 1011. 1988. T. 101. № 1. C. 209–223.
117. Gaborit N., Bouter S. Le, Szuts V., Varro A., Escande D., Nattel S., Demolombe S. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart // *J. Physiol.* 2007. T. 582. № 2. C. 675–693.
118. Galli G. L. J., Lipnick M. S., Shiels H. A., Block B. A. Temperature effects on  $\text{Ca}^{2+}$  cycling in scombrid cardiomyocytes: A phylogenetic comparison // *J. Exp. Biol.* 2011. T. 214. № 7. C. 1068–1076.
119. Galli G. L. J., Lipnick M. S., Block B. A. Effect of thermal acclimation on action potentials and sarcolemmal  $\text{K}^{+}$  channels from Pacific bluefin tuna cardiomyocytes // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2009. T. 297. C. R502–R509.
120. Galli G. L. J., Taylor E. W., Shiels H. A. Calcium flux in turtle ventricular myocytes // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2006. T. 291. № 6. C. R1781–R1789.
121. Galli G. L. J., Warren D. E., Shiels H. A.  $\text{Ca}^{2+}$  cycling in cardiomyocytes from a high-performance reptile, the varanid lizard (*Varanus exanthematicus*) // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2009. T. 297. № 6. C. R1636–R1644.
122. Gauthier J., Padian K. Phylogenetic, functional and aerodynamic analyses of the origin of birds and their flight // *The Beginnings of Birds* / под ред. М. К. Hecht и др. Eichstatt: Freunde des Jura-Museums, 1985. C. 185–197.
123. Gelband H., Bush H. L., Rosen M. R., Myeburg R. J., Hoffman B. F. Electrophysiologic Properties of Isolated Preparations of Human Atrial Myocardium // *Circ. Res.* 1972. T. 30. C. 293–

300.

124. Giles W., Nakajima T., Ono K., Shibata E. F. Modulation of the delayed rectifier K<sup>+</sup> current by isoprenaline in bull-frog atrial myocytes. // *J. Physiol.* 1989. T. 415. № 1. C. 233–249.

125. Giles W. R., Imaizumi Y. Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. // *J. Physiol.* 1988. T. 405. № 1. C. 123–145.

126. Ginsburg K. S., Weber C. R., Bers D. M. Control of maximum sarcoplasmic reticulum Ca load in intact ferret ventricular myocytes: Effects of thapsigargin and isoproterenol // *J. Gen. Physiol.* 1998. T. 111. № 4. C. 491–504.

127. Gogelein H., Bruggemann A., Gerlach U., Brendel J., Busch A. E. Inhibition of I(K<sub>s</sub>) channels by HMR 1556 // *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 2000. T. 362. № 6. C. 480–488.

128. Gold M. R., Strichartz G. R. Use-dependent block of atrial sodium current by ethylisopropylamiloride. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1991. T. 17. № 5. C. 792–799.

129. Goldberg J. M., Bolnick D. A. Electrocardiograms from the chicken, emu, red-tailed hawk and Chilean tinamou // *Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol.* 1980. T. 67. № 1. C. 15–19.

130. Gourdie R. G., Green C. R., Severs N. J., Anderson R. H., Thompson R. P. Evidence for a distinct gap-junctional phenotype in ventricular conduction tissues of the developing and mature avian heart // *Circ. Res.* 1993. T. 72. № 2. C. 278–289.

131. Grant A. O. Cardiac Ion Channels // *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.* 2009. T. 2. № 2. C. 185–194.

132. Greenspan K., Edmands R. E., Fisch C. Effects of cycle-length alteration on canine cardiac action potentials. // *Am. J. Physiol.* 1967. T. 212. № 6. C. 1416–1420.

133. Gregory T. R. The bigger the C-value, the larger the cell: Genome size and red blood cell size in vertebrates // *Blood Cells, Mol. Dis.* 2001. T. 27. № 5. C. 830–843.

134. Gregory T. R., Andrews C. B., McGuire J. A., Witt C. C. The smallest avian genomes are found in hummingbirds // *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2009. T. 276. № 1674. C. 3753–3757.

135. Grubb B., Jorgensen D. D., Conner M. Cardiovascular changes in the exercising emu // *J. Exp. Biol.* 1983. T. 104. № 1. C. 193–201.

136. Grubb B. R. Cardiac output and stroke volume in exercising ducks and pigeons // *J. Appl. Physiol.* 1982. T. 53. № 1. C. 207–211.

137. Grubb B. R. Allometric relations of cardiovascular function in birds // *Am. J. Physiol. - Hear.*

Circ. Physiol. 1983. T. 14. № 4.

138. Guo W., Li H., London B., Nerbonne J. M. Functional consequences of elimination of I(to, f) and I(to, s) early afterdepolarizations, atrioventricular block, and ventricular arrhythmias in mice lacking Kv1.4 and Expressing a dominant-negative Kv4  $\alpha$  subunit // Circ. Res. 2000. T. 87. № 1. C. 73–79.

139. Gussak I., Chaitman B. R., Kopecky S. L., Nerbonne J. M. Rapid ventricular repolarization in rodents: Electrocardiographic manifestations, molecular mechanisms, and clinical insights // J. Electrocardiol. 2000. T. 33. № 2. C. 159–170.

140. Gwathmey J. K., Kim C. S., Hajjar R. J., Khan F., DiSalvo T. G., Matsumori A., Bristow M. R. Cellular and molecular remodeling in a heart failure model treated with the  $\beta$ -blocker carteolol // Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol. 1999. T. 276. № 5. C. H1678–H1690.

141. Han S., Schiefer A., Isenberg G. Ca<sup>2+</sup> load of guinea-pig ventricular myocytes determines efficacy of brief Ca<sup>2+</sup> currents as trigger for Ca<sup>2+</sup> release. // J. Physiol. 1994. T. 480. № 3. C. 411–421.

142. Han W., Bao W., Wang Z., Nattel S. Comparison of Ion-Channel Subunit Expression in Canine Cardiac Purkinje Fibers and Ventricular Muscle // Circ. Res. 2002. T. 91. № 9. C. 790–797.

143. Han W., Wang Z., Nattel S. Slow delayed rectifier current and repolarization in canine cardiac Purkinje cells // Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol. 2001. T. 280. № 3 49-3.

144. Hartman F. A. Heart Weight in Birds // Condor. 1955. T. 57. № 4. C. 221–238.

145. Hassinen M., Laulaja S., Paajanen V., Haverinen J., Vornanen M. Thermal adaptation of the crucian carp (*Carassius carassius*) cardiac delayed rectifier current, IKs, by homomeric assembly of Kv7.1 subunits without MinK // Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol. 2011. T. 301. № 1. C. R255–R265.

146. Hassinen M., Haverinen J., Hardy M. E., Shiels H. A., Vornanen M. Inward rectifier potassium current (I<sub>K1</sub>) and Kir2 composition of the zebrafish (*Danio rerio*) heart // Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. 2015. T. 467. № 12. C. 2437–2446.

147. Hassinen M., Abramochkin D. V., Vornanen M. Seasonal acclimatization of the cardiac action potential in the Arctic navaga cod (*Eleginus navaga*, Gadidae) // J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol. 2014. T. 184. № 3. C. 319–327.

148. Hassinen M., Haverinen J., Vornanen M. Molecular basis and drug sensitivity of the delayed rectifier (IKr) in the fish heart // Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol. 2015. T. 176–

177. C. 44–51.

149. Hatano S., Yamashita T., Sekiguchi A., Iwasaki Y., Nakazawa K., Sagara K., Iinuma H., Aizawa T., Fu L.-T. Molecular and Electrophysiological Differences in the L-Type Ca<sup>2+</sup> Channel of the Atrium and Ventricle of Rat Hearts // *Circ. J.* 2006. T. 70. № 5. C. 610–614.

150. Haverinen J., Egginton S., Vornanen M. Electrical excitation of the heart in a basal vertebrate, the european river lamprey (*Lampetra fluviatilis*) // *Physiol. Biochem. Zool.* 2014. T. 87. № 6. C. 817–828.

151. Haverinen J., Vornanen M. Responses of Action Potential and K<sup>+</sup> Currents to Temperature Acclimation in Fish Hearts: Phylogeny or Thermal Preferences? // *Physiol. Biochem. Zool.* 2009a. T. 82. № 5. C. 468–482.

152. Haverinen J., Vornanen M. Comparison of sarcoplasmic reticulum calcium content in atrial and ventricular myocytes of three fish species // *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2009b. T. 297. № 4.

153. Haworth T. E., Haverinen J., Shiels H. A., Vornanen M. Electrical excitability of the heart in a Chondrostei fish, the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2014. T. 307. № 9. C. R1157–R1166.

154. Heilmann G. *The Origin Of Birds*. New York: Appleton, 1926.

155. Heron M. National Vital Statistics Reports Volume 68, Number 6, June 24, 2019, Deaths: Leading Causes for 2017. , 2019.

156. Herve J. C., Yamaoka K., Twist V. W., Powell T., Ellory J. C., Wang L. C. H. Temperature dependence of electrophysiological properties of guinea pig and ground squirrel myocytes // *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1992. T. 263. C. R177–R184.

157. Hicks J. W., Wang T. *The Functional Significance of the Reptilian Heart: New Insights into an Old Question* // *Ontogeny and Phylogeny of the Vertebrate Heart* / под ред. D. Sedmera, T. Wang. : Springer New York, 2012. C. 207–227.

158. Hill J. R., Goldberg J. M. P-wave morphology and atrial activation in the domestic fowl // *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1980. T. 239. № 5. C. R483–R488.

159. Hirakow R. Ultrastructural characteristics of the mammalian and sauropsidan heart // *Am. J. Cardiol.* 1970. T. 25. № 2. C. 195–203.

160. Holmes E. B. *Manual of comparative anatomy: a laboratory guide and brief text*. New York: MacMillan, 1975.

161. Holt J., Rhode E., Kines H. Ventricular volumes and body weight in mammals // *Am. J. Physiol.* 1968. T. 215. № 3. C. 704–715.
162. Hou J. W., Li W., Fei Y. D., Chen Y. H., Wang Q., Wang Y. P., Li Y. G. ICaL and Ito mediate rate-dependent repolarization in rabbit atrial myocytes // *J. Physiol. Biochem.* 2018. T. 74. № 1. C. 57–67.
163. Hove-Madsen L., Llach A., Tort L. The function of the sarcoplasmic reticulum is not inhibited by low temperatures in trout atrial myocytes // *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2001.
164. Hughes A. L., Hughes M. K. Small genomes for better flyers // *Nature.* 1995. T. 377. № 6548. C. 391.
165. Hulbert A. J. The evolution of energy metabolism in mammals // *Comparative physiology: Primitive mammals* / под ред. K. Schmidt-Nielsen, L. Bolis, C. L. Taylor. : Cambridge University Press, 1980. C. 129.
166. Hulbert A. J., Else P. L. Evolution of mammalian endothermic metabolism: mitochondrial activity and cell composition // <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1989.256.1.R63>. 1989. T. 256. № 1. C. R63–R69.
167. Inoue D., Hachisu M., Pappano A. J. Acetylcholine Increases Resting Membrane Potassium Conductance in Atrial but Not in Ventricular Muscle during Muscarinic Inhibition of Ca<sup>++</sup>-Dependent Action Potentials in Chick Heart // *Circ. Res.* 1983. T. 53. № 2. C. 158–167.
168. Iribe G., Jin H., Kaihara K., Naruse K. Effects of axial stretch on sarcolemmal BKCa channels in post-hatch chick ventricular myocytes // *Exp. Physiol.* 2010. T. 95. № 6. C. 699–711.
169. Jackson C. A. W., Kingston D. J., Hemsley L. A. A total mortality survey of nine batches of broiler chickens // *Aust. Vet. J.* 1972. T. 48. № 9. C. 481–487.
170. Janse M. J., Opthof T., Kléber A. G. Animal models of cardiac arrhythmias // *Cardiovasc. Res.* 1998. T. 39. № 1. C. 165–177.
171. Jensen B., Boukens B. J. D., Postma A. V., Gunst Q. D., Hoff M. J. B. van den, Moorman A. F. M., Wang T., Christoffels V. M. Identifying the Evolutionary Building Blocks of the Cardiac Conduction System // *PLoS One.* 2012. T. 7. № 9. C. e44231.
172. Jensen B., Wang T., Christoffels V. M., Moorman A. F. M. Evolution and development of the building plan of the vertebrate heart // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* 2013a. T. 1833. № 4. C. 783–794.
173. Jensen B., Berg G. van den, Doel R. van den, Oostra R. J., Wang T., Moorman A. F. M.

- Development of the Hearts of Lizards and Snakes and Perspectives to Cardiac Evolution // PLoS One. 2013b. T. 8. № 6. C. e63651.
174. Jensen B., Boukens B., Wang T., Moorman A., Christoffels V. Evolution of the Sinus Venosus from Fish to Human // *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 2014. T. 1. № 1. C. 14–28.
175. Jensen B., Boukens B. J., Crossley D. A., Conner J., Mohan R. A., Duijvenboden K. van, Postma A. V., Gloschat C. R., Elsey R. M., Sedmera D., Efimov I. R., Christoffels V. M. Specialized impulse conduction pathway in the alligator heart // *Elife*. 2018. T. 7. C. e32120.
176. Jerng H. H., Pfaffinger P. J., Covarrubias M. Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels // *Mol. Cell. Neurosci.* 2004. T. 27. № 4. C. 343–369.
177. Johansen K. Regional Distribution of Circulating Blood During Submersion Asphyxia in the Duck // *Acta Physiol. Scand.* 1964. T. 62. № 1–2. C. 1–9.
178. Jones D. R., Bryan Jr R. M., West N. H., Lord R. H., Clark B. Regional distribution of blood flow during diving in the duck (*Anas platyrhynchos*) // *Can. J. Zool.* 1979. T. 57. № 5. C. 995–1002.
179. Jones D. R., Johansen K. The blood vascular system of birds // *Avian biology*, vol. 2 / под ред. D. S. Farner, J. E. King. New York: Academic Press, 1972. C. 157–285.
180. Jones J. H., Longworth K. E., Lindholm A., Conley K. E., Karas R. H., Kayar S. R., Taylor C. R. Oxygen transport during exercise in large mammals. I. Adaptive variation in oxygen demand // *J. Appl. Physiol.* 1989. T. 67. № 2. C. 862–870.
181. Josephson I. R., Sperelakis N. Tetrodotoxin differentially blocks peak and steady-state sodium channel currents in early embryonic chick ventricular myocytes // *Pflügers Arch.* 1989. T. 414. № 3. C. 354–359.
182. Jost N., Virág L., Bitay M., Takács J., Lengyel C., Biliczki P., Nagy Z., Bogáts G., Lathrop D. A., Papp J. G., Varró A. Restricting excessive cardiac action potential and QT prolongation: A vital role for IKs in human ventricular muscle // *Circulation*. 2005. T. 112. № 10. C. 1392–1399.
183. Jost N., Papp J. G., Varró A. Slow Delayed Rectifier Potassium Current (IKs ) and the Repolarization Reserve // *Ann. Noninvasive Electrocardiol.* 2007. T. 12. № 1. C. 64–78.
184. Julian R. J. Are we growing them too fast. Ascites in meat-type chickens // *Highlights Agric. Res. Ontario*. 1987. T. 10. № 2. C. 27–30.
185. Julian R. J. Rapid growth problems: ascites and skeletal deformities in broilers // *Poult. Sci.* 1998. T. 77. C. 1773–1780.
186. Junker J., Sommer J. R., Meissner G. Extended Junctional Sarcoplasmic Reticulum of Avian

- Cardiac Muscle Contains Functional Ryanodine Receptors // 1994. T. 269. № 3. C. 1627–1634.
187. Kaprielian R., Wickenden A. D., Kassiri Z., Parker T. G., Liu P. P., Backx P. H. Relationship between  $K^+$  channel down-regulation and  $[Ca^{2+}]_i$  in rat ventricular myocytes following myocardial infarction // *J. Physiol.* 1999. T. 517. № 1. C. 229–245.
188. Kawano S., DeHaan R. L. Developmental changes in the calcium currents in embryonic chick ventricular myocytes // *J. Membr. Biol.* 1991. T. 120. № 1. C. 17–28.
189. Kemp T. S. Haemothermia or Archosauria? The interrelationships of mammals, birds and crocodiles // *Zool. J. Linn. Soc.* 1988. T. 92. № 1. C. 67–104.
190. Kharin S. N. Depolarisation and repolarisation sequences of ventricular epicardium in chickens (*Gallus gallus domesticus*) // *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 2004. T. 137. № 1. C. 237–244.
191. Kim C. S., Davidoff A. J., Maki T. M., Doye A. A., Gwathmey J. K. Intracellular calcium and the relationship to contractility in an avian model of heart failure // *J. Comp. Physiol. - B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 2000. T. 170. № 4. C. 295–306.
192. Kim Y., Yasuda M. The Cardiac Conducting System of the Fowl // *Anat. Histol. Embryol.* 1979. T. 8. № 2. C. 138–150.
193. Kisch B. The electrocardiogram of birds (chicken, duck, pigeon) // *Exp. Med. Surg.* 1951. T. 9. № 1. C. 103–124.
194. Kitchens S. A., Burch J., Creazzo T. L. T-type  $Ca^{2+}$  current contribution to  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release in developing myocardium // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2003. T. 35. № 5. C. 515–523.
195. Konopelski P., Ufnal M. Electrocardiography in rats: a comparison to human // *Physiol. Res.* 2016. T. 65. № 5. C. 717–725.
196. Kooyman G. L., Ponganis P. J. Emperor penguin oxygen consumption, heart rate and plasma lactate levels during graded swimming exercise. // *J. Exp. Biol.* 1994. T. 195. № 1. C. 199–209.
197. Koteja P. Energy assimilation, parental care and the evolution of endothermy // *Proc. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* 2000. T. 267. № 1442. C. 479–484.
198. Kroneman J. G. H., Faber J. W., Schouten J. C. M., Wolschrijn C. F., Christoffels V. M., Jensen B. Comparative analysis of avian hearts provides little evidence for variation among species with acquired endothermy // *J. Morphol.* 2019. T. 280. № 3. C. 395–410.
199. Kuzmin V. S., Potekhina V. M., Odnoshivkina Y. G., Chelombitko M. A., Fedorov A. V., Averina O. A., Borodkov A. S., Shevtsova A. A., Lovat M. L., Petrov A. M. Proarrhythmic atrial

- ectopy associated with heart sympathetic innervation dysfunctions is specific for murine B6CBAF1 hybrid strain // *Life Sci.* 2021a. T. 266. C. 118887.
200. Kuzmin V. S., Ivanova A. D., Potekhina V. M., Samoiloa D. V., Ushenin K. S., Shvetsova A. A., Petrov A. M. The susceptibility of the rat pulmonary and caval vein myocardium to the catecholamine-induced ectopy changes oppositely in postnatal development // *J. Physiol.* 2021b. T. 599. № 11. C. 2803–2821.
201. Lacroix D., Gluais P., Marquié C., D’Hoinne C., Adamantidis M., Bastide M. Repolarization abnormalities and their arrhythmogenic consequences in porcine tachycardia-induced cardiomyopathy // *Cardiovasc. Res.* 2002. T. 54. № 1. C. 42–50.
202. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. T. 227. № 5259. C. 680–685.
203. Lasiewski R. C., Dawson W. R. A Re-Examination of the Relation between Standard Metabolic Rate and Body Weight in Birds // *Condor.* 1967. T. 69. № 1. C. 13–23.
204. Lehmkuhl D., Sperelakis N. Transmembrane potentials of trypsin-dispersed chick heart cells cultured in vitro // *Am. J. Physiol.* 1963. T. 205. № 6. C. 1213–1220.
205. Lengyel C., Jost N., Virág L., Varró A., Lathrop D. A., Papp J. G. Pharmacological block of the slow component of the outward delayed rectifier current ( I<sub>Ks</sub> ) fails to lengthen rabbit ventricular muscle QT<sub>c</sub> and action potential duration // *Br. J. Pharmacol.* 2001. T. 132. № 1. C. 101–110.
206. Lengyel C., Varró A., Tábori K., Papp J. G., Baczkó I. Combined pharmacological block of I<sub>Kr</sub> and I<sub>Ks</sub> increases short-term QT interval variability and provokes torsades de pointes // *Br. J. Pharmacol.* 2009. T. 151. № 7. C. 941–951.
207. Lewis T. The spread of the excitatory process in the vertebrate heart. The bird’s heart. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1916. T. 207. C. 298–311.
208. Li G.-R., Feng J., Yue L., Carrier M., Nattel S. Evidence for Two Components of Delayed Rectifier K<sup>+</sup> Current in Human Ventricular Myocytes // *Circ. Res.* 1996a. T. 78. № 4. C. 689–696.
209. Li G.-R., Feng J., Wang Z., Fermini B., Nattel S. Adrenergic Modulation of Ultrarapid Delayed Rectifier K<sup>+</sup> Current in Human Atrial Myocytes // *Circ. Res.* 1996b. T. 78. № 5. C. 903–915.
210. Li G.-R., Lau C.-P., Shrier A. Heterogeneity of Sodium Current in Atrial vs Epicardial Ventricular Myocytes of Adult Guinea Pig Hearts // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2002. T. 34. № 9. C. 1185–1194.
211. Li G. R., Du X. L., Siow Y. L., Karmin O., Tse H. F., Lau C. P. Calcium-activated transient



- outward chloride current and phase 1 repolarization of swine ventricular action potential // *Cardiovasc. Res.* 2003. T. 58. № 1. C. 89–98.
212. Liang B., Nissen J. D., Laursen M., Wang X., Skibsbye L., Hearing M. C., Andersen M. N., Rasmussen H. B., Wickman K., Grunnet M., Olesen S.-P., Jespersen T. G-protein-coupled inward rectifier potassium current contributes to ventricular repolarization // *Cardiovasc. Res.* 2014. T. 101. № 1. C. 175–184.
213. Lieberman M., Paes De Carvalho A. The electrophysiological organization of the embryonic chick heart // *J. Gen. Physiol.* 1965. T. 49. № 2. C. 351–363.
214. Lillywhite H. B., Zippel K. C., Farrell A. P. Resting and maximal heart rates in ectothermic vertebrates // *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 1999. T. 124. № 4. C. 369–382.
215. Lippi G., Plebani M. Biomarker research and leading causes of death worldwide: A rather feeble relationship // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013. T. 51. № 9. C. 1691–1693.
216. Litovsky S. H., Antzelevitch C. Rate dependence of action potential duration and refractoriness in canine ventricular endocardium differs from that of epicardium: Role of the transient outward current // *J. Am. Coll. Cardiol.* 1989. T. 14. № 4. C. 1053–1066.
217. Liu C. Bin, Li R. De. Electrocardiogram and heart rate in response to temperature acclimation in three representative vertebrates // *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 2005. T. 142. № 4. C. 416–421.
218. Lomax A. E., Rose R. A., Giles W. R. Electrophysiological evidence for a gradient of G protein-gated K<sup>+</sup> current in adult mouse atria // *Br. J. Pharmacol.* 2003. T. 140. № 3. C. 576–584.
219. Lombard E. A. Electrocardiograms of Small Mammals // *Am. J. Physiol.* 1952. T. 171. № 1. C. 189–193.
220. Loughrey C. M., Smith G. L., MacEachern K. E. Comparison of Ca<sup>2+</sup> release and uptake characteristics of the sarcoplasmic reticulum in isolated horse and rabbit cardiomyocytes // *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 2004. T. 287. № 3. C. H1149–H1159.
221. Lu Y., James T. N., Bootsma M., Terasaki F. Histological organization of the right and left atrioventricular valves of the chicken heart and their relationship to the atrioventricular purkinje ring and the middle bundle branch // *Anat. Rec.* 1993a. T. 235. № 1. C. 74–86.
222. Lu Y., James T. N., Yamamoto S., Terasaki F. Cardiac conduction system in the chicken: Gross anatomy plus light and electron microscopy // *Anat. Rec.* 1993b. T. 236. № 3. C. 493–510.
223. Lu Z., Kamiya K., Ophhof T., Yasui K., Kodama I. Density and Kinetics of  $I_{Kr}$  and  $I_{Ks}$  in Guinea

- Pig and Rabbit Ventricular Myocytes Explain Different Efficacy of  $I_{Ks}$  Blockade at High Heart Rate in Guinea Pig and Rabbit // *Circulation*. 2001. T. 104. № 8. C. 951–956.
224. Ludders J. W. Respiration in birds // *Duke's Physiology of Domestic Animals* / под ред. W. O. Reece. : John Wiley & Sons Inc., 2015. Вып. 13. C. 245–258.
225. Mackenzie L., Roderick H. L., Berridge M. J., Conway S. J., Bootman M. D. The spatial pattern of atrial cardiomyocyte calcium signalling modulates contraction // *J. Cell Sci*. 2004. T. 117. № 26. C. 6327–6337.
226. Magistretti J., Alonso A. Biophysical properties and slow voltage-dependent inactivation of a sustained sodium current in entorhinal cortex layer-II principal neurons: a whole-cell and single-channel study // *J. Gen. Physiol*. 1999. T. 114. № 4. C. 491–509.
227. Magnan A. Les caractéristiques des oiseaux suivant le mode de vol: leur application à la construction des avions // *Ann. Sci. Nat. Dixième Série*. 1922. T. 5. C. 125–334.
228. Magwood S. E., Bray D. F. Disease condition of turkey poults characterized by enlarged and rounded hearts. // *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci*. 1962. T. 26. № 11. C. 268–72.
229. Maina J. N., King A. S., Settle G. An allometric study of pulmonary morphometric parameters in birds, with mammalian comparisons. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci*. 1989. T. 326. № 1231. C. 1–57.
230. Makwana O., Ahles L., Lencinas A., Ornella, Selmin I., Runyan R. B. Low-Dose Trichloroethylene Alters Cytochrome P450-2C Subfamily Expression in the Developing Chick Heart // *Env. Heal. Perspect*. 2000. T. 108. C. 177–200.
231. Maltsev V. A., Undrovinas A. I. Relationship between steady-state activation and availability of cardiac sodium channel: evidence of uncoupling // *Cell. Mol. Life Sci. C*. 1998 542. 1998. T. 54. № 2. C. 148–151.
232. Manderfield L. J., George A. L. KCNE4 can co-associate with the IKs (KCNQ1–KCNE1) channel complex // *FEBS J*. 2008. T. 275. № 6. C. 1336–1349.
233. Mangold E. Elektrographischel Untersuchungen del Erregungsverlaufes im Vogelherzen // *Arch. Ges. Physiol*. 1919. T. 175. C. 327–354.
234. Marden J. H. From damselflies to pterosaurs: How burst and sustainable flight performance scale with size // *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol*. 1994. T. 266. № 4 35-4.
235. Marionneau C., Couette B., Liu J., Li H., Mangoni M. E., Nargeot J., Lei M., Escande D., Demolombe S. Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity

in the mouse heart // *J. Physiol.* 2005. T. 562. № 1. C. 223–234.

236. Masumiya H., Saitoh T., Tanaka Y., Horie S., Aimi N., Takayama H., Tanaka H., Shigenobu K. Effects of hirsutine and dihydrocorynantheine on the action potentials of sino-atrial node, atrium and ventricle // *Life Sci.* 1999. T. 65. № 22. C. 2333–2341.

237. Mathur R., Shrivastava A. Cardiac conducting system of *Gallus domesticus* with special reference to the atrial bundles // *Acta Morphol. Neerl. Scand.* 1979. T. 17. № 3. C. 181–189.

238. Maurya S. K., Bal N. C., Sopariwala D. H., Pant M., Rowland L. A., Shaikh S. A., Periasamy M. Sarcolipin Is a Key Determinant of the Basal Metabolic Rate, and Its Overexpression Enhances Energy Expenditure and Resistance against Diet-induced Obesity // *J. Biol. Chem.* 2015. T. 290. № 17. C. 10840–10849.

239. McKechnie A. E., Lovegrove B. G. Avian Facultative Hypothermic Responses: A Review // *Condor.* 2002. T. 104. № 4. C. 705–724.

240. McKenzie B. E., Will J. A., Hardie A. The electrocardiogram of the turkey. // *Avian Dis.* 1971. T. 15. № 4. C. 737–744.

241. Mewes T., Ravens U. L-type Calcium Currents of Human Myocytes from Ventricle of Non-failing and Failing Hearts and from Atrium // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1994. T. 26. № 10. C. 1307–1320.

242. Mezentseva N. V, Kumaratilake J. S., Newman S. A. The brown adipocyte differentiation pathway in birds: An evolutionary road not taken // *BMC Biol.* 2008 61. 2008. T. 6. № 1. C. 1–13.

243. Miller J. P., Wallace A. G., Feezor M. D. A quantitative comparison of the relation between the shape of the action potential and the pattern of stimulation in canine ventricular muscle and Purkinje fibers // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1971. T. 2. № 1. C. 3–19.

244. Molcan L., Vesela A., Zeman M. Influences of phase delay shifts of light and food restriction on blood pressure and heart rate in telemetry monitored rats // *Biol. Rhythm Res.* 2016. T. 47. № 2. C. 233–246.

245. Momose Y., Giles W., Szabo G. Acetylcholine-Induced K<sup>+</sup> Current in Amphibian Atrial Cells // *Biophys. J.* 1984. T. 45. № 1. C. 20–22.

246. Montigny C., Decottignies P., Maréchal P. Le, Capy P., Bublitz M., Olesen C., Møller J. V., Nissen P., Maire M. le. S-Palmitoylation and S-Oleoylation of Rabbit and Pig Sarcolipin // *J. Biol. Chem.* 2014. T. 289. № 49. C. 33850–33861.

247. Moore E. N. Experimental electrophysiological studies on avian hearts // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1965. T. 127. № 1. C. 127–144.

248. Moorman A. F. M., Christoffels V. M. Cardiac chamber formation: Development, genes, and evolution // *Physiol. Rev.* 2003. T. 83. № 4. C. 1223–1267.
249. Mow T., Arlock P., Laursen M., Ganderup N.-C. Major ion currents except Ito are present in the ventricle of the Göttingen minipig heart // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2008. T. 58. № 2. C. 165.
250. Murakami N., Kawano T., Nakahara K., Nasu T., Shiota K. Effect of melatonin on circadian rhythm, locomotor activity and body temperature in the intact house sparrow, Japanese quail and owl // *Brain Res.* 2001. T. 889. № 1–2. C. 220–224.
251. Murakami T., Saito I., Mochizuki K. The atrioventricular conducting system of the avian heart. // *Japanese J. Vet. Sci.* 1985. T. 47. № 1. C. 73–79.
252. Näbauer M., Beuckelmann D. J., Überfuhr P., Steinbeck G. Regional Differences in Current Density and Rate-Dependent Properties of the Transient Outward Current in Subepicardial and Subendocardial Myocytes of Human Left Ventricle // *Circulation.* 1996. T. 93. № 1. C. 168–177.
253. Naganobu K., Hagio M. Dose-related Cardiovascular Effects of Isoflurane in Chickens during Controlled Ventilation. // *J. Vet. Med. Sci.* 2000. T. 62. № 4. C. 435–437.
254. Nain S., Ling B., Alcorn J., Wojnarowicz C. M., Laarveld B., Olkowski A. A. Biochemical factors limiting myocardial energy in a chicken genotype selected for rapid growth // *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 2008. T. 149. № 1. C. 36–43.
255. Nakamura T. Y., Coetzee W. A. Functional and pharmacological characterization of a Shal-related K<sup>+</sup> channel subunit in Zebrafish // *BMC Physiol.* 2008. T. 8. № 1. C. 2.
256. Nattel S., Maguy A., Bouter S. Le, Yeh Y. H. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: Heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation // *Physiol. Rev.* 2007. T. 87. № 2. C. 425–456.
257. Negretti N., Varro A., Eisner D. A. Estimate of net calcium fluxes and sarcoplasmic reticulum calcium content during systole in rat ventricular myocytes. // *J. Physiol.* 1995. T. 486. № 3. C. 581–591.
258. Nemtsas P., Wettwer E., Christ T., Weidinger G., Ravens U. Adult zebrafish heart as a model for human heart? An electrophysiological study // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010. T. 48. № 1. C. 161–171.
259. Nerbonne J. M. Regulation of voltage-gated K<sup>+</sup> channel expression in the developing mammalian myocardium // *J. Neurobiol.* 1998. T. 37. № 1. C. 37–59.
260. Nerbonne J. M. Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the

mammalian myocardium // *J. Physiol.* 2000. T. 525. № 2. C. 285–298.

261. Nespolo R. F., González-Lagos C., Solano-Iguaran J. J., Elfwing M., Garitano-Zavala A., Mañosa S., Alonso J. C., Altimiras J. Aerobic power and flight capacity in birds: a phylogenetic test of the heart-size hypothesis // *J. Exp. Biol.* 2018. T. 221. № 1.

262. Newman S. A. Thermogenesis, muscle hyperplasia, and the origin of birds // *BioEssays.* 2011. T. 33. № 9. C. 653–656.

263. Nouchi H., Kiryu N., Kimata M., Tsuneoka Y., Hamaguchi S., Namekata I., Takahara A., Shigenobu K., Tanaka H. Developmental Changes in Action Potential Prolongation by K<sup>+</sup>-Channel Blockers in Chick Myocardium // *J. Pharmacol. Sci.* 2011. T. 115. № 2. C. 235–238.

264. O'Hara T., Rudy Y. Quantitative comparison of cardiac ventricular myocyte electrophysiology and response to drugs in human and nonhuman species // *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 2012. T. 302. № 5. C. H1023–H1030.

265. O'Sullivan C. A., Henein M. Y., Sutton R., Coats A. J. S., Sutton G. C., Gibson D. G. Abnormal ventricular activation and repolarisation during dobutamine stress echocardiography in coronary artery disease // *Heart.* 1998. T. 79. № 5. C. 468–473.

266. Oelkrug R., Polymeropoulos E. T., Jastroch M. Brown adipose tissue: physiological function and evolutionary significance // *J. Comp. Physiol. B* 2015 1856. 2015. T. 185. № 6. C. 587–606.

267. Offerhaus J. A., Snelderwaard P. C., Algül S., Faber J. W., Riebel K., Jensen B., Boukens B. J. High heart rate associated early repolarization causes J-waves in both zebra finch and mouse // *Physiol. Rep.* 2021. T. 9. № 5. C. e14775.

268. Ohler A., Amos G. J., Wettwer E., Ravens U. Frequency-dependent effects of E-4031, almokalant, dofetilide and tedisamil on action potential duration: no evidence for «reverse use dependent» block // *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 1994. T. 349. № 6. C. 602–610.

269. Organ C. L., Shedlock A. M. Palaeogenomics of pterosaurs and the evolution of small genome size in flying vertebrates // *Biol. Lett.* 2009. T. 5. № 1. C. 47–50.

270. Østnes J. E., Jenssen B. M., Bech C., Nettleship D. Growth and Development of Homeothermy in Nestling European Shags (*Phalacrocorax Aristotelis*) // *Auk.* 2001. T. 118. № 4. C. 983–995.

271. Ostrom J. H. The origin of birds // *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 1975. T. 3. № 1. C. 55–77.

272. Oudit G. Y., Kassiri Z., Sah R., Ramirez R. J., Zobel C., Backx P. H. The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I<sub>to</sub>) in normal and diseased myocardium // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2001. T. 33. № 5. C. 851–872.

273. Pacher, Ungvari, Nanasi, Kecskemeti. Electrophysiological changes in rat ventricular and atrial myocardium at different stages of experimental diabetes // *Acta Physiol. Scand.* 1999. T. 166. № 1. C. 7–13.
274. Padian K., Chiappe L. M. The origin and early evolution of birds // *Biol. Rev.* 2007. T. 73. № 1. C. 1–42.
275. Panama B. K., McLerie M., Lopatin A. N. Heterogeneity of IK1 in the mouse heart // *Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol.* 2007. T. 293. № 6. C. H3558–H3567.
276. Pappano A. J. Action potentials in chick atria: increased susceptibility to blockade by tetrodotoxin during embryonic development // *Circ. Res.* 1972. T. 31. № 3. C. 379–388.
277. Pappano A. J. Action potentials in chick atria. Ontogenetic changes in the dependence of tetrodotoxin-resistant action potentials on calcium, strontium, barium. // *Circ. Res.* 1976. T. 39. № 1. C. 99–105.
278. Park S. J., Min S. H., Kang H. W., Lee J. H. Differential zinc permeation and blockade of L-type Ca<sup>2+</sup> channel isoforms Cav1.2 and Cav1.3 // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2015. T. 1848. № 10. C. 2092–2100.
279. Parto P. The structure of the atrioventricular node in the heart of the female laying ostrich (*Struthio camelus*) // *J. Vet. Med. Ser. C Anat. Histol. Embryol.* 2012. T. 41. № 1. C. 75–78.
280. Parto P., Tadjalli M., Ghazi S. R. Macroscopic and microscopic studies of sino-atrial node in the heart of ostrich (*Stuthio camelus*). // *World J. Zool.* 2010. T. 5. № 2. C. 90–95.
281. Patel S. P., Campbell D. L. Transient outward potassium current, ‘*I<sub>to</sub>*’, phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms // *J. Physiol.* 2005. T. 569. № 1. C. 7–39.
282. Pearson J. T. Development of Thermoregulation and Posthatching Growth in the Altricial Cockatiel *Nymphicus hollandicus* // *Physiol. Zool.* 2015. T. 71. № 2. C. 237–244.
283. Peer Y. Van De, Maere S., Meyer A. The evolutionary significance of ancient genome duplications // *Nat. Rev. Genet.* 2009. T. 10. № 10. C. 725–732.
284. Pennycuik C. J. Power Requirements for Horizontal Flight in the Pigeon *Columba Livia* // *J. Exp. Biol.* 1968. T. 49. № 3.
285. Perlini S., Giangregorio F., Coco M., Radaelli A., Solda P. L., Bernardi L., Ferrari A. U. Autonomic and ventilatory components of heart rate and blood pressure variability in freely behaving rats // *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 1995. T. 269. № 5. C. H1729–H1734.

286. Perni S., Iyer V. R., Franzini-Armstrong C. Ultrastructure of cardiac muscle in reptiles and birds: Optimizing and/or reducing the probability of transmission between calcium release units // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2012. T. 33. № 2. C. 145–152.
287. Piiper J., Scheid P. Maximum gas transfer efficacy of models for fish gills, avian lungs and mammalian lungs // *Respir. Physiol.* 1972. T. 14. № 1–2. C. 115–124.
288. Poss K. D. Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals // *Nat. Rev. Genet.* 2010. T. 11. № 10. C. 710–722.
289. Powell F. L. Respiration // *Sturkie's Avian Physiology* / под ред. C. G. Scanes. : Academic Press, 2015. Вып. 6. C. 301–336.
290. Prinzinger R., Preßmar A., Schleucher E. Body temperature in birds // *Comp. Biochem. Physiol.* -- Part A Physiol. 1991. T. 99. № 4. C. 499–506.
291. Prosheva V., Dernovoj B., Kharin S., Kaseva N., Shklyar T., Blyakhman F. Does the right muscular atrioventricular valve in the avian heart perform two functions? // *Comp. Biochem. Physiol.* -Part A Mol. Integr. Physiol. 2015. T. 184. C. 41–45.
292. Prosheva V. I., Kaseva N. N. Location and functional characterization of the right atrioventricular pacemaker ring in the adult avian heart // *J. Morphol.* 2016. T. 277. № 3. C. 363–369.
293. Prosheva V., Kaseva N., Dernovoj B. Morpho-functional characterization of the heart of *Gallus gallus domesticus* with special reference to the right muscular atrioventricular valve // *J. Anat.* 2019. T. 235. № 4. C. 794–802.
294. Prothero J. Heart weight as a function of body weight in mammals // *Growth.* 1979. T. 43. C. 139–150.
295. Pustovit K. B., Kuzmin V. S., Abramochkin D. V. Diadenosine tetra- and pentaphosphates affect contractility and bioelectrical activity in the rat heart via P2 purinergic receptors // *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 2016. T. 389. № 3. C. 303–313.
296. Pustovit K. B., Kuzmin V. S., Sukhova G. S. Effect of exogenous extracellular nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) on bioelectric activity of the pacemaker and conduction system of the heart // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015. T. 159. № 2. C. 188–191.
297. Qi A., Yeung-Lai-Wah J. A., Xiao J., Kerr C. R. Regional differences in rabbit atrial repolarization: Importance of transient outward current // *Am. J. Physiol.* - Hear. Circ. Physiol. 1994. T. 266. № 2. C. H643–H649.
298. Rajamani S., Anderson C. L., Valdivia C. R., Eckhardt L. L., Foell J. D., Robertson G. A., Kamp

- T. J., Makielski J. C., Anson B. D., January C. T. Specific serine proteases selectively damage KCNH2 (hERG1) potassium channels and  $I_{Kr}$  // *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 2006. T. 290. № 3. C. H1278–H1288.
299. Ravens U., Gath J., Maryam Al H., Himmel H. Mechanical restitution in atrial muscle from human and rat hearts: Effects of agents that modify sarcoplasmic reticulum function // *Pharmacol. Toxicol.* 1997. T. 81. № 2. C. 97–104.
300. Ravesloot J. H., Rombouts E. 2,4-dinitrophenol acutely inhibits rabbit atrial  $Ca^{2+}$ -sensitive  $Cl^-$  current (Ito2) // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2000. T. 78. № 10. C. 766–773.
301. Richards M. A., Clarke J. D., Saravanan P., Voigt N., Dobrev D., Eisner D. A., Trafford A. W., Dibb K. M. Transverse tubules are a common feature in large mammalian atrial myocytes including human // *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 2011. T. 301. № 5. C. H1996–H2005.
302. Roden D. M. Long QT syndrome: reduced repolarization reserve and the genetic link // *J. Intern. Med.* 2006. T. 259. № 1. C. 59–69.
303. Rosati B., Pan Z., Lypen S., Wang H.-S., Cohen I., Dixon J. E., McKinnon D. Regulation of *KChIP2* potassium channel  $\beta$  subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle // *J. Physiol.* 2001. T. 533. № 1. C. 119–125.
304. Rosati B., Grau F., Rodriguez S., Li H., Nerbonne J. M., McKinnon D. Concordant expression of *KChIP2* mRNA, protein and transient outward current throughout the canine ventricle // *J. Physiol.* 2003. T. 548. № 3. C. 815–822.
305. Ruben J. The Evolution of Endothermy in Mammals and Birds: From Physiology to Fossils // *Annu. Rev. Physiol.* 1995. T. 57. № 1. C. 69–95.
306. Sah R., Oudit G. Y., Nguyen T. T. T., Lim H. W., Wickenden A. D., Wilson G. J., Molkentin J. D., Backx P. H. Inhibition of calcineurin and sarcolemmal  $Ca^{2+}$  influx protects cardiac morphology and ventricular function in *Kv4.2N* transgenic mice // *Circulation.* 2002. T. 105. № 15. C. 1850–1856.
307. Sah R., Ramirez R. J., Backx P. H. Modulation of  $Ca^{2+}$  Release in Cardiac Myocytes by Changes in Repolarization Rate // *Circ. Res.* 2002. T. 90. № 2. C. 165–173.
308. Sanguinetti M. C., Jurkiewicz N. K., Scott A., Siegl P. K. S. Isoproterenol antagonizes prolongation of refractory period by the class III antiarrhythmic agent E-4031 in guinea pig myocytes. Mechanism of action // *Circ. Res.* 1991. T. 68. № 1. C. 77–84.
309. Sanguinetti M. C., Jurkiewicz N. K. Two components of cardiac delayed rectifier  $K^+$  current:



- Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents // *J. Gen. Physiol.* 1990. T. 96. № 1. C. 195–215.
310. Sapir N., Wikelski M., McCue M. D., Pinshow B., Nathan R. Flight Modes in Migrating European Bee-Eaters: Heart Rate May Indicate Low Metabolic Rate during Soaring and Gliding // *PLoS One.* 2010. T. 5. № 11. C. e13956.
311. Sarantopoulos C., McCallum J. B., Kwok W. M., Hogan Q.  $\beta$ -escin diminishes voltage-gated calcium current rundown in perforated patch-clamp recordings from rat primary afferent neurons // *J. Neurosci. Methods.* 2004. T. 139. № 1. C. 61–68.
312. Sasaki Y., Ishii K., Nunoki K., Yamagishi T., Taira N. The voltage-dependent  $K^+$  channel ( $Kv1.5$ ) cloned from rabbit heart and facilitation of inactivation of the delayed rectifier current by the rat  $\beta$  subunit // *FEBS Lett.* 1995. T. 372. № 1. C. 20–24.
313. Satoh H. A dual action of taurine on the delayed rectifier  $K^+$  current in embryonic chick cardiomyocytes // *Amino Acids.* 1995a. T. 9. C. 235–246.
314. Satoh H. Identification of and developmental changes in transient outward current in embryonic chick cardiomyocytes // *Reprod. Fertil. Dev.* 1995b. T. 7. № 5. C. 1369–1374.
315. Satoh H. Regulation by taurine of the spontaneous activity in young embryonic chick cardiomyocytes. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995c. T. 25. № 1. C. 3–8.
316. Satoh H. Taurine-induced hyperpolarizing shift of the reversal potential of the fast  $Na^+$  current in embryonic chick cardiomyocytes. // *Gen. Pharmacol.* 1995d. T. 26. № 3. C. 517–521.
317. Satoh H. Sino-Atrial Nodal Cells of Mammalian Hearts: Ionic Currents and Gene Expression of Pacemaker Ionic Channels // *J. Smooth Muscle Res.* 2003. T. 39. № 5. C. 175–193.
318. Sauviat M. P., Colas A., Pages N. Does lindane (gamma-hexachlorocyclohexane) increase the rapid delayed rectifier outward  $K^+$  current ( $IK_r$ ) in frog atrial myocytes? // *BMC Pharmacol.* 2002. T. 2. № 1. C. 15.
319. Scheid P. Avian respiratory system and gas exchange // *Hypoxia: the adaptations* / под ред. J. R. Sutton, G. Coates, J. E. Remmers. Toronto: B.C. Decker, Inc., 1990. C. 4–7.
320. Scheid P., Piiper J. Respiratory mechanics and air flow in birds // *Form and Function in Birds* / под ред. A. S. King, J. McLelland. London: Academic Press, 1989. C. 369–391.
321. Schmidt-Nielsen K. Respiration in air // *Animal physiology: adaptation and environment* / под ред. K. Schmidt-Nielsen. New York: Cambridge University Press, 1975. C. 27–79.
322. Scott G. R. Elevated performance: The unique physiology of birds that fly at high altitudes // *J.*

Exp. Biol. 2011. T. 214. № 15. C. 2455–2462.

323. Sedmera D., Pexieder T., Vuillemin M., Thompson R. P., Anderson R. H. Developmental patterning of the myocardium // *Anat. Rec.* 2000. T. 258. № 4. C. 319–337.

324. Sedmera D., Reckova M., Rosengarten C., Torres M. I., Gourdie R. G., Thompson R. P. Optical mapping of electrical activation in developing heart // *Microsc. Microanal.* 2005. T. 11. C. 209–215.

325. Sedmera D. Function and form in the developing cardiovascular system // *Cardiovasc. Res.* 2011. T. 91. № 2. C. 252–259.

326. Seeherman H. J., Richard Taylor C., Maloiy G. M. O., Armstrong R. B. Design of the mammalian respiratory system. II. Measuring maximum aerobic capacity // *Respir. Physiol.* 1981. T. 44. № 1. C. 11–23.

327. Seymour R. S., Blaylock A. The principle of Laplace and scaling of blood pressure and ventricular wall stress in mammals and birds // *Physiol Biochem Zool.* 2000. T. 73. C. 389–405.

328. Sham J. S. Ca<sup>2+</sup> release-induced inactivation of Ca<sup>2+</sup> current in rat ventricular myocytes: evidence for local Ca<sup>2+</sup> signalling. // *J. Physiol.* 1997. T. 500. № 2. C. 285–295.

329. Sharma D., Kafle R. C., Alurkar V. M. Pattern of Cardiovascular Disease among Admitted Patients in Tertiary Care Teaching Hospital // *J. Nepal Health Res. Counc.* 2020. T. 18. № 1. C. 93–98.

330. Sheard T. M. D., Kharche S. R., Pinali C., Shiels H. A. 3D ultrastructural organisation of calcium release units in the avian sarcoplasmic reticulum // 2019.

331. Shibata E. F., Drury T., Refsum H., Aldrete V., Giles W. Contributions of a transient outward current to repolarization in human atrium // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 1989. T. 257. № 6. C. H1773–H1781.

332. Shiels H. A., Blank J. M., Farrell A. P., Block B. A. Electrophysiological properties of the L-type Ca<sup>2+</sup> current in cardiomyocytes from bluefin tuna and Pacific mackerel // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2004. T. 286. № 4. C. R659–R668.

333. Shiels H. A., Galli G. L. J. The sarcoplasmic reticulum and the evolution of the vertebrate heart // *Physiology.* 2014. T. 29. № 6. C. 456–469.

334. Shiels H. A. H. A., Vornanen M., Farrell A. P. A. P. Temperature dependence of cardiac sarcoplasmic reticulum function in rainbow trout myocytes. // *J. Exp. Biol.* 2002. T. 205. C. 3631–3639.

335. Shiels H. A., Sitsapesan R. Is there something fishy about the regulation of the ryanodine

- receptor in the fish heart? // *Exp. Physiol.* 2015. T. 100. № 12. C. 1412–1420.
336. Shiels H. A., Vornanen M., Farrell A. P. Temperature-dependence of L-type Ca(2+) channel current in atrial myocytes from rainbow trout. // *J. Exp. Biol.* 2000. T. 203. C. 2771–2780.
337. Shiels H. A., White E. Temporal and spatial properties of cellular Ca<sup>2+</sup> flux in trout ventricular myocytes // *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2005. T. 288. № 6. C. R1756–R1766.
338. Shimoni Y., Banno H. Thyroxine effects on temperature dependence of ionic currents in single rabbit cardiac myocytes // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 1993. T. 265. C. H1875–H1883.
339. Sirsat S. K. G., Sirsat T. S., Crossley J. L., Sotherland P. R., Dzialowski E. M. The 12-day thermoregulatory metamorphosis of Red-winged Blackbirds (*Agelaius phoeniceus*) // *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 2016. T. 186. № 5. C. 651–663.
340. Skarsfeldt M. A., Bomholtz S. H., Lundegaard P. R., Lopez-Izquierdo A., Tristani-Firouzi M., Bentzen B. H. Atrium-specific ion channels in the zebrafish-A role of I<sub>KACH</sub> in atrial repolarization // *Acta Physiol.* 2018. T. 223. № 3. C. e13049.
341. Skinner M., Ceuppens P., White P., Prior H. Social-housing and use of double-decker cages in rat telemetry studies // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2019. T. 96. C. 87–94.
342. Smith F. M. Blood Pressure Regulation by Aortic Baroreceptors in Birds // *Physiol. Zool.* 1994. T. 67. № 6. C. 1402–1425.
343. Snelling E. P., Taggart D. A., Maloney S. K., Farrell A. P., Leigh C. M., Waterhouse L., Williams R., Seymour R. S. Scaling of left ventricle cardiomyocyte ultrastructure across development in the kangaroo *Macropus fuliginosus* // *J. Exp. Biol.* 2015. T. 218. № 11. C. 1767–1776.
344. Sommer J. R. Implications of structure and geometry on cardiac electrical activity // *Ann. Biomed. Eng.* 1983. T. 11. № 3–4. C. 149–157.
345. Sommer J. R., Bossen E., Dalen H., Dolber P., High T., Jewett P., Johnson E. A., Junker J., Leonard S., Nassar R., Scherer B., Spach M., Spray T., Taylor I., Wallace N. R., Waugh R. To excite a heart: A bird's view // *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 1991. T. 142. № 599. C. 5–21.
346. Sommer J. R., Jennings R. B. Ultrastructure of cardiac muscle // *Heart and Cardiovascular System, Scientific Foundations* / под ред. H. A. Fozzard и др. NY: Raven Press, 1986. C. 61–100.
347. Sommer J. R., Johnson E. A. Cardiac muscle // *Z. Zellforsch.* 1969. T. 98. C. 437–468.
348. Sorota S., Tsuji Y., Tajima T., Pappano A. J. Pertussis toxin treatment blocks hyperpolarization by muscarinic agonists in chick atrium. // *Circ. Res.* 1985. T. 57. № 5. C. 748–758.

349. Speakman J. R. Body size, energy metabolism and lifespan // *J. Exp. Biol.* 2005. T. 208. № 9. C. 1717–1730.
350. Spector W. S. *Handbook of biological data*. Philadelphia: Saunders, 1956. 584 c.
351. Sperelakis N., Shigenobu K. Changes in membrane properties of chick embryonic hearts during development // *J. Gen. Physiol.* 1972. T. 60. № 4. C. 430–453.
352. Splawski I., Shen J., Timothy K. W., Lehmann M. H., Priori S., Robinson J. L., Moss A. J., Schwartz P. J., Towbin J. A., Vincent G. M., Keating M. T. Spectrum of Mutations in Long-QT Syndrome Genes // *Circulation*. 2000. T. 102. № 10. C. 1178–1185.
353. Stecyk J. A. W., Paajanen V., Farrell A. P., Vornanen M. Effect of temperature and prolonged anoxia exposure on electrophysiological properties of the turtle (*Trachemys scripta*) heart // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2007. T. 293. № 1. C. R421–R437.
354. Stephenson A., Adams J. W., Vaccarezza M. The vertebrate heart: an evolutionary perspective // *J. Anat.* 2017. T. 231. № 6. C. 787–797.
355. Strunk A., Heather Wilson G. Avian cardiology // *Vet Clin Exot Anim.* 2003. T. 6. C. 1–28.
356. Sturkie P. D. The electrocardiogram of the chicken // *Am. J. Vet. Res.* 1949. T. 35. № 10. C. 168–175.
357. Sturkie P. D. Heart and circulation: anatomy, hemodynamics, blood pressure, blood flow // *Avian physiology* / под ред. P. D. Sturkie. Berlin: Springer, 1986. C. 130–166.
358. Suarez R. K., Lighton J. R., Brown G. S., Mathieu-Costello O. Mitochondrial respiration in hummingbird flight muscles // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991. T. 88. № 11. C. 4870–4873.
359. Suarez R. K. Hummingbird flight: Sustaining the highest mass-specific metabolic rates among vertebrates // *Exp.* 1992 486. 1992. T. 48. № 6. C. 565–570.
360. Sun X., Wang H.-S. Role of the transient outward current ( I<sub>to</sub> ) in shaping canine ventricular action potential - a dynamic clamp study // *J. Physiol.* 2005. T. 564. № 2. C. 411–419.
361. Svensson Holm A. C. B., Lindgren I., Österman H., Altimiras J. Thyroid hormone does not induce maturation of embryonic chicken cardiomyocytes in vitro // *Physiol. Rep.* 2014. T. 2. № 12. C. e12182.
362. Szabó E., Virág S., Challice C. E. The structure of the atrioventricular conducting system in the avian heart // *Anat. Rec.* 1986. T. 215. № 1. C. 1–9.
363. Szabuniewicz M., Hightower D., Kyzar J. R. The Electrocardiogram, Vectorcardiogram and

Spatiocardiogram in the Rabbit // *Can. J. Comp. Med.* 1971. T. 35. № 2. C. 107.

364. Szabuniewicz M., McCrady J. D. The Electrocardiogram of the Japanese (*Coturnix coturnix japonica*) and Bobwhite (*Colinus virginianus*) Quail // *Zentralblatt für Veterinärmedizin R. A.* 1974. T. 21. № 3. C. 198–207.

365. Tajali M., Ghazi S. R., Partou P. Gross anatomy of the heart in ostrich (*Struthio camelus*) // *Iran. J. Vet. Res.* 2009. T. 10. № 1. C. 21–27.

366. Tanaka H., Takagi N., Shigenobu K. Difference in excitation-contraction mechanisms between atrial and ventricular myocardia of hatched chicks // *Gen. Pharmacol.* 1995. T. 26. № 1. C. 45–49.

367. Taylor C. R., Karas R. H., Weibel E. R., Hoppeler H. Adaptive variation in the mammalian respiratory system in relation to energetic demand: II. Reaching the limits to oxygen flow // *Respir. Physiol.* 1987. T. 69. № 1. C. 7–26.

368. Thomas G., Gerlach U., Antzelevitch C. HMR 1556, A Potent and Selective Blocker of Slowly Activating Delayed Rectifier Potassium Current // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2003. T. 41. № 1. C. 140–147.

369. Torres C. R., Norell M. A., Clarke J. A. Estimating Flight Style of Early Eocene Stem Palaeognath Bird *Calciavis grande* (Lithornithidae) // *Anat. Rec.* 2020. T. 303. № 4. C. 1035–1042.

370. Toyomizu M., Ueda M., Sato S., Seki Y., Sato K., Akiba Y. Cold-induced mitochondrial uncoupling and expression of chicken UCP and ANT mRNA in chicken skeletal muscle // *FEBS Lett.* 2002. T. 529. № 2–3. C. 313–318.

371. Trautwein W., Kassebaum D. G., Nelson R. M., Hecht H. H. Electrophysiological Study of Human Heart Muscle // *Circ. Res.* 1962. T. 10. C. 306–312.

372. Truex R. C., Smythe M. Q. Comparative morphology of the cardiac conduction tissue in animals // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1965. T. 127. № 1. C. 19–33.

373. Tseng G. N., Hoffman B. F. Two components of transient outward current in canine ventricular myocytes. // *Circ. Res.* 1989. T. 64. № 4. C. 633–647.

374. Tsuji Y., Opthof T., Kamiya K., Yasui K., Liu W., Lu Z., Kodama I. Pacing-induced heart failure causes a reduction of delayed rectifier potassium currents along with decreases in calcium and transient outward currents in rabbit ventricle // *Cardiovasc. Res.* 2000. T. 48. № 2. C. 300–309.

375. Valance D., Després G., Richard S., Constantin P., Mignon-Grasteau S., Leman S., Boissy A., Faure J. M., Leterrier C. Changes in heart rate variability during a tonic immobility test in quail // *Physiol. Behav.* 2008. T. 93. № 3. C. 512–520.

376. Varro A., Negretti N., Hester S. B., Eisner D. A. An estimate of the calcium content of the sarcoplasmic reticulum in rat ventricular myocytes // *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 1993. T. 423. C. 158–160.
377. Varró A., Baláti B., Iost N., Takács J., Virág L., Lathrop D. A., Csaba L., Tálosi L., Papp J. G. The role of the delayed rectifier component IKs in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization // *J. Physiol.* 2000. T. 523. № 1. C. 67–81.
378. Varro A., Nanasi P. P., Lathrop D. A. Potassium currents in isolated human atrial and ventricular cardiocytes // *Acta Physiol. Scand.* 1993. T. 149. № 2. C. 133–142.
379. Venetucci L. A., Trafford A. W., Díaz M. E., O'Neill S. C., Eisner D. A. Reducing ryanodine receptor open probability as a means to abolish spontaneous Ca<sup>2+</sup> release and increase Ca<sup>2+</sup> transient amplitude in adult ventricular myocytes. // *Circ. Res.* 2006. T. 98. № 10. C. 1305.
380. Vicente-Steijn R., Passier R., Wisse L. J., Schaliij M. J., Poelmann R. E., Gittenberger-De Groot A. C., Jongbloed M. R. M. Funny current channel HCN4 delineates the developing cardiac conduction system in chicken heart // *Hear. Rhythm.* 2011. T. 8. № 8. C. 1254–1263.
381. Vicente P. C., Kim J. Y., Ha J.-J., Song M.-Y., Lee H.-K., Kim D.-H., Choi J.-S., Park K.-S. Identification and characterization of site-specific N-glycosylation in the potassium channel Kv3.1b // *J. Cell. Physiol.* 2018. T. 233. № 1. C. 549–558.
382. Vincent M., Michael G. The molecular genetics of the long QT syndrome: genes causing fainting and sudden death // *Annu. Rev. Med.* 1998. T. 49. № 1. C. 263–274.
383. Volk T., Nguyen T. H.-D., Schultz J.-H., Ehmke H. Relationship between transient outward K<sup>+</sup> current and Ca<sup>2+</sup> influx in rat cardiac myocytes of endo- and epicardial origin // *J. Physiol.* 1999. T. 519. № 3. C. 841–850.
384. Vornanen M. Sarcolemmal Ca influx through L-type Ca channels in ventricular myocytes of a teleost fish // *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1997. T. 272. № (5 Pt 2). C. R1432–R1440.
385. Vornanen M., Stevens E. D., Farrell A. P., Graham J. B. L-type Ca<sup>2+</sup> current in fish cardiac myocytes: effects of thermal acclimation and beta-adrenergic stimulation. // *J. Exp. Biol.* 1998. T. 201. № Pt 4. C. 533–547.
386. Vornanen M., Hassinen M. Zebrafish heart as a model for human cardiac electrophysiology // *Channels.* 2016. T. 10. № 2. C. 101–110.
387. Vornanen M., Hassinen M., Haverinen J. Tetrodotoxin Sensitivity of the Vertebrate Cardiac Na<sup>+</sup>

Current // *Mar. Drugs*. 2011. T. 9. № 11. C. 2409–2422.

388. Vornanen M., Ryökkönen A., Nurmi A. Temperature-dependent expression of sarcolemmal K<sup>+</sup> currents in rainbow trout atrial and ventricular myocytes // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2002. T. 282. № 4. C. R1191–R1199.

389. Wade O., Neely P. The heart and attached vessels of the opossum, a marsupial // *J. Mammal.* 1949. T. 30. № 2. C. 111–116.

390. Walden A. P., Dibb K. M., Trafford A. W. Differences in intracellular calcium homeostasis between atrial and ventricular myocytes // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2009. T. 46. № 4. C. 463–473.

391. Walker A. D. New light on the origin of birds and crocodiles // *Nature*. 1972. T. 237. № 5353. C. 257–263.

392. Walter I., Seebacher F. Endothermy in birds: underlying molecular mechanisms // *J. Exp. Biol.* 2009. T. 212. № 15. C. 2328–2336.

393. Wang J., Bruford M. W., Zhan X., Pan S., Wang J., Dixon A., He J., Muller M. G., Ni P., Hu L., Liu Y., Hou H., Chen Y., Xia J., Luo Q., Xu P., Chen Y., Liao S., Cao C., и др. Peregrine and saker falcon genome sequences provide insights into evolution of a predatory lifestyle // *Nat. Genet.* 2013. T. 45. № 5. C. 563–566.

394. Wang L., Duff H. J. Developmental changes in transient outward current in mouse ventricle // *Circ. Res.* 1997. T. 81. № 1. C. 120–127.

395. Wang Z., Fermini B., Nattel S. Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes // *Cardiovasc. Res.* 1994. T. 28. № 10. C. 1540–1546.

396. Ward C. A., Ma Z., Lee S. S., Giles W. R. Potassium currents in atrial and ventricular myocytes from a rat model of cirrhosis // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 1997. T. 273. № 2. C. G537–G544.

397. Ward S., Bishop C. M., Woakes A. J., Butler P. J. Heart rate and the rate of oxygen consumption of flying and walking barnacle geese (*Branta leucopsis*) and bar-headed geese (*Anser indicus*) // *J. Exp. Biol.* 2002. T. 205. № 21. C. 3347–3356.

398. Warren D. E., Galli G. L. J., Patrick S. M., Shiels H. A. The cellular force-frequency response in ventricular myocytes from the varanid lizard, *Varanus exanthematicus* // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2010a. T. 298. № 3. C. R567–R574.

399. Warren W. C., Clayton D. F., Ellegren H., Arnold A. P., Hillier L. W., Künstner A., Searle S., White S., Vilella A. J., Fairley S., Heger A., Kong L., Ponting C. P., Jarvis E. D., Mello C. V., Minx

- P., Lovell P., Velho T. A. F., Ferris M., и др. The genome of a songbird // *Nature*. 2010b. T. 464. № 7289. C. 757–762.
400. Weerapura M., Nattel S., Chartier D., Caballero R., Hébert T. E. A comparison of currents carried by HERG, with and without coexpression of MiRP1, and the native rapid delayed rectifier current. Is MiRP1 the missing link? // *J. Physiol.* 2002. T. 540. № 1. C. 15–27.
401. Wells D. J. Muscle performance in hovering hummingbirds // *J. Exp. Biol.* 1993. T. 178. № 1. C. 39–57.
402. Wentworth B., Cigan J., Schaaf T. Tolerance of Japanese quail embryos and young chicks to hypothermia // *Poult. Sci.* 2009. T. 88. № 5. C. 1040–1043.
403. West G. C. Shivering and Heat Production in Wild Birds // <https://doi.org/10.1086/physzool.38.2.30152817>. 2015. T. 38. № 2. C. 111–120.
404. West J. B. Comparative physiology of the pulmonary blood-gas barrier: The unique avian solution // *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2009. T. 297. № 6. C. R1625–R1634.
405. West N. H., Langille B. L., Jones D. R. Cardiovascular system // *Form and Function in Birds* / под ред. A. S. King, J. McLelland. New York: Academic Press, 1981. C. 235–339.
406. Wettwer E., Amos G., Gath J., Zerkowski H.-R., Reidemeister J.-C., Ravens U. Transient outward current in human and rat ventricular myocytes // *Cardiovasc. Res.* 1993. T. 27. № 9. C. 1662–1669.
407. Wilders R., Hoekstra M., Ginneken A. C. van, Verkerk A. O. Beta-adrenergic modulation of heart rate: Contribution of the slow delayed rectifier K<sup>+</sup> current (IKs) // *Computing in Cardiology*. Belfast: IEEE, 2010. C. 629–631.
408. Wilson W. O. A review of the physiology of Coturnix (Japanese quail) // *Worlds. Poult. Sci. J.* 1972. T. 28. № 4. C. 413–429.
409. Withers P. C. *Comparative Animal Physiology*. Philadelphia: Saunders College Pub., 1992. 949 c.
410. Woakes A. J., Butler P. J. Respiratory, Circulatory and Metabolic Adjustments during Swimming in the Tufted Duck, *Aythya Fuugula* // *J. Exp. Biol.* 1986. T. 120. № 1. C. 215–231.
411. Woods R. H. A few applications of a physical theorem to membranes in the human body in a state of tension // *Trans. R. Acad. Med. Irel.* 1892. T. 10. № 1. C. 417.
412. Wright N. A., Gregory T. R., Witt C. C. Metabolic ‘engines’ of flight drive genome size reduction in birds // *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2014.



413. Xu X., Best P. M. Postnatal changes in T-type calcium current density in rat atrial myocytes. // *J. Physiol.* 1992. T. 454. № 1. С. 657–672.
414. Yogeshpriya S., Selvaraj P., Ramkumar P. K., Veeraselvam M., Saravanan M., Venkatesan M., Jayalakshmi K. Review on Avian Electrocardiogram // *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2018. T. 7. № 8. С. 1389–1395.
415. Young I. E., Marlin D. J., Deaton C., Brown-Feltner H., Roberts C. A., Wood J. L. N. Heart size estimated by echocardiography correlates with maximal oxygen uptake // *Equine Vet. J.* 2002. T. 34. № S34. С. 467–471.
416. Yue L., Feng J., Li G. R., Nattel S. Characterization of an ultrarapid delayed rectifier potassium channel involved in canine atrial repolarization. // *J. Physiol.* 1996. T. 496. № 3. С. 647–662.
417. Yue X., Tomanek R. J. Stimulation of coronary vasculogenesis/angiogenesis by hypoxia in cultured embryonic hearts // *Dev. Dyn.* 1999. T. 216. № 1. С. 28–36.
418. Zankov D. P., Salloum F. N., Jiang M., Tseng G. N. Chronic in vivo angiotensin II administration differentially modulates the slow delayed rectifier channels in atrial and ventricular myocytes // *Hear. Rhythm.* 2019. T. 16. № 1. С. 108–116.
419. Zhang Q., Edwards S. V. The evolution of intron size in amniotes: A role for powered flight? // *Genome Biol. Evol.* 2012. T. 4. № 10. С. 1033–1043.
420. Абрамочкин Д. В. Изменение пейсмекерной активности синоатриального узла при действии монооксида углерода и сероводорода // *Доклады Академии наук.* 2013. Т. 453. № 4. С. 450–453.
421. Курочкин Е. Н. Параллельная эволюция тероподных динозавров и птиц // *Зоологический журнал.* 2006. Т. 85. № 3. С. 283–297.