

## РОЛЬ ФОСФОЛИПАЗЫ С В МОДУЛЯЦИИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕДСЕРДНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ РАЗВИВАЮЩИХСЯ КРЫС ПРИ СТИМУЛЯЦИИ $\alpha 1$ -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ

© 2024 г. Н. Мансур<sup>1,\*</sup>, А. Л. Зефирова<sup>2</sup>, Н. И. Зиятдинова<sup>1</sup>, Т. Л. Зефирова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>2</sup>Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

\*E-mail: nourm94@mail.ru

Поступила в редакцию 10.07.2024 г.

После доработки 25.09.2024 г.

Принята к публикации 14.10.2024 г.

Большинство существующих исследований сосредоточено на механизмах регуляции мембранного электрогенеза через  $\beta$ -адренорецепторы, в то время как электрофизиологические эффекты  $\alpha 1$ -адренорецепторов ( $\alpha 1$ -АР) остаются малоизученными. Участие фосфолипазы С (PLC) в этих эффектах остается неясным, и изучение неселективного агониста подтипов  $\alpha 1$ -АР метоксамина в присутствии ингибитора PLC (U-73122) может прояснить важность PLC в модуляции электрической активности кардиомиоцитов у крыс разных возрастов. Исследование проводилось на 7-, 21- и 100-дневных белых крысах с использованием микроэлектродной техники. Для анестезии использовали уретан, после чего проводили изоляцию сердца и готовили препарат миокарда предсердий с сохраненным синусовым узлом и спонтанной активностью. Затем регистрировали электрическую активность кардиомиоцитов. Применяли агонист  $\alpha 1$ -АР метоксамин и ингибитор PLC U-73122. Стимуляция  $\alpha 1$ -АР метоксамином в рабочих кардиомиоцитах правого предсердия крыс разного возраста приводила к увеличению частоты генерации потенциала действия. Метоксамин в концентрации  $10^{-8}$  М увеличивал длительность потенциала действия у 7-дневных крыс, тогда как у 21- и 100-дневных крыс наблюдалось его уменьшение. U-73122 полностью блокировал действие метоксамина во всех возрастных группах, что указывает на важную роль PLC в этих процессах. Результаты показывают, что возраст влияет на реакцию кардиомиоцитов на стимуляцию  $\alpha 1$ -АР, а PLC является ключевым элементом в механизмах, обеспечивающих эти эффекты.

*Ключевые слова:* фосфолипаза С, метоксамин, U-73122, длительность потенциала действия, сердце, крыса

**DOI:** 10.31857/S0869813924120026, **EDN:** VGEGPQ

### ВВЕДЕНИЕ

Адренергические рецепторы впервые были представлены Ahlquist в 1948 г. [1] как различные типы рецепторов, которые активируются одними и теми же катехоламинами, но проявляют противоположные фенотипы в организме. Он определил их как подтипы  $\alpha$  и  $\beta$ . Антагонисты  $\alpha$ -рецепторов празозин и йохимбин были использованы для дальнейшей

подклассификации этих рецепторов как  $\alpha$ -1 и  $\alpha$ -2 [2].  $\alpha$ 1-Адренорецепторы ( $\alpha$ 1-АР) опосредуют многие важные функции во многих системах органов, включая сердечно-сосудистую, мочеполовую и центральную нервную систему. В сердечно-сосудистой системе все три подтипа  $\alpha$ 1-АР были обнаружены в кровеносных сосудах, и их активация в различной степени способствует вазоконстрикции [3]. Физиологическая активность сосудистых  $\alpha$ 1-АР имеет первостепенное значение для системной сердечно-сосудистой регуляции [4].

$\alpha$ 1-АР представляют собой семь GPCR трансмембранного домена, участвующих в многочисленных физиологических функциях, контролируемых эндогенными катехоламинами, норадреналином и адреналином, на которые нацелены лекарственные средства, полезные в терапии. Три отдельных гена, продукты которых названы  $\alpha$ 1A-АР,  $\alpha$ 1B-АР и  $\alpha$ 1D-АР, кодируют эти рецепторы. Несмотря на то, что существование множества  $\alpha$ 1-АР признано уже 30 лет, их специфические функции все еще в значительной степени неизвестны [5].

При активации агонистами, такими как норадреналин,  $\alpha$ 1-АР активируют несколько внутриклеточных сигнальных путей, опосредованных G-белками. Активация фосфолипазы C (PLC) гидролизует фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат ( $PIP_2$ ) для получения инозитол 1,4,5-трисфосфата ( $IP_3$ ) и диацилглицерола (DAG), который является путем PLC- $IP_3$  [6]. В сердце присутствует несколько изоформ PLC из семейств  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  и  $\epsilon$ . Активация PLC происходит через гептаспиральные рецепторы, связанные с G-белком (PLC $\beta$ ), рецепторные тирозинкиназы (PLC $\gamma$ ),  $PIP_2$  и  $Ca^{2+}$  (PLC $\delta$ ) или Ras (PLC $\epsilon$ ). Наибольший интерес для нас представляет PLC $\beta$ , так как его активация происходит через рецепторы, связанные с G-белками [7].

Активация PLC приводит к образованию двух продуктов –  $IP_3$  и DAG, которые играют важную роль в качестве вторичных мессенджеров в клетке.  $IP_3$ , будучи гидрофильным соединением, перемещается из сарколеммы в цитоплазму.

Активированный  $IP_3$ -рецептор на клеточном уровне способствует преобразованию электромеханического сопряжения посредством сенситизации рианодиновых рецепторов. В экспериментах на предсердных и желудочковых кардиомиоцитах было установлено, что активация  $IP_3$ -R способствует положительному инотропному эффекту. Это происходит за счет локального высвобождения  $Ca^{2+}$  через  $IP_3$  в непосредственной близости от рианодиновых рецепторов, способствуя кальций-зависимому высвобождению кальция. Активация  $IP_3$ -рецепторов может также иметь значение в развитии  $Ca^{2+}$  опосредованной аритмии [8, 9]. Повышенные уровни  $IP_3$ -R наблюдались не только у лабораторных крыс, но и у людей с аналогичными заболеваниями сердца [10]. Активация  $IP_3$ -R, расположенного непосредственно на ядерной мембране, может вызывать локальное увеличение ядерной концентрации  $Ca^{2+}$  [11], а также изменение активности различных факторов транскрипции и регуляции метаболических путей [12].

Основная функция DAG, образующегося при гидролизе  $PIP_2$ , – активация протеинкиназы C (PKC). В кардиомиоцитах новорожденных крыс обнаружено 6 изоформ PKC [13]. У взрослых крыс в миокарде остаются только 3 изоформы, а остальные изоформы PKC исчезают с возрастом [14]. Различные изоформы PKC имеют множество мишеней в миокарде. PKC также считается важным регулятором работы каналов тока  $IK_s$ .  $IK_s$  снижается в миоцитах мышей и крыс в ответ на активацию PKC. Другие калиевые токи, присутствующие в кардиомиоцитах, также находятся под влиянием PKC. Действие обменника Na/Ca усиливается при его фосфорилировании протеинкиназами. Кроме того, PKC действует на киназы  $\beta$ -адренергических рецепторов, мускариновые рецепторы, транскрипционные факторы и гены, а также на многие другие мишени [15, 16].

U-73122 представляет собой высокоселективный ингибитор PLC, обладающий хорошей проникаемостью через клеточную мембрану благодаря своим липофильным свойствам. U-73122 ингибировал гидролиз PI и синтез  $IP_3$  в разрушенных клеточных системах и уменьшал вызванное агонистами повышение уровня цитоплазматической концентрации  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_{цит}$ ) в интактных клетках, таких как нейтрофилы, клетки нейробластомы, ацинарные клетки и тромбоциты. Таким образом, U-73122 получил общее признание

как специфический ингибитор фосфоинозитид-специфической фосфолипазы С (PI-PLC), а ингибирование повышения  $[Ca^{2+}]_i$  в интактных клетках с помощью U-73122 было интерпретировано как свидетельство вклада PI-PLC в ответ, включая гладкие мышцы [17].

Недавние исследования на крысах показали, что стимуляция  $\alpha 1$ -АР неселективным агонистом подтипов  $\alpha 1$ -АР метоксамином снижает скорость сокращения изолированного сердца взрослой крысы. Выраженность эффекта зависит от концентрации агониста. Внутривенное введение метоксамина также приводит к сердечной брадикардии во всем организме [18]. У новорожденных крыс стимуляция  $\alpha 1$ -АР, независимо от концентрации метоксамина, приводила к отрицательной инотропной реакции миокарда предсердий и желудочков [19]. Активация  $\alpha 1$ -АР метоксамином также влияет на параметры электрической активности рабочих кардиомиоцитов крыс с сохраненными синусовыми узлами. У 7-дневных крыс агонист  $\alpha 1$ -АР метоксамин увеличивал длительность фазы реполяризации потенциала действия как в навязанном, так и в собственном ритме [20]. Однако метоксамин оказывал двоякое влияние на длительность реполяризации рабочих кардиомиоцитов у 20-недельных крыс. При навязанном ритме метоксамин увеличивал длительность фазы реполяризации потенциала действия, при собственном ритме – уменьшал. [21]. В отличие от взрослой крысы, адренергическая регуляция в сердце новорожденной крысы имеет незрелую симпатическую иннервацию. 21-дневный возраст характеризуется началом формирования адренергической иннервации сердца крыс и самой большой частотой сердечных сокращений. В связи с вышесказанным, особый интерес представляют исследования на животных разного возраста [22].

Целью нашего исследования было выявить участие PLC в реализации эффектов, вызванных избирательной стимуляцией  $\alpha 1$ -АР на электрическую активность кардиомиоцитов у крыс разного возраста.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на 7-дневных (новорожденных) ( $n = 20$ ), 21-дневных ( $n = 20$ ) и 100-дневных (взрослых) ( $n = 17$ ) белых крысах с использованием микроэлектродной техники. Эти возрастные группы были выбраны в соответствии с уровнем развития вегетативной регуляции сердца. Крысы содержались в клетках со свободным доступом к воде и пище. Для анестезии внутрибрюшинно вводили 25%-ный раствор уретана из расчета 1.2 г/кг массы тела животного. После инъекции уретана вскрывали грудную клетку, затем вырезали сердце и переносили его в чашку Петри. Был приготовлен препарат миокарда предсердий с сохраненным синусовым узлом и спонтанной активностью. Во время эксперимента препарат правого предсердия погружали в специальный резервуар, куда подавался термостатированный рабочий раствор Тирода (состав в ммоль/л: NaCl 133.47, KCl 4.69,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  1.35,  $NaHCO_3$  16.31,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.18,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  2.5, глюкоза 7.77), и насыщали газовой смесью, состоящей из 95% кислорода и 5% углекислого газа ( $37 \pm 1$  °C). pH поддерживался на уровне 7.3–7.4. Внутриклеточный потенциал действия регистрировали с помощью усилителя (A-M Systems) стеклянными микроэлектродами с сопротивлением 25–60 МΩ и диаметром кончика < 1 мкм (BF120-60-10 “Sutter Instruments”), которые изготавлялись в день эксперимента на горизонтальном пуллере P-1000 (“Sutter Instruments”). После 35–40 мин ожидания адаптации препарата регистрировали контрольные сигналы, затем в рабочем растворе растворяли агонист  $\alpha 1$ -АР метоксамин в концентрации  $10^{-8}$  М и применяли для регистрации [18]. Для оценки участия фосфоинозитольного каскада в реализации эффектов, вызванных избирательной стимуляцией  $\alpha 1$ -АР, были проведены эксперименты с применением ингибиторов PLC: U-73122 ( $10^{-5}$  М) [17]. Для изучения стимуляции  $\alpha 1$ -АР метоксамином на фоне блокады U-73122 на параметры электрической активности миокарда у крыс разного возраста мы регистрировали контрольные сигналы, затем в рабочем растворе растворяли блокатор PLC-U-73122 (Токрис) в концентрации  $10^{-5}$  М, через 20 мин добавляли

агонист  $\alpha 1$ -АР метоксамин ( $10^{-8}$  М) и проводили регистрацию. Используемые концентрации были основаны на предыдущих экспериментах. Сигналы регистрировали с помощью программы Elph 3.0. Регистрация мембранного потенциала, потенциала действия, длительности деполяризации, амплитуды потенциала действия и длительности потенциала действия (ДПД) определялась на уровне 20% (ДПД 20%), 50% (ДПД 50%) и 90% (ДПД 90%) фазы реполяризации. Нормальность распределения проверяли с использованием теста Шапиро–Уилка, статистическую значимость оценивали с помощью One Way ANOVA для сравнения двух групп. Когда нормальность распределения отсутствовала, тестировали все процедуры попарного множественного сравнения с использованием метода Холма–Сидака. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Влияние стимуляции $\alpha 1$ -АР метоксамином и метоксамином на фоне блокады U-73122 на параметры электрической активности рабочих кардиомиоцитов у 7-дневных крысят с сохраненными синусовыми узлами и спонтанной активностью*

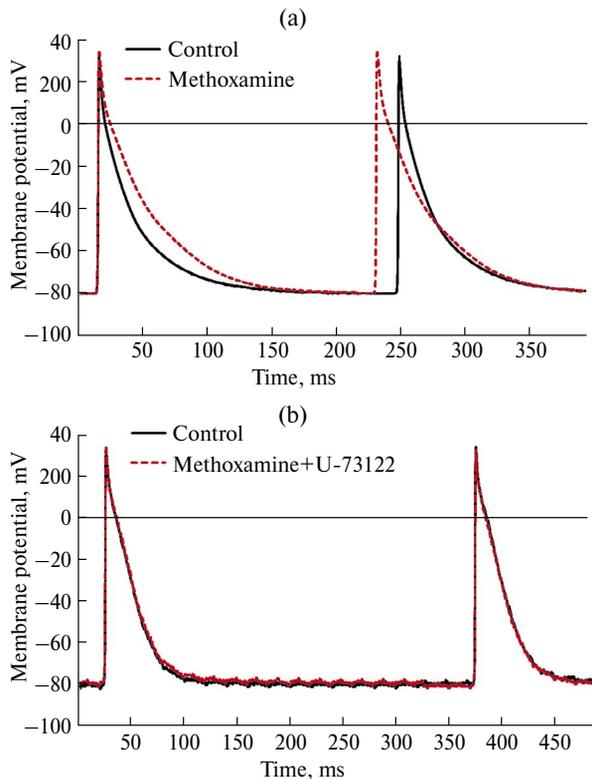
Метоксамин в концентрации  $10^{-8}$  М у новорожденных крысят ( $n = 10$ , рис. 1, 2) увеличивал длительность потенциала действия при ДПД 20%, ДПД 50% и ДПД 90% с  $6.9 \pm 0.2$  до  $9.8 \pm 0.4$  мс, с  $21.5 \pm 0.7$  до  $30.12 \pm 0.7$  мс, с  $67.4 \pm 2.4$  до  $85.67 \pm 1.4$  мс, что составляет 43.5% ( $p < 0.01$ ), 40% ( $p < 0.01$ ) и 27% ( $p < 0.01$ ) соответственно, тогда как длительность фазы деполяризации не изменялась (с  $2 \pm 0.06$  до  $1.9 \pm 0.03$  мс). Значения амплитуды потенциала действия (с  $108.3 \pm 2.2$  до  $110 \pm 3.1$  мВ) и мембранного потенциала (с  $-83.1 \pm 0.07$  до  $-83.2 \pm 0.09$  мВ) также не изменились. Метоксамин в концентрации  $10^{-8}$  М увеличивал частоту спонтанной активности у 7-дневных крысят с  $78.3 \pm 2.6$  до  $111.3 \pm 3.1$  пиков/мин, что составляет 42% ( $p < 0.01$ ).

Следующим этапом работы стало изучение стимуляции  $\alpha 1$ -АР метоксамином на фоне блокады U-73122 на параметры электрической активности миокарда у 7-дневных крысят ( $n = 10$ , рис. 1, 2) с сохраненным синусовым узлом и спонтанной активностью. U-73122 в отдельности не оказывал значимого воздействия на изучаемые электрофизиологические показатели. Применение метоксамин в концентрации  $10^{-8}$  М на фоне U-73122 ( $10^{-5}$  М) у новорожденных крысят не изменяло мембранный потенциал, амплитуду потенциала действия, длительность фазы деполяризации и длительность потенциала действия при ДПД 20%, ДПД 50% и ДПД 90%. Метоксамин на фоне U-73122 не изменял частоту спонтанной активности 7-дневных крысят.

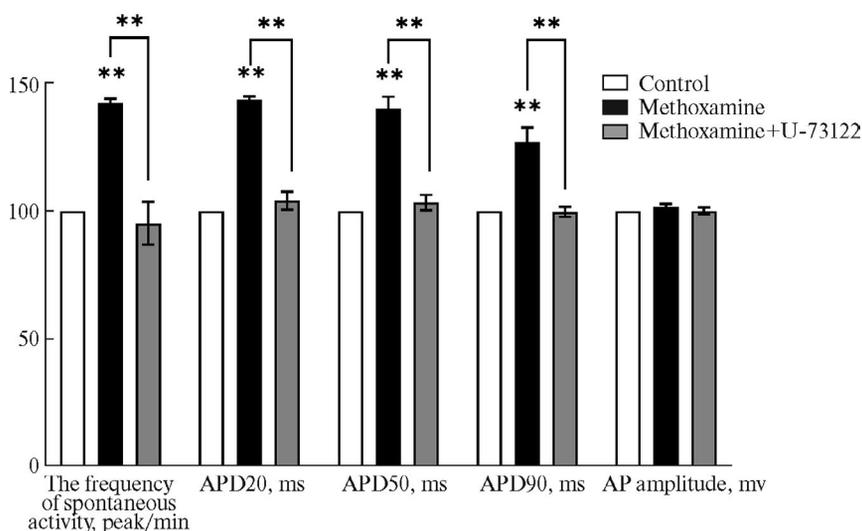
### *Влияние стимуляции $\alpha 1$ -АР метоксамином и метоксамином на фоне блокады U-73122 на параметры электрической активности рабочих кардиомиоцитов у 21-дневных крыс с сохраненными синусовыми узлами и спонтанной активностью*

Применение метоксамин в концентрации  $10^{-8}$  М у 21-дневных животных ( $n = 10$ , рис. 3, 4) не изменяло мембранный потенциал (с  $-82.8 \pm 0.25$  до  $-83.4 \pm 0.3$  мВ) и амплитуду потенциала действия (с  $103.3 \pm 2.9$  до  $100.9 \pm 2.6$  мВ). Длительность потенциала действия при ДПД 20%, ДПД 50% и ДПД 90% уменьшилась с  $6.4 \pm 0.3$  до  $5.33 \pm 0.25$  мс, с  $20.1 \pm 0.7$  до  $17.5 \pm 0.6$  мс, с  $65.4 \pm 2.5$  до  $56.77 \pm 2.6$  мс, что составляет 16.5% ( $p < 0.01$ ), 13% ( $p < 0.05$ ) и 13.1% ( $p < 0.05$ ) соответственно. Метоксамин в концентрации  $10^{-8}$  М увеличивал частоту спонтанной активности у 21-дневных крыс с  $125.7 \pm 4.4$  до  $156.6 \pm 7.5$  пиков/мин, что составляет 24.5% ( $p < 0.05$ ).

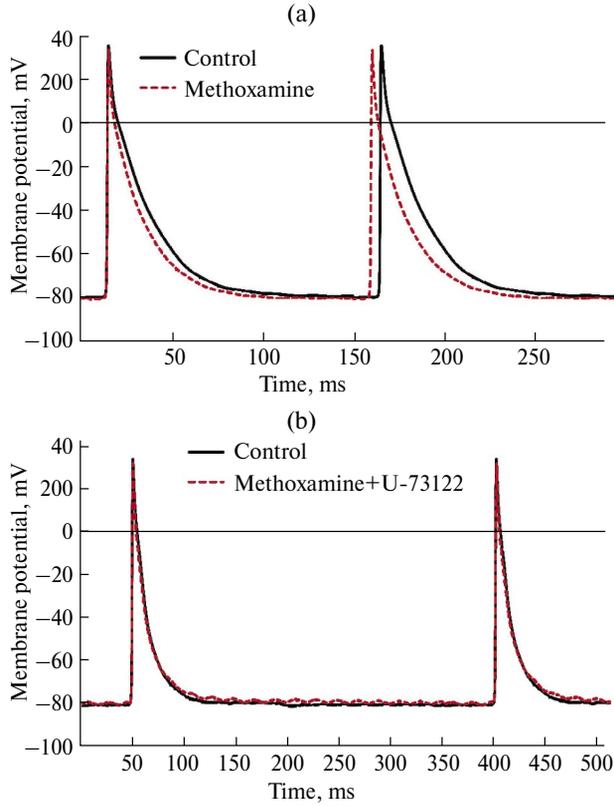
U-73122 в отдельности не оказывал значимого воздействия на изучаемые электрофизиологические показатели. Применение метоксамин в концентрации  $10^{-8}$  М на фоне U-73122 ( $10^{-5}$  М) у 21-дневных крыс ( $n = 10$ , см. рис. 3, 4) не изменяло мембранный потенциал, амплитуду потенциала действия, длительность фазы деполяризации и длительность потенциала действия при ДПД 20%, ДПД 50% и ДПД 90%. Метоксамин на фоне U-73122 не изменял частоту спонтанной активности у 21-дневных крыс.



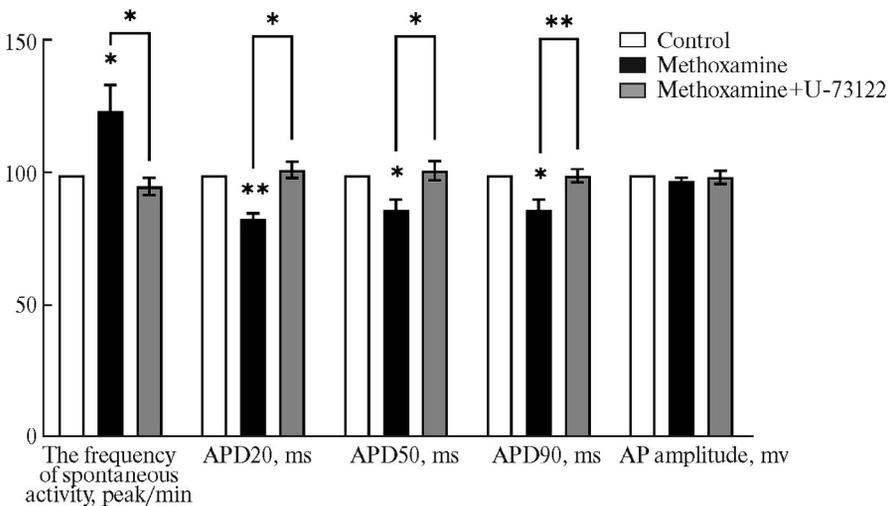
**Рис. 1.** Оригинальные записи электрической активности, демонстрирующие изменения конфигурации ПД в рабочем миокарде правого предсердия 7-дневных крыс с сохраненным синусовым узлом и спонтанной активностью при стимуляции метоксамином (а) и на фоне блокады фосфолипазы С ингибитором U-73122 (б).



**Рис. 2.** Эффект (в процентах) метоксamina и метоксamina + U-73122 на амплитудно-временные параметры у 7-дневных крыс с сохраненным синусовым узлом и спонтанной активностью (\*\*  $p < 0.01$ ).



**Рис. 3.** Оригинальные записи электрической активности, демонстрирующие изменения конфигурации ПД в рабочем миокарде правого предсердия 21-дневных крыс с сохраненным синусовым узлом и спонтанной активностью при стимуляции метоксамином (а) и на фоне блокады фосфолипазы С ингибитором U-73122 (б).

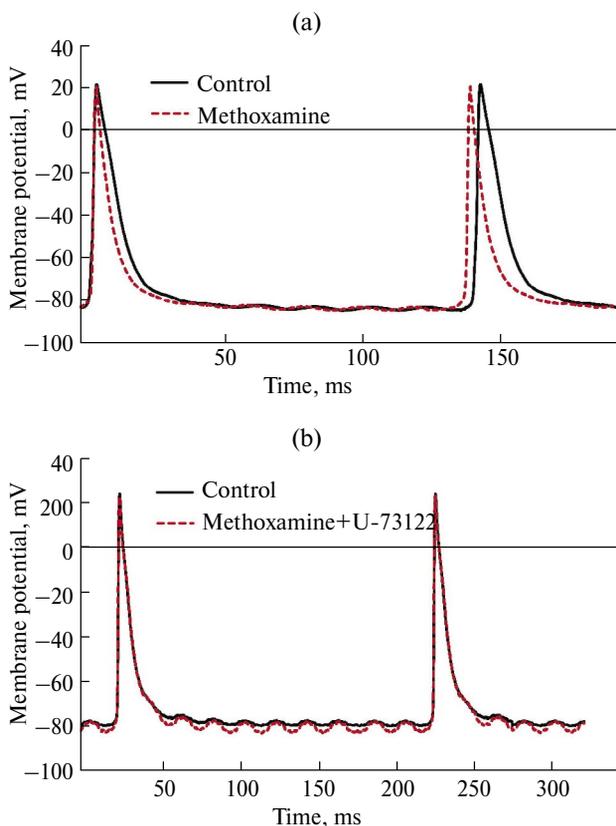


**Рис. 4.** Эффект (в процентах) метоксamina и метоксamina + U-73122 на амплитудно-временные параметры у 21-дневных крыс с сохраненным синусовым узлом и спонтанной активностью (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

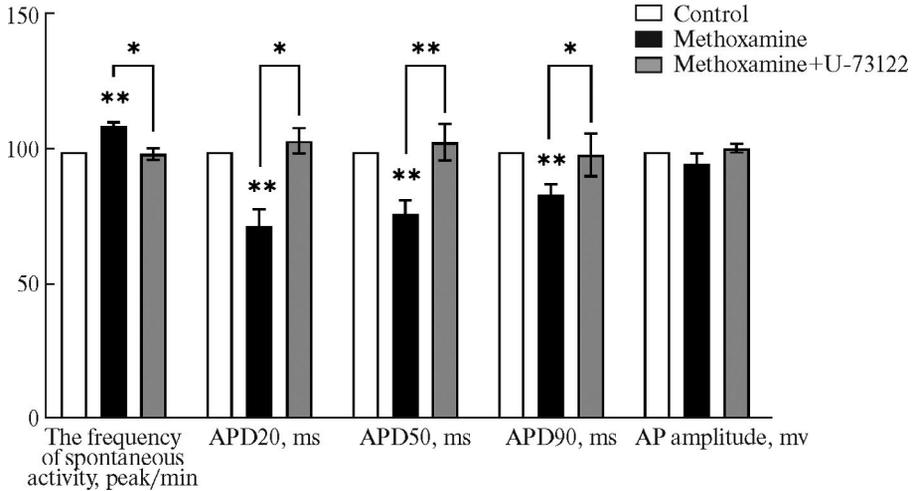
*Влияние стимуляции  $\alpha 1$ -АР метоксамином и метоксамином на фоне блокады U-73122 на параметры электрической активности рабочих кардиомиоцитов у 100-дневных крыс с сохраненными синусовыми узлами и спонтанной активностью*

Метоксамин в концентрации  $10^{-8}$  М у 100-дневных крыс ( $n = 10$ , рис. 5, 6) уменьшал длительность потенциала действия при ДПД 20%, ДПД 50% и ДПД 90% с  $7.3 \pm 0.5$  до  $5.29 \pm 0.78$  мс, с  $22.63 \pm 1.9$  до  $17.4 \pm 2.5$  мс, с  $71.5 \pm 4.9$  до  $60.08 \pm 6.05$  мс, что составляет 27.5% ( $p < 0.01$ ), 23.1% ( $p < 0.01$ ) и 16% ( $p < 0.01$ ) соответственно, тогда как длительность фазы деполяризации не изменялась (с  $1.4 \pm 0.05$  до  $1.4 \pm 0.04$  мс). Значения амплитуды потенциала действия (с  $109.4 \pm 2.7$  до  $104.7 \pm 1.9$  мВ) и мембранного потенциала (с  $-83.7 \pm 0.2$  до  $-83.3 \pm 0.2$  мВ) также не изменялись. Метоксамин в концентрации  $10^{-8}$  М увеличивал частоту спонтанной активности у 100-дневных крыс с  $164.7 \pm 9.2$  до  $180.96 \pm 9.8$  пиков/мин, что составляет 9.9% ( $p < 0.01$ ).

U-73122 в отдельности не оказывал значимого воздействия на изучаемые электрофизиологические показатели. Применение метоксaminsа в концентрации  $10^{-8}$  М на фоне U-73122 ( $10^{-5}$  М) у 100-дневных крыс ( $n = 7$ , см. рис. 5, 6) не изменяло мембранный потенциал, амплитуду потенциала действия, длительность фазы деполяризации и длительность потенциала действия при ДПД 20%, ДПД 50% и ДПД 90%. Метоксамин на фоне U-73122 не изменял частоту спонтанной активности у 100-дневных крыс.



**Рис. 5.** Оригинальные записи электрической активности, демонстрирующие изменения конфигурации ПД в рабочем миокарде правого предсердия 100-дневных крыс с сохраненным синусовым узлом и спонтанной активностью при стимуляции метоксамином (а) и на фоне блокады фосфолипазы С ингибитором U-73122 (б).



**Рис. 6.** Эффект (в процентах) метоксамина и метоксамина + U-73122 на амплитудно-временные параметры у 100-дневных крыс с сохраненным синусовым узлом и спонтанной активностью (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В наших экспериментах мы наблюдали возрастные особенности влияния стимуляции  $\alpha 1$ -АР метоксамином на длительность реполяризации рабочих кардиомиоцитов и частоту генерации потенциала действия. Было показано, что агонист  $\alpha 1$ -АР влияет на длительность реполяризации на уровне ДПД 20%, ДПД 50% и ДПД 90% у крыс разного возраста. Однако изменений мембранного потенциала, амплитуды потенциала действия и длительности фазы деполяризации не наблюдалось. У новорожденных крыс метоксамин увеличивает продолжительность реполяризации, в то время как у 21- и 100-дневных крыс он вызывал ее уменьшение. Эти данные указывают на то, что передача сигналов  $\alpha 1$ -АР в миокарде предсердий модулируется с возрастом. Выявленные различия влияния стимуляции  $\alpha 1$ -АР метоксамином на длительность реполяризации рабочих кардиомиоцитов могут быть связаны с незрелой регуляцией симпатической иннервации в сердце новорожденных крыс, и это подтверждает важность адренергической регуляции во время развития [23, 24].

Изучение эффектов стимуляции  $\alpha 1$ -АР метоксамином проводилось как отдельно, так и на фоне специфического ингибитора PLC (U-73122). Исследование с блокадой PLC показало, что примененный ингибитор полностью блокирует действие метоксамина во всех возрастных группах (7, 21 и 100 дней). Это позволяет предположить, что PLC играет решающую роль в обеспечении возрастных эффектов метоксамина на электрическую активность предсердий.

Таким образом, в настоящей работе были установлены возрастные особенности противоположного влияния стимуляции  $\alpha 1$ -АР на длительность фазы реполяризации рабочих кардиомиоцитов предсердия и частоту генерации потенциала действия. Эти изменения происходят при активации PLC через передачу сигналов РКС в кардиомиоцитах правого предсердия крыс, что изменяется с возрастом. Активация PLC приводит к образованию двух продуктов –  $IP_3$  и DAG. Существует три типа рецепторов  $IP_3$ , которые различаются по своей связывающей способности с  $IP_3$  и взаимодействию с ионами  $Ca^{2+}$ . Исследования на различных животных показывают, что все три типа рецепторов могут присутствовать в сердце. Тем не менее существуют различия между видами в преобладании определенной изоформы. У большинства видов животных

в предсердиях и желудочках доминирует второй тип рецептора  $IP_3$ -R [25, 26]. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что плотность рецепторов  $IP_3$  в предсердиях примерно в 6 раз выше, чем в желудочках [8]. DAG активирует РКС, которая участвует в различных клеточных функциях, включая старение, фиброз и гипертрофию. Передача сигналов РКС в кардиомиоцитах крыс изменяется с возрастом. Хотя у новорожденных крыс присутствуют все шесть изоформ (альфа, бета1/2, дельта, эpsilon и дзета) [13], три изоформы (альфа, бета1/2) исчезают с возрастом. В миокарде взрослого человека остаются только дельта-, эpsilon- и дзета-изоформы [14]. Возможно, именно передача сигналов разными изоформами РКС может играть роль в развитии и созревании сердца, а потеря определенных изоформ с возрастом может способствовать возрастным изменениям электрической активности кардиомиоцитов. Ионные каналы являются мишенями для фосфорилирования РКС, что представляет собой регуляторный этап с важными последствиями для здоровья и болезней. Показано, что десять различных семейств мембранных белков, отвечающих за транспорт ионов, зависят от  $PIP_2$  для своей активности, и указано конкретное направление контроля активности этих белков со стороны  $PIP_2$ . К ним относятся каналы транзитного рецепторного потенциала (TRP) (шесть семейств TRP: канонических (TRPC), TRP меластатиновых (TRPM), TRP ваниллоидных (TRPV), TRP анкириновых, TRP поликистозных (TRPP) и TRP муколипиновых); а также каналы внутреннего выпрямления калия ( $K_{ir}$ ), каналы  $K_v$ , каналы двухпорового домена калия ( $K_{2p}$ ), кальций-активируемые калиевые каналы ( $K_{Ca}$ ), потенциал-зависимые кальциевые каналы ( $Ca_v$ ), хлоридные каналы, потенциал-зависимые натриевые каналы ( $Na_v$ ), кислоточувствительные ионные каналы (ASICs) и каналы коннексинов ( $Cx_{43}$ ) [16].

Активация PLC и образование  $IP_3$  и DAG важны для регуляции клеточных функций через РКС. Изменения в сигнализации РКС с возрастом, включая потерю изоформ, влияют на развитие сердца и его функции.

Результаты указывают на возможную связь между передачей сигналов PLC и наблюдаемыми возрастными эффектами метоксамина на электрическую активность предсердий, хотя эта связь не является однозначной.

Будущие исследования помогут изучить конкретные сигнальные пути, активируемые PLC, которые включаются при стимуляции  $\alpha 1$ -АР и влияют на продолжительность потенциала действия в разных возрастных группах.

#### ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н.М., Н.И.З., Т.Л.З.), сбор данных (Н.М.), обработка данных (Н.М.), написание и редактирование манускрипта (Н.М., Н.И.З., Т.Л.З., А.Л.З.).

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Настоящая работа финансировалась за счет средств бюджета Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Этическим комитетом Казанского федерального университета, протокол № 39 от 22.12.2022 г.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ahlquist RP* (1948) A study of the adrenergic receptors. *Am J Physiol* 153: 586–600.  
<https://doi.org/10.1152/AJPLEGACY.1948.153.3.586>
2. *Van Meel JC, de Jonge A, Timmermans PB, van Zwieten PA* (1981) Selectivity of some alpha adrenoceptor agonists for peripheral alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in the normotensive rat. *J Pharmacol Exp Therap* 219: 760–767.  
<https://jpet.aspetjournals.org/content/219/3/760.long>
3. *McGrath JC* (2015) Localization of  $\alpha$ -adrenoceptors: JR Vane Medal Lecture. *Br J Pharmacol* 172: 1179–1194.  
<https://doi.org/10.1111/BPH.13008/SUPPINFO>
4. *Zhang J, Simpson PC, Jensen BC* (2021) Cardiac  $\alpha$ 1A-adrenergic receptors: Emerging protective roles in cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 320: H725–H733.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00621.2020>
5. *Akinaga J, Garcia-Sáinz JA, Pupo SA* (2019) Updates in the function and regulation of  $\alpha$ 1-adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 176: 2343–2357.  
<https://doi.org/10.1111/BPH.14617>
6. *O'Connell TD, Jensen BC, Baker AJ, Simpson PC* (2014) Cardiac Alpha-1-Adrenergic Receptors: Novel Aspects of Expression, Signaling Mechanisms, Physiologic Function, and Clinical Importance. *Pharmacol Rev* 66: 308–333.  
<https://doi.org/10.1124/PR.112.007203>
7. *Kockskämper J, Zima A V., Roderick HL, Pieske B, Blatter LA, Bootman MD* (2008) Emerging roles of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 45: 128–147.  
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.05.014>
8. *Lipp P, Laine M, Tovey SC, Burrell KM, Berridge MJ, Li W, Bootman MD* (2000) Functional InsP3 receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. *Current Biol* 10: 939–942.  
[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00624-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00624-2)
9. *Domeier TL, Zima A V., Maxwell JT, Huke S, Mignery GA, Blatter LA* (2008) IP3 receptor-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  release modulates excitation-contraction coupling in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: 596–604.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.01155.2007>
10. *Harzheim D, Movassagh M, Foo RSY, Ritter O, Tashfeen A, Conway SJ, Bootman MD, Roderick HL* (2009) Increased InsP3Rs in the junctional sarcoplasmic reticulum augment  $\text{Ca}^{2+}$  transients and arrhythmias associated with cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 11406–11411.  
<https://doi.org/10.1073/PNAS.0905485106>
11. *Ibarra C, Vicencio JM, Estrada M, Lin Y, Rocco P, Rebellato P, Munoz JP, Garcia-Prieto J, Quest AFG, Chiong M, Davidson SM, Bulatovic I, Grinnemo KH, Larsson O, Szabadkai G, Uhlén P, Jaimovich E, Lavandero S* (2013) Local control of nuclear calcium signaling in cardiac myocytes by perinuclear microdomains of sarcolemmal insulin-like growth factor 1 receptors. *Circ Res* 112: 236–245.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.273839>
12. *Gomez AM, Ruiz-Hurtado G, Benitah J-P, Dominguez-Rodriguez A* (2013)  $\text{Ca}^{2+}$  Fluxes Involvement in Gene Expression During Cardiac Hypertrophy. *Curr Vasc Pharmacol* 11: 497–506.  
<https://doi.org/10.2174/157016111311040013>
13. *Disatnik MH, Buraggi G, Mochly-Rosen D* (1994) Localization of Protein Kinase C Isozymes in Cardiac Myocytes. *Exp Cell Res* 210: 287–297.  
<https://doi.org/10.1006/EXCR.1994.1041>
14. *Pucéat M, Hilal-Dandano R, Strulovicin B, Brunton LL, Brown JH* (1994) Differential regulation of protein kinase C isoforms in isolated neonatal and adult rat cardiomyocytes. *J Biol Chem* 269: 16938–16944.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)89480-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)89480-2)
15. *Steinberg SF* (2012) Cardiac actions of protein kinase C isoforms. *Physiology* 27: 130–139.  
<https://doi.org/10.1152/PHYSIOL.00009.2012>
16. *Gada KD, Logothetis DE* (2022) PKC regulation of ion channels: The involvement of PIP2. *J Biol Chem* 298: 102035.  
<https://doi.org/10.1016/J.JBC.2022.102035>
17. *MacMillan D, McCarron JG* (2010) The phospholipase C inhibitor U-73122 inhibits  $\text{Ca}^{2+}$  release from the intracellular sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  store by inhibiting  $\text{Ca}^{2+}$  pumps in smooth muscle. *Br J Pharmacol* 160: 1295–1301.  
<https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2010.00771.X>
18. *Zefirov TL, Khabibrakhmanov II, Ziyatdinova NI, Zefirov AL* (2016) Peculiar Aspects in Influence of  $\alpha$ 1-Adrenoceptor Stimulation on Isolated Rat Heart. *Bull Exp Biol Med* 162: 4–6.  
<https://doi.org/10.1007/S10517-016-3530-Z>

19. *Khabibrakhmanov II, Kuptsova AM, Ziyatdinova NI, Mansour N, Zefirov TL* (2020) Alpha(1)-Adrenoceptors Activation Decreases Myocardial Contractility in Newborn Rats. *J Exp Biol Agricult Sci* 322–326.  
[https://doi.org/10.18006/2020.8\(Spl-2-AABAS\).S322.S326](https://doi.org/10.18006/2020.8(Spl-2-AABAS).S322.S326)
20. *Mansour N, Ziyatdinova NI, Zefirov TL* (2023) Methoxamine Plays a Role in the Regulation of the Electrical Activity of Newborn Rats. *Opera Med Physiol* 10: 59–64.  
<https://doi.org/10.24412/2500-2295-2023-2-59-64>
21. *Mansour N, Ziyatdinova NI, Gallieva AM, Shakirov RR, Zefirov TL* (2023) Effect of  $\alpha 1$  Adrenoceptors Stimulation on Electrical Activity of Rat Atria. *Biophysics (Russ Feder)* 68: 607–611.  
<https://doi.org/10.1134/S0006350923040115>
22. *Robinson RB* (1996) Autonomic receptor-effector coupling during post-natal development. *Cardiovas Res* 31: 68–76.
23. *Ferron L, Capuano V, Deroubaix E, Coulombe A, Renaud JF* (2002) Functional and molecular characterization of a T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel during fetal and postnatal rat heart development. *J Mol Cell Cardiol* 34: 533–546.  
<https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.1535>
24. *Protas L, Barbuti A, Qu J, Rybin VO, Palmiter RD, Steinberg SF, Robinson RB* (2003) Neuropeptide Y Is an Essential In Vivo Developmental Regulator of Cardiac  $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ . *Circ Res* 93: 972–979.  
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000099244.01926.56>
25. *Li X, Zima A V, Sheikh F, Blatter LA, Chen J* (2005) Endothelin-1-induced arrhythmogenic  $\text{Ca}^{2+}$  signaling is abolished in atrial myocytes of inositol-1,4,5-trisphosphate(IP3)-receptor type 2-deficient mice. *Circ Res* 96: 1274–1281.  
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000172556.05576.4c>
26. *Bare DJ, Kettlun CS, Liang M, Bers DM, Mignery GA* (2005) Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: Interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 280: 15912–15920.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M414212200>

## The Role of Phospholipase C in Modulating the Electrical Activity of Atrial Cardiomyocytes in Growing Rats upon Stimulation of $\alpha 1$ -Adrenergic Receptors

N. Mansour<sup>a,\*</sup>, A. L. Zefirov<sup>b</sup>, N. I. Ziyatdinova<sup>a</sup>, and T. L. Zefirov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia*

<sup>b</sup>*Kazan State Medical University, Kazan, Russia*

\**E-mail: nourm94@mail.ru*

Most existing research focuses on the mechanisms regulating membrane electrogenesis through  $\beta$ -adrenergic receptors, while the electrophysiological effects of  $\alpha 1$ -adrenergic receptors ( $\alpha 1$ -ARs) remain poorly understood. The involvement of phospholipase C (PLC) in these effects is unclear, and the study of the non-selective agonist of  $\alpha 1$ -AR subtypes, methoxamine, in the presence of the PLC inhibitor (U-73122) may clarify the importance of PLC in modulating the electrical activity of cardiomyocytes in rats of different ages. The study was conducted on 7-, 21-, and 100-day-old white rats using microelectrode techniques. Urethane was used for anesthesia, after which the heart was isolated, and a preparation of atrial myocardium with a preserved sinoatrial node and spontaneous activity was prepared. The electrical activity of cardiomyocytes was then recorded. To assess the effects, the  $\alpha 1$ -AR agonist methoxamine and the phospholipase C inhibitor U-73122 were applied. Stimulation of  $\alpha 1$ -ARs with methoxamine in working cardiomyocytes of the right atrium of rats of different ages led to an increase in the frequency of action potential generation. Methoxamine at a concentration of  $10^{-8}$  M increased the action potential duration in 7-day-old rats, whereas it decreased in 21- and 100-day-old rats. U-73122 completely blocked the effect of methoxamine in all age groups, indicating the important role of phospholipase C in these processes. The results demonstrate that age influences the response of cardiomyocytes to  $\alpha 1$ -AR stimulation, and phospholipase C is a key element in the mechanisms underlying these effects.

**Keywords:** phospholipase C, methoxamine, U-73122, action potential duration, heart, rat