

На правах рукописи



**Дуркина Александра Владимировна**

**ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНИНА НА  
ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ  
МИОКАРДА КРЫС**

1.5.5. – Физиология человека и животных

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Сыктывкар – 2025

Работа выполнена в Институте физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук» (ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН).

Научный руководитель:

**Азаров Ян Эрнестович**, доктор биологических наук, доцент

Официальные оппоненты:

**Абрамочкин Денис Валерьевич**, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», ведущий научный сотрудник, заведующий кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета «МГУ им. М.В. Ломоносова» (г. Москва);

**Карпушев Алексей Валерьевич**, кандидат биологических наук, Федеральное государственное унитарное предприятие Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток Федеральное медико-биологическое агентство России, аналитик отдела аналитики фармацевтических препаратов ФГУП СПбНИИВС ФМБА России (г. Санкт-Петербург)

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», г. Долгопрудный.

Защита диссертации состоится «22» апреля 2025 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 004.038.01 в Федеральном исследовательском центре «Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук» по адресу 167982, Республика Коми, г. Сыктывкар, ГСП-2, ул. Первомайская, д. 50, olga-parshukova@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук» по адресу 167982, Республика Коми, г. Сыктывкар, ГСП-2, ул. Коммунистическая, д. 24, и на сайте <http://www.physiol.komisc.ru/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета



Паршукова О.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы и степень ее разработанности.** Желудочковая тахикардия и/или фибрилляция желудочков (ЖТ/ФЖ) являются частым и опасным для жизни осложнением острого инфаркта миокарда и могут приводить к внезапной сердечной смерти. Профилактика таких аритмических событий представляет собой общественно-значимую проблему, а разработка лекарственных средств для такой профилактики – важную исследовательскую задачу. ЖТ/ФЖ в значительной степени являются результатом механизма реентри, основанных на взаимодействии аритмического субстрата и триггера (Janse et al., 1989; Belardinelli et al., 2003). Триггер обеспечивается желудочковыми экстрасистолами с короткими интервалами сцепления, обычно обусловленными ранней или отсроченной постдеполяризацией или нарушением автоматизма сердца, а субстрат представляет собой пораженный миокард, в котором присутствует невозбудимый участок, возникают условия для одностороннего блока проведения, и имеется достаточное «окно возбудимости» перед фронтом волны возбуждения.

Профилактика внезапной сердечной смерти основывается на модификации вышеперечисленных условий для возникновения реентри-аритмий. Использование классических антиаритмических средств в профилактических целях существенно ограничено их возможными проаритмическими эффектами (Camm, 2017). В связи с этим возникает необходимость поиска новых антиаритмических средств, которые сочетали бы безопасность и эффективность в отношении аритмического субстрата и триггеров.

В последние годы большое внимание исследователей привлекает мелатонин, наиболее известная функция которого – регуляция циркадных ритмов. Недавние исследования, однако, продемонстрировали, что мелатонин может оказывать множество эффектов в нормальных условиях и при различных заболеваниях. В частности, мелатонин может выступать как кардиопротекторный агент при ишемии и инфаркте миокарда и обладает антиаритмическим действием (Lochner et al., 2018), хотя механизмы этого эффекта оставались малоизученными. Было установлено, что мелатонин безопасен для человека при использовании даже в высоких дозах (Andersen et al., 2016). Набор этих характеристик позволяет рассматривать мелатонин как перспективный кандидат на роль нового антиаритмического средства, механизмы действия которого должны быть определены.

Мелатонин, благодаря своим амфифильным свойствам, может легко проникать в клетку и в митохондрии, где он может обеспечивать антиоксидантную защиту (Manchester et al., 2015; Reiter et al., 2016) как за счёт удаления активных форм кислорода непосредственно (Reiter et al., 2001), так и за счет стимуляции антиоксидантной ферментативной активности (Pablos et al., 1998; Rodriguez, et al., 2004). Кроме того, мелатонин взаимодействует со множеством мишеней, включая рецепторы плазматической мембраны (MT1 и MT2), которые детально охарактеризованы со структурной (Stauch et al., 2020) и функциональной (Nikolaev et al., 2021) точек зрения. Кроме этого, возможно взаимодействие мелатонина с

ядерными рецепторами, а также внутриклеточными и даже внеклеточными белками (Liu et al., 2019).

В числе прочих эффектов мелатонина было обнаружено его кардиопротекторное и, в частности, антиаритмическое действие (Blatt et al., 1979; Tan et al., 1998; Vazan et al., 2005; Prado et al., 2019), которое обычно связывают либо с его влиянием непосредственно на миокард (Lochner et al., 2018; Manchester et al., 2015; Prado et al., 2019; Reiter et al., 2010), либо с ингибированием симпатической нервной системы (Paulis et al., 2007; Yang et al., 2019; Zhang et al., 2020). Молекулярные мишени и/или механизмы антиаритмического действия мелатонина до сих пор не выяснены. Существует точка зрения, что защита от жизнеугрожающих аритмий в основном связана с антиоксидантным действием мелатонина (Diez et al., 2009), которое, как предполагается, способно сохранить функцию ионных каналов и снизить восприимчивость сердца к аритмиям (Jeong et al., 2012). Однако, в недавних исследованиях (Sedova et al., 2019; Tsvetkova et al., 2020) было показано, что антиаритмический и антиоксидантный эффекты мелатонина в модели ишемии-реперфузии не связаны друг с другом, а также было продемонстрировано, что под влиянием мелатонина меняется сразу несколько электрофизиологических характеристик, связанных с поддержанием потенциала покоя, деполяризации и реполяризации потенциала действия кардиомиоцитов (Sedova et al., 2019). Эти наблюдения свидетельствуют о том, что антиаритмические эффекты мелатонина могут быть опосредованы его рецептор-зависимыми сигнальными путями и иметь специфические электрофизиологические мишени, которые следует установить.

В связи с вышесказанным, **цель данной работы** заключалась в изучении влияния хронического и острого действия мелатонина на электрофизиологические характеристики миокарда крыс в нормальных условиях и в модели ишемии-реперфузии.

**В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:**

1. Оценить влияние *хронического* (7-дневного) воздействия мелатонина на электрофизиологические характеристики миокарда желудочков крыс в нормальных условиях и в модели ишемии-реперфузии:

а) Определить влияние мелатонина на активацию миокарда желудочков (по параметрам эпикардиального картирования);

б) Определить влияние мелатонина на быстрый натриевый ток  $I_{Na}$  в желудочковых кардиомиоцитах;

в) Определить влияние мелатонина на уровень мРНК генов натриевых каналов *Scn5a* и *Scn1b* и коннексина-43 *Gjal*;

г) Определить влияние мелатонина на уровень экспрессии белка коннексина-43 (*Gjal*) и натриевого канала  $Na_v1.5$  (*Scn5a*);

д) Оценить антиаритмический эффект мелатонина на модели ишемии-реперфузии.

2. Оценить влияние *острого* воздействия мелатонина на электрофизиологические характеристики миокарда желудочков крыс в нормальных условиях и в модели ишемии-реперфузии:

а) Определить влияние мелатонина на активацию и реполяризацию желудочков (по параметрам эпикардимального картирования);

б) Определить влияние мелатонина на быстрый натриевый ток  $I_{Na}$  и калиевый ток входящего выпрямления  $I_{K1}$  в желудочковых кардиомиоцитах;

в) Оценить антиаритмический эффект мелатонина на модели ишемии-реперфузии;

г) Оценить роль рецептор-зависимого пути реализации основных электрофизиологических эффектов мелатонина;

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

Были продемонстрированы новые эффекты мелатонина:

1. Установлено, что 7-дневный приём мелатонина вызывает повышение экспрессии белков натриевых каналов в кардиомиоцитах крыс, за счёт чего в клетках усиливается натриевый ток и повышается скорость проведения импульса по рабочему миокарду.

2. В модели острой ишемии-реперфузии установлено, что антиаритмический эффект при остром введении мелатонина обусловлен активацией сигнального пути, опосредуемого мелатониновыми рецепторами. Лузиндол, блокатор  $MT1/MT2$  рецепторов мелатонина, замедляет проведение возбуждения в миокарде и отменяет антиаритмическое действие мелатонина. Показано, что электрофизиологической мишенью кратковременного действия мелатонина является калиевый ток входящего выпрямления  $I_{K1}$ , за счет которого поддерживается мембранный потенциал покоя.

**Научно-практическая значимость исследования.** Полученные данные свидетельствуют о том, что влияние мелатонина на проведение импульса по миокарду реализуется через рецепторные ( $MT1/MT2$ ) сигнальные пути. Эти наблюдения могут способствовать поиску новых методов лечения, особенно тех, которые нацелены на применение при ишемических состояниях, когда многие другие подходы поддержания проведения импульса могут быть неэффективными. Также можно ожидать положительные эффекты мелатонина в ситуациях, когда проведение импульса нарушено в результате приобретенных хронических заболеваний или врожденных аритмических синдромов.

**Методология.** В данной работе изучали хроническое и острое действие мелатонина в экспериментах на крысах. Для решения поставленных задач были использованы электрофизиологические и молекулярные методы исследования. К электрофизиологическим методам относятся картирование электрических потенциалов с поверхности желудочков сердца, а также регистрация ионных токов в изолированных кардиомиоцитах методом локальной фиксации потенциала (пэч-кламп). Из молекулярных методов исследования нами были выбраны метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (РВ-ПЦР) для изучения уровня экспрессии мРНК и иммуноблоттинг (вестерн блоттинг) для выявления экспрессии

белков ионных каналов и белков щелевых контактов при действии мелатонина. Для тестирования антиаритмических свойств мелатонина использовали модель ишемии-реперфузии.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Как при хроническом, так и при остром применении основным эффектом мелатонина, обуславливающим его антиаритмические эффекты, является повышение скорости проведения импульса в миокарде желудочков крыс.

2. Механизмы ускорения проведения импульса в миокарде при остром и хроническом применении мелатонина различны. Они связаны соответственно с поддержанием нормального потенциала покоя и с повышением экспрессии белков натриевых каналов.

3. Антиаритмическое влияние мелатонина не связано с действием на триггеры тахикардий и ограничено модификацией аритмогенного субстрата.

4. Антиаритмическое действие мелатонина опосредовано его рецептор-зависимым сигнальным путём.

**Публикации.** По результатам данной диссертационной работы было опубликовано 9 печатных работ: 3 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science или Scopus, а также 6 тезисов докладов на всероссийских и международных научных конференциях.

**Апробация результатов.** Результаты работы были представлены на VII Всероссийской с международным участием школе-конференции «Физиология и патология кровообращения» (Москва, Россия, 2020), международной конференции «4th International Wroclaw Scientific Meeting» (Вроцлав, Польша, 2020), международной конференции Experimental Biology (2021), IV Всероссийской (XIX) молодежной научной школе-конференции «Молодежь и наука на Севере - 2022» (Сыктывкар, Россия, 2022) и IV молодёжной школе-конференции «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций» (Звенигород, Россия, 2023).

**Личный вклад автора.** Автор диссертации, Дуркина А.В., принимала участие во всех этапах выполнения данной работы – разработка плана экспериментов, проведение электрофизиологических экспериментов, статистическая обработка данных, интерпретация результатов, написание статей и текста диссертационной работы, а также подготовка и представление результатов исследования на научных конференциях.

**Соответствие паспорту научной специальности.** Диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.5. – физиология человека и животных, область исследований - 2. Молекулярная и интегративная организация физиологических функций; 4. Закономерности функционирования основных систем организма (... , кровообращения, ...) при различных состояниях организма.

**Степень достоверности данных.** Результаты данных, представленные в работе, получены при помощи общепринятых современных экспериментальных методик. Дизайн исследования построен таким образом, чтобы данные молекулярных методов исследования были подтверждены функциональными.

Данные проанализированы статистическими методами с использованием современного программного обеспечения. Обзор литературы и обсуждение подготовлены с использованием актуальных научных источников.

**Легитимность исследований.** Исследования были одобрены этическим комитетом Института физиологии Коми научного центра УрО РАН (одобрение 19 февраля 2018 г., редакция от 19 сентября 2018 г.). Все эксперименты соответствовали Руководству по уходу и использованию лабораторных животных, 8-е издание, опубликованное National Academies Press (США), 2011 г., а также руководящим принципам Директивы 2010/63/EU Европейского парламента о защите животных, используемых в научных целях.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений и списка используемой литературы. Объём работы составляет 118 страниц, включая 23 рисунка и 2 таблицы. Список цитируемой литературы включает 248 источника.

Обзор литературы состоит из трех основных разделов, содержащих сведения о возбуждении в миокарде, раскрывая детали об ионных каналах и коннексинах, описание основных механизмов возникновения желудочковых тахикардий, а также подробные сведения о мелатонине, его рецепторах и сигнальном пути.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Электрофизиологические исследования проводились на базе лаборатории физиологии сердца Института физиологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН (г. Сыктывкар). Молекулярные исследования по оценке уровня мРНК (РВ-ПЦР) и уровня экспрессии белка (Вестерн-блот) проводили в центре коллективного пользования «Молекулярная биология» Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН.

**Экспериментальные животные.** В работе использовали самцов крыс линии Wistar (возраст 3 месяца, масса 250-300 г, общее количество 191). Все исследования соответствовали Руководству по уходу и использованию лабораторных животных (8-е издание, издательство National Academies Press, США, 2011 г.), а также рекомендациям Директивы 2010/63/ЕС Европейского парламента о защите животных, используемых в научных целях и были одобрены локальным Комитетом по биоэтике Института физиологии Коми НЦ УрО РАН (утверждено 19 февраля 2018 г., редакция 19 сентября 2018 г.).

**Оценка длительного влияния экзогенного мелатонина.** В течение 7 дней животные ежедневно получали перорально мелатонин (10 мг/кг, мелатониновая группа, Sigma Aldrich, США) или плацебо (контрольная группа) строго в 16 часов.

**Оценка кратковременного влияния экзогенного мелатонина.** Кратковременные эффекты мелатонина оценивали 1) при остром системном введении в эксперименте *in vivo*, 2) в экспериментах *in vitro*. Тестируемые вещества – плацебо (физиологический раствор), мелатонин (4 мг/кг, Sigma Aldrich, США) и блокатор мелатониновых рецепторов - лузиндол (0,4 мг/кг, Sigma Aldrich, США), а

также комбинацию лузиндол+мелатонин вводили внутривенно наркотизированным животным перед индукцией ишемии.

**Модель ишемии-реперфузии.** Животных анестезировали внутримышечной инъекцией зоветила (Virbac S.A., Carros, Франция, 15 мг/кг) и ксилазина (Interchemie, Castenray, Нидерланды, 0,1 мг/кг) и переводили на искусственную вентиляцию лёгких. Ишемию миокарда индуцировали при помощи наложения лигатуры на левую переднюю нисходящую коронарную артерию на уровне ее проксимальной трети. Окклюзия сохранялась в течение 5 минут, затем для реперфузии лигатуру ослабляли.

**Электрофизиология *in vivo*.** Униполярные электрограммы регистрировали с эпикарда верхушки правого и левого желудочков с использованием 64-электродной матрицы (8x8, расстояние между электродами 0,4 мм) с использованием 128-канальной системы записи. Время активации (AT) определяли как минимум  $dV/dt$  в период QRS, время реполяризации (RT) – как максимум  $dV/dt$  в период T волны. Интервал активация-реполяризация (ARI), отражающий длительность потенциала действия, рассчитывали как разность RT и AT. Время прорыва волны возбуждения на эпикард (AT<sub>min</sub>) определяли как минимальное время активации в отведениях правого желудочка. Дисперсия реполяризации (DOR) рассчитывалась как разность между максимальными и минимальными значениями RT. Скорость проведения возбуждения (CV) измеряли по изохронным картам при электрической стимуляции (400 уд/мин, 2 мА, 2 мс). В эксперименте с хроническим воздействием мелатонина рассчитывали среднюю скорость, а в эксперименте с острым воздействием определяли продольную (CVL) и поперечную (CVT) скорости в перпендикулярных направлениях как максимальную и минимальную соответственно.

**Оценка частоты сердечных сокращений, экстрасистолической нагрузки и жизнеугрожающих желудочковых тахикардий.** Частоту сердечных сокращений (интервалы RR) оценивали исходно, на 1, 2, 3, 4 и 5 минутах коронарной окклюзии, а также на 1, 2, 3, 4 и 5 минутах реперфузии. Экстрасистолическая нагрузка характеризовалась количеством желудочковых экстрасистол (ЭС), которые измеряли в те же моменты, что и интервалы RR, исключая исходное состояние. Встречаемость желудочковой тахикардии (ЖТ) и/или фибрилляции желудочков (ФЖ) оценивали в течение первых пяти минут реперфузии.

**Энзиматическая изоляция желудочковых кардиомиоцитов.** Кардиомиоциты выделяли у животных после *in vivo* экспериментов. Сердце вырезали при глубокой анестезии, канюлировали через аорту и подключали к аппарату Лангендорфа для ретроградной перфузии. Сначала его промывали 10 минут модифицированным раствором Тироде без  $Ca^{2+}$ , затем заменяли раствор на тот же состав с коллагеназой II (0,5 мг/мл), протеазой (0,01 мг/мл) и 20 мкМ  $CaCl_2$ , перфузируя 35 минут. Желудочки измельчали, пипетировали, фильтровали через

сетку 200 мкм и помещали в раствор Kraftbruehe (KB). Клетки для записи ионных токов использовали через час после выделения.

**Регистрация ионных токов в кардиомиоцитах крыс методом пэтч-кламп.** Ионные токи и трансмембранные потенциалы регистрировали в конфигурации whole-cell при комнатной температуре с помощью усилителя Axopatch 200B (Axon, США). Пипетки из боросиликатного стекла вытягивали пуллером НЕКА PIP 6 (Германия). Трансмембранные потенциалы измеряли в режиме current-clamp, а ионные токи – voltage-clamp. Регистрацию проводили после формирования гигаомного контакта и перфорации клеточной мембраны. Для оценки острого действия мелатонина в растворы добавляли 10 мкМ мелатонина и/или 1 мкМ лузиндола.

**Оценка уровня мРНК в миокарде методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.** Экспрессию белка альфа-1 щелевых контактов (*Gjal* или *Cx43*) и гены натриевых потенциал-зависимых каналов (*Scn5a* и *Scn1b*) анализировали при помощи ПЦР-РВ. Тотальная РНК была выделена из миокарда правого и левого желудочка. Целостность выделенной РНК проверяли электрофорезом в агарозном геле и проводили количественную оценку РНК. Тотальную РНК обратно транскрибировали в кДНК. Реакции ПЦР в реальном времени проводили на ПЦР-детектирующей системе CFX96 (Bio-Rad, США). Данные анализировали с использованием программы CFX Manager (Bio-Rad, США).

**Оценка уровня экспрессии белка методом вестерн блоттинг.** Фрагмент правого желудочка размораживали, гомогенизировали и лизировали в буфере RIPA, очищали центрифугированием и определяли концентрацию белка. Образцы разделяли на акриламидных гелях, переносили на PVDF-мембрану, блокировали в 3% BSA (1 час), инкубировали с первичными антителами (ночь, 4 °С) и вторичными антителами (2 часа, комнатная температура). Блоты визуализировали с помощью Chemidoc XRS (Bio-Rad, США).

**Статистическая обработка данных.** Статистическая обработка данных проводилась в программе GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего, различия считались значимыми при  $p < 0,05$ . Распределение данных проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для нормального распределения использовали параметрические методы: t-критерий Стьюдента (две группы) и ANOVA с тестами Тьюки или Даннета (несколько групп). Для повторных измерений применяли парный t-критерий с поправкой Бонферони. В группах с  $n < 10$  применяли непараметрические критерии Манна-Уитни и Вилкоксона. Связь между аритмиями и электрофизиологическими параметрами проверяли логистической регрессией, а частоту аритмий в разных группах сравнивали с помощью критерия хи-квадрат.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Влияние экзогенного мелатонина при длительном действии (7 дней):**

**Электрофизиологические параметры *in vivo*.** Для оценки электрофизиологических параметров сердца крыс было проведено эпикардальное

картирование при синусном ритме для определения времени активации и при электрической стимуляции желудочков для оценки скорости проведения по миокарду.

Среднее время активации в правом желудочке было одинаковым в обеих группах (Рис. 1А), а в левом желудочке оно было меньше в группе животных, получавших мелатонин, по сравнению с контролем (Рис. 1А). Скорость проведения возбуждения по миокарду была выше в группе мелатонина по сравнению с контрольной группой как в левом, так и в правом желудочках (Рис. 1Б). Время прорыва волны возбуждения на эпикард правого желудочка, не различалось между контрольной группой и группой мелатонина (Рис. 1В).

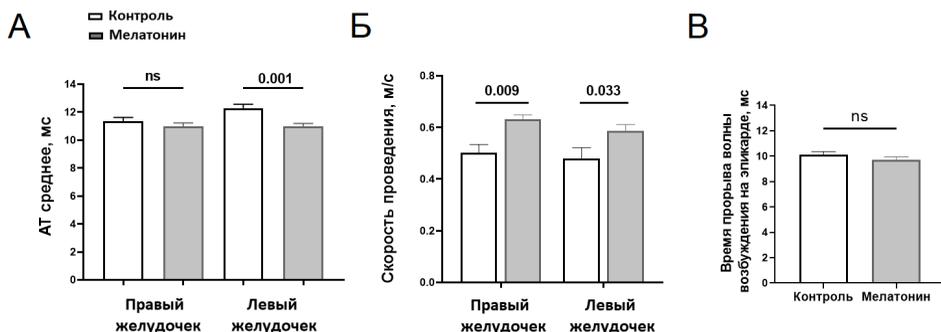


Рисунок 1 - Влияние мелатонина на активацию желудочков: время активации (А), скорость проведения возбуждения (Б), время эпикардиального прорыва активации в правом желудочке (В).

Укорочение времени активации у животных, получавших мелатонин, согласуется с данными исследования (Sedova et al., 2019), в котором также было продемонстрировано, что уменьшение времени активации было ключевым антиаритмическим эффектом мелатонина. Мы продемонстрировали, что у животных, получавших мелатонин, была большая скорость проведения возбуждения в сократительном миокарде, что свидетельствует о том, что укороченное время активации левого желудочка было связано с ускоренным проведением через сократительный миокард. В свою очередь, повышение скорости проведения в сократительном миокарде с помощью мелатонина может быть связано с его действием на коннексины и/или натриевые каналы.

### Оценка желудочковых аритмий в модели ишемия-реперфузия.

Желудочковая экстрасистолия развивалась во время окклюзии и реперфузии, особенно в первые минуты обеих фаз. При линейном регрессионном анализе частота возникновения экстрасистол была связана с длительностью интервала RR во время реперфузии (коэффициент регрессии  $-0,039$ , 95% ДИ  $-0,074 - -0,004$ ,  $p=0,027$ ), но не во время ишемии (коэффициент регрессии  $-0,018$ , 95% ДИ  $-0,044 - -0,008$ ,  $p=0,170$ ). Количество экстрасистол не различалось между группами как в период ишемии, так и в период реперфузии.

Установлено, что встречаемость реперфузионных ЖТ/ФЖ была ниже в группе животных, получавших мелатонин, чем в контрольной группе: 8 из 28 в группе мелатонина и 9 из 13 в контрольной группе (хи-квадрат 6,047,  $p=0,014$ ). В то же время длительный прием мелатонина не изменял экстрасистолическую нагрузку во время ишемии и реперфузии и, следовательно, не влиял на триггеры реентри. Таким образом, антиаритмическое действие мелатонина заключается только в модификации аритмогенного субстрата, в первую очередь, – с ускорением (поддержанием скорости) распространения активации.

**Деполаризирующий натриевый ток  $I_{Na}$  в кардиомиоцитах крыс при длительном воздействии мелатонина.** Кардиомиоциты крыс, получавших мелатонин, имели значительно более высокую плотность натриевого тока  $I_{Na}$  при  $-40$  мВ и  $-30$  мВ, чем в контрольной группе (Рис. 2).

Таким образом, усиление мелатонином тока  $I_{Na}$  является ключевым фактором, определяющим ускорение проведения в миокарде.

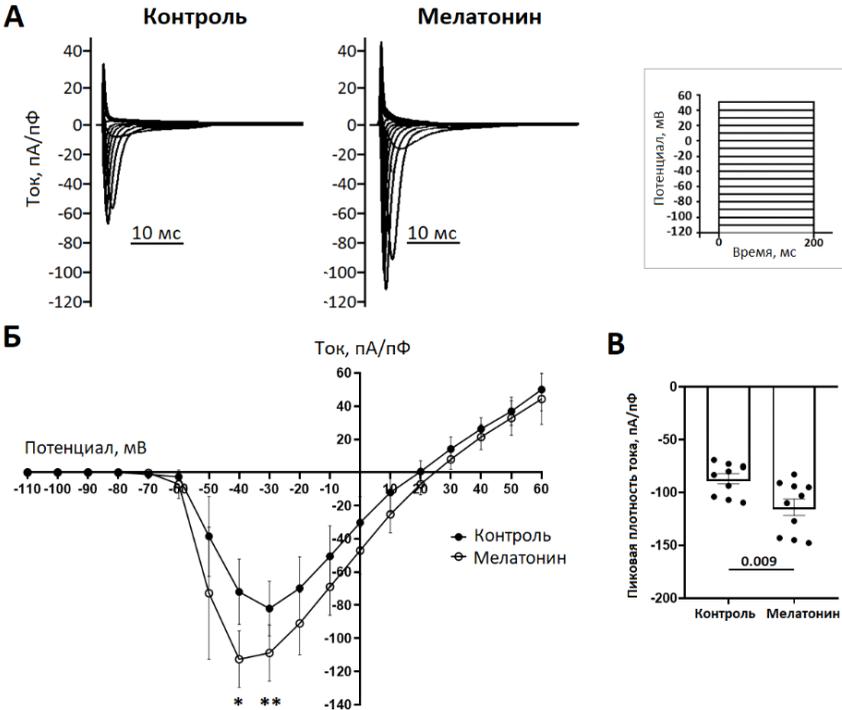


Рисунок 2 - Ток  $I_{Na}$  в желудочковых кардиомиоцитах крыс контрольной группы и у животных, получавших мелатонин в течение семи дней. А - Репрезентативные записи тока. Б - Вольтамперная характеристика тока, \*  $p=0,017$ , \*\*  $p=0,016$ . В - Пиковые плотности тока ( $-30$  мВ).

**Уровень мРНК транскриптов генов *Gjal*, *Scn5a* и *Scn1b* в миокарде желудочков при длительном воздействии мелатонина.** Было установлено, что у животных, получавших мелатонин, была повышена экспрессия всех трёх транскриптов генов в левом желудочке и генов *Scn5a* и *Scn1b* в правом желудочке (Рис. 3).

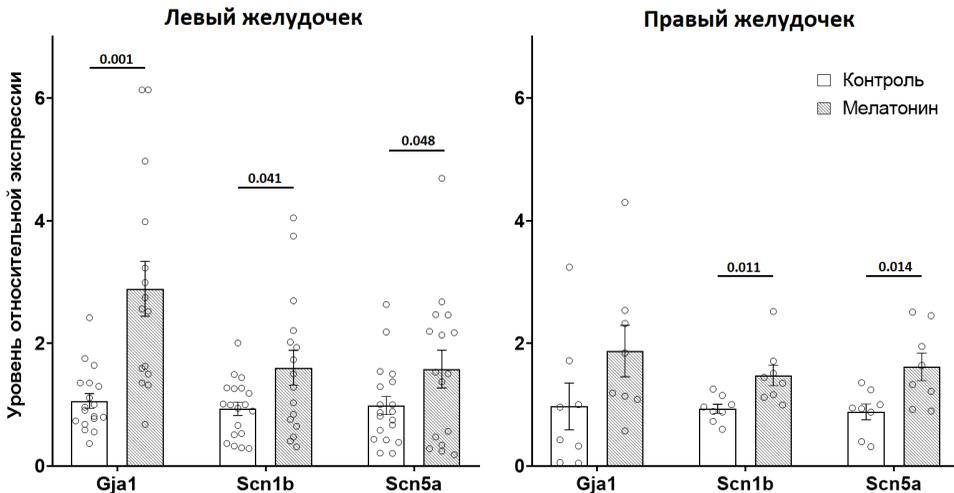


Рисунок 3 - Относительная экспрессия мРНК *Gjal*, *Scn1b* и *Scn5a* в левом и правом желудочках контрольных животных и животных, получавших мелатонин в течение 7 дней.

**Определение уровня экспрессии белков каналов *Cx43* (*Gjal*) и *Nav1.5* (*Scn5a*).** Установлено, что уровень белка *Cx43* не показал значимого повышения в группе мелатонина, что сильно отличалось от изменения экспрессии гена *Gjal* на уровне мРНК. Уровень белка *Nav1.5* канала был увеличен почти в той же степени, что и уровень мРНК (рис. 4).

Семидневное введение мелатонина привело к увеличению транскриптов генов натриевых каналов – *Scn5a* и *Scn1b* и увеличению экспрессии белка *Nav1.5*. Эти результаты предполагают, что ускорение проведения мелатонином было связано с активацией экспрессии натриевых каналов. Мы не наблюдали статистически значимых различий между животными, получавшими мелатонин и контрольными животными в отношении коннексинов на уровне белка несмотря на то, что экспрессия транскриптов генов *Gjal* была увеличена. Эти результаты позволяют нам исключить коннексины как функционально значимую мишень мелатонина, по крайней мере, в данной экспериментальной модели.

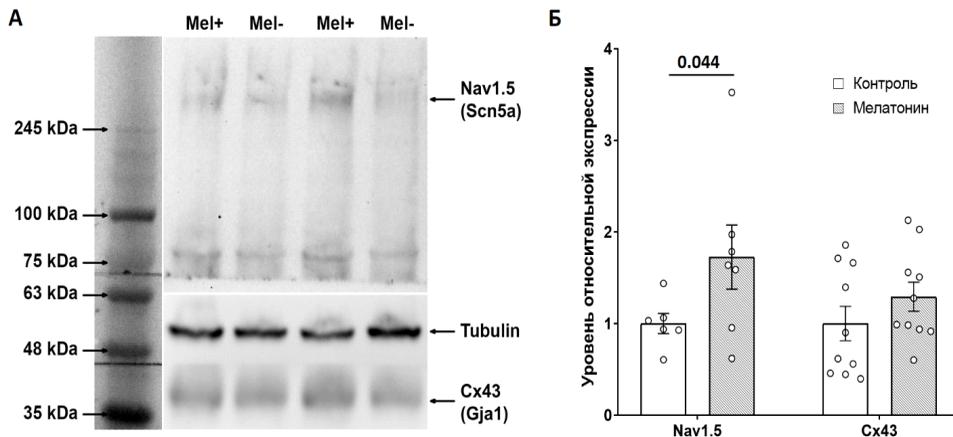


Рисунок 4 - Относительное количество белка натриевых каналов в миокарде контрольных животных и животных, получавших мелатонин в течение 7 дней. А - Репрезентативные блоты. Б - уровень относительной экспрессии белков Nav1.5 и Cx43.

#### Острые эффекты системного введения экзогенного мелатонина:

**Электрофизиологические параметры миокарда *in vivo*.** После введения исследуемых агентов время активации во время реперфузии было меньше в контрольной группе и группе мелатонина по сравнению с группами животных, которым вводили блокатор рецепторов мелатонина - лузиндол, в том числе в комбинации лузиндол+мелатонин (рис. 5А). Дисперсия реполяризации в группе мелатонина была значительно снижена по сравнению с контрольной группой и группой лузиндола во время реперфузии (рис. 5Б). Дисперсия реполяризации в группе лузиндол+мелатонин также была снижена по сравнению с контролем.

Частота реперфузионных ЖТ/ФЖ (рис. 5В) была ниже у животных, получавших мелатонин, по сравнению с контролем (2 из 12 и 13 из 17 животных в группе мелатонина и контроля соответственно). Блокада МТ1/МТ2-рецепторов лузиндолом отменяла антиаритмический эффект мелатонина (Luz+Mel: 9 из 11 животных). В логистическом регрессионном анализе случаи ЖТ и ЖТ/ФЖ были ассоциированы с временем активации желудочков во время реперфузии (для ЖТ: коэффициент регрессии 1,591, 95%, CI 1,061–2,386,  $p=0,025$ ; для ЖТ/ФЖ: коэффициент регрессии 1,695, 95%, CI 1,046–2,748,  $p=0,032$ ).

Введение блокатора мелатониновых рецепторов – лузиндола вызывало снижение продольной скорости проведения возбуждения CVL в нормальном миокарде (до развития ишемии) по сравнению с контрольной группой (Рис. 6). Ишемия вызывала замедление проведения импульса (как CVL, так и CVT) во всех группах, кроме группы животных, которым вводили мелатонин.

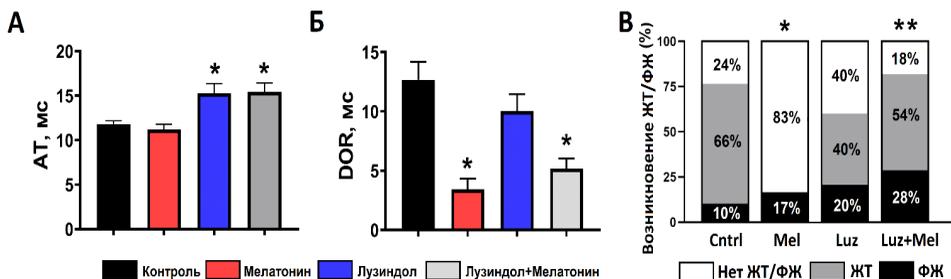


Рисунок 5 - Электрофизиологические параметры в левом желудочке во время реперфузии с введением мелатонина и блокатора мелатониновых рецепторов лузиндола. А - Время активации (АТ). Б – Дисперсия реполяризации (DOR). В - Частота аритмических событий - желудочковая тахикардия (ЖТ) и фибрилляции желудочков (ФЖ). \* $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой, \*\* $p < 0,05$  по сравнению с группой мелатонина.

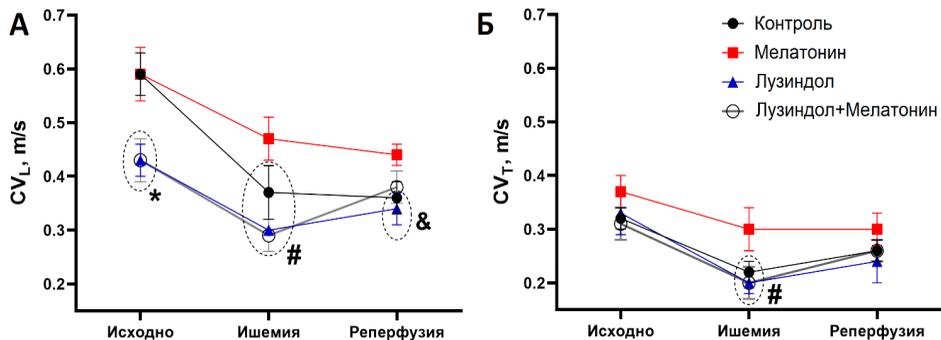


Рисунок 6 - Продольная (А, CVL) и поперечная (Б, CVT) скорость проведения возбуждения в левом желудочке при действии мелатонина и блокатора мелатониновых рецепторов лузиндола. \*  $p < 0,05$  лузиндол и лузиндол+мелатонин по сравнению с контролем в исходном состоянии; # $p < 0,05$  контроль, лузиндол и лузиндол+мелатонин на ишемии по сравнению с исходными значениями соответствующих групп; & $p < 0,05$  контроль и лузиндол по сравнению с исходными значениями соответствующих групп.

Применение блокатора МТ1/МТ2 рецепторов лузиндола в нашем исследовании отменяло антиаритмические свойства мелатонина. Это предполагает участие рецептор-опосредованного сигнального пути в антиаритмическом эффекте мелатонина.

Согласно логистическому регрессионному анализу, частота возникновения ЖТ/ФЖ была связана с задержкой времени активации, которую вызывал лузиндол, но не с укорочением дисперсии реполяризации мелатонином. Это наблюдение предполагает участие независимого от мелатониновых рецепторов механизма, лежащего в основе эффектов мелатонина на реполяризацию.

### Эффекты мелатонина *in vitro*:

**Натриевый ток.** Мы предполагали, что острое действие мелатонина может быть связано, как и в хронической модели, с натриевым током. Однако, ни мелатонин, ни лузиндол на него не повлияли. Величина натриевого тока  $I_{Na}$  не изменилась при пятиминутном действии 10 мкМ мелатонина (рис. 7А, 7Б) или 1 мкМ лузиндола (рис. 7В, 7Г), что позволило отвергнуть натриевый ток как мишень острого действия мелатонина.

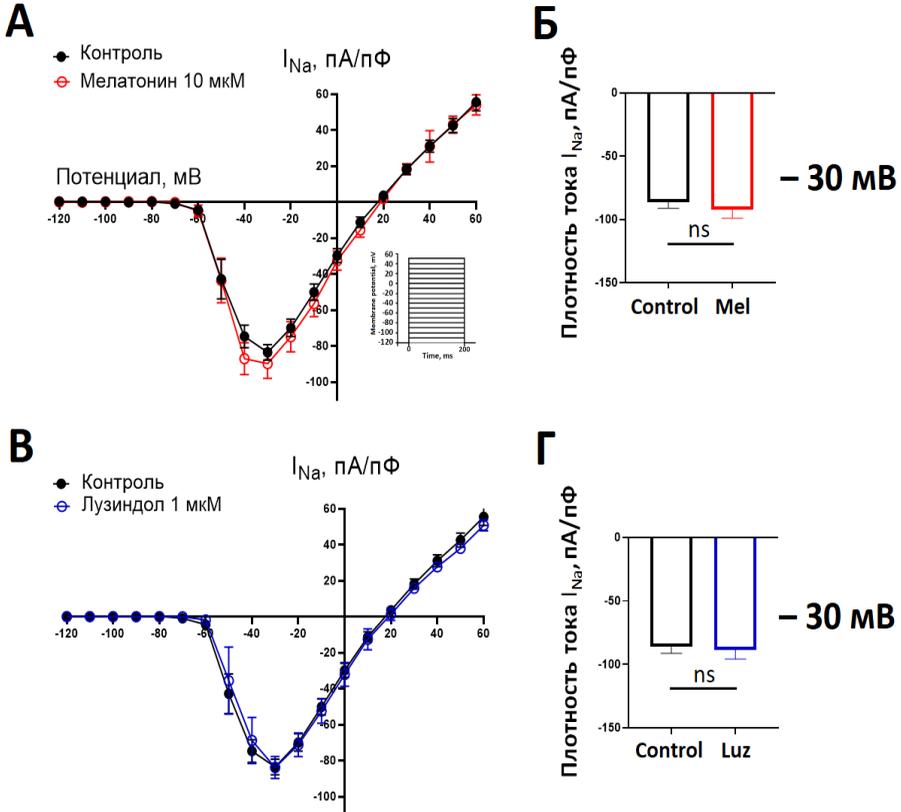


Рисунок 7 - Ток  $I_{Na}$  в желудочковых кардиомиоцитах крыс при действии 10 мкМ мелатонина (А, Б, Mel) и 1 мкМ лузиндола (В, Г, Luz). А и В - вольтамперные кривые. Б и Г - пиковые плотности тока.

**Калиевый ток.** При пятиминутном воздействии 10 мкМ мелатонина параметры тока  $I_{K1}$  не изменялись (рис. 8А, 8Б). Блокатор МТ1/МТ2-рецепторов лузиндол в концентрации 1 мкМ значительно снижал амплитуду тока  $I_{K1}$  (рис. 8В, 8Г).

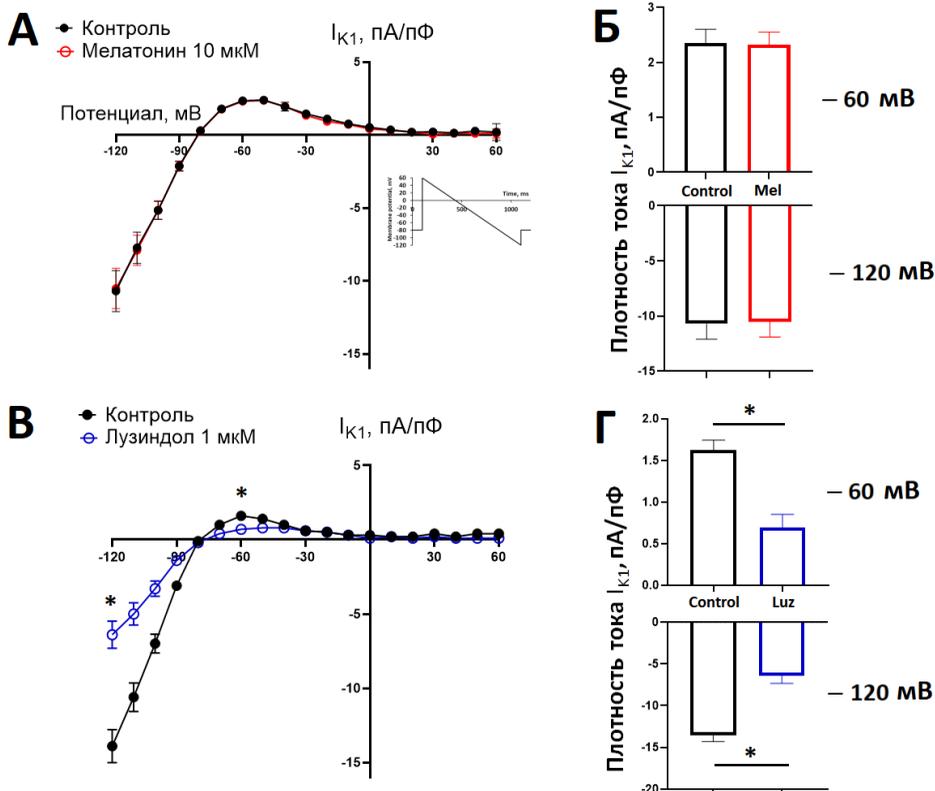


Рисунок 8 - Калиевый ток  $I_{K1}$  в кардиомиоцитах крыс при действии 10 мкМ мелатонина (Mel, панель А и Б) и 1 мкМ лузиндола (Luz, панель В и Г). А и В - вольтамперные кривые. Б и Г - пиковые плотности для выходящего (-60 мВ) и входящего (-120 мВ) компонентов тока. \*  $p < 0,001$  по сравнению с контролем.

При регистрации калиевого тока  $I_{K1}$  в кардиомиоцитах крыс мы не наблюдали изменений при остром действии мелатонина, но блокада рецепторов  $MT1/MT2$  лузиндолом значительно снижала амплитуду тока  $I_{K1}$ , что подтверждает участие рецептор-зависимой передачи сигналов в наблюдаемых эффектах мелатонина и лузиндола.

**Потенциал действия.** Было установлено, что при пятиминутном воздействии мелатонина длительность потенциала действия желудочковых кардиомиоцитов не изменялась. В то же время лузиндол деполаризовал потенциал покоя с  $-73 \pm 2$  мВ до  $-63 \pm 2$  мВ ( $p = 0,008$ ) и вызывал увеличение продолжительности потенциала действия при 50% и 90% реполяризации с  $24 \pm 5$  мс до  $148 \pm 28$  мс ( $p < 0,001$ ) и с  $68 \pm 8$  мс до  $219 \pm 29$  мс ( $p < 0,001$ ), соответственно.

Поскольку уровень потенциала покоя влияет на инактивацию натриевого тока, сохранение потенциала покоя на относительно гиперполяризованном уровне поддерживает доступность натриевых каналов, что, в свою очередь, способствует проведению импульса. Это дает объяснение наблюдаемых эффектов мелатонина и лузиндола на скорость проведения возбуждения.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Наши данные и ранее опубликованные работы показывают, что антиаритмическое действие мелатонина связано с влиянием на электрофизиологические мишени, в частности на активацию желудочков. В настоящем исследовании продемонстрированы ранее неизвестные эффекты. Хроническое введение мелатонина (7 дней) повышает экспрессию натриевых каналов и увеличивает ток натрия в кардиомиоцитах крыс, что лежит в основе его антиаритмических свойств, проявляющихся при ишемии и ишемии-реперфузии. Особенности эффектов мелатонина в здоровом и больном сердце требуют дальнейшего изучения. Его положительное влияние ожидается при нарушении проведения импульса в результате приобретенных состояний или врожденных заболеваний. Доказано, что при остром применении антиаритмическое действие мелатонина реализуется через сигнальный путь, зависящий от рецепторов MT1 и MT2, так как блокада этих рецепторов лузиндолом устраняет антиаритмический эффект мелатонина. Показано, что калиевый ток IK1, поддерживающий потенциал покоя, является ключевой мишенью острого действия мелатонина.

Таким образом, результаты наших исследований и данные литературы показывают, что мелатонин обладает рядом положительных эффектов (электрофизиологических, антиоксидантных, симпатолитических), которые потенциально могут подавлять реентри-аритмогенез. Настоящая работа продемонстрировала, что основным эффектом, лежащим в основе антиаритмического действия мелатонина, является модификация аритмогенного субстрата за счет поддержания относительно высокой скорости проведения импульса в миокарде (рис. 9).



Рисунок 9 - Схематическое изображение действия мелатонина на электрофизиологические мишени миокарда, важные для развития реентри-аритмий. Незакрашенные и заштрихованные блоки обозначают эффективные и неэффективные мишени, соответственно, согласно исследованиям (Sedova et al., 2019; Durkina et al., 2021; Durkina et al., 2023). Приведено с изменениями по Durkina et al., 2021.

## ВЫВОДЫ

### 1. Длительное влияние экзогенного мелатонина

1.1. Мелатонин приводит к уменьшению продолжительности активации желудочков сердца, что связано с ускорением проведения возбуждения через сократительный миокард.

1.2. Под действием мелатонина происходит увеличение быстрого натриевого тока  $I_{Na}$  в кардиомиоцитах крыс, что определяет увеличение скорости проведения по миокарду. Мелатонин повышает экспрессию белка порообразующей субъединицы натриевых каналов ( $Nav1.5$ ), а также уровень мРНК транскриптов генов, кодирующих субъединицы натриевых потенциал-зависимых каналов – *Scn5a* и *Scn1b*. Несмотря на то, что экспрессия транскриптов гена *Gjal* в миокарде

желудочков повышается при длительном введении мелатонина, уровень белка коннексина *Cx43* не изменяется.

1.3. Мелатонин приводит к снижению частоты возникновения жизнеугрожающих желудочковых тахикардий (желудочковая тахикардия и фибрилляция желудочков) в модели ишемия-реперфузия. Экстрасистолическая нагрузка под влиянием мелатонина не изменяется.

## **2. Кратковременное влияние экзогенного мелатонина**

2.1. Мелатонин препятствует замедлению проведения возбуждения в миокарде крыс во время ишемии, уменьшает время активации и дисперсию реполяризации миокарда во время реперфузии.

2.2. Мелатонин непосредственно не влияет ни на быстрый натриевый ток  $I_{Na}$ , ни на калиевый ток входящего выпрямления  $I_{K1}$  в кардиомиоцитах крыс. Тем не менее, блокада мелатониновых рецепторов MT1/MT2 лузинолом снижает амплитуду тока  $I_{K1}$ .

2.3. В модели ишемии-реперфузии острое введение мелатонина крысам приводит к снижению частоты возникновения реперфузионной желудочковой тахикардии и фибрилляции желудочков. Механизмы острого антиаритмического эффекта мелатонина связаны с сигнальным путем, зависящим от рецепторов MT1/MT2.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Статьи в журналах в иностранных базах данных:**

1. **Durkina, A.V.** Melatonin pretreatment does not modify extrasystolic burden in the rat ischemia-reperfusion model / **A.V. Durkina**, O.G. Bernikova, N.J. Mikhaleva, N.M. Paderin, K.A. Sedova, M.A. Gonotkov, V.S. Kuzmin, J.E. Azarov // Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society. - 2021. - V.72. - № 1. - P. 141-148. **WoS, Scopus, PubMed.**

2. **Durkina, A.V.** Melatonin treatment improves ventricular conduction via upregulation of Nav1.5 channel proteins and sodium current in the normal rat heart / **A.V. Durkina**, O.G. Bernikova, M.A. Gonotkov, N.J. Mikhaleva, K.A. Sedova, I.A. Malyxhina, V.S. Kuzmin, I.O. Velegzhaninov, J.E. Azarov // Journal of pineal research. - 2022. - V.73. - № 1. - P. 1-13. **WoS, Scopus, PubMed.**

3. **Durkina, A.V.** Blockade of Melatonin Receptors Abolishes Its Antiarrhythmic Effect and Slows Ventricular Conduction in Rat Hearts / **A.V. Durkina**, B. Szeiffova Bacova, O.G. Bernikova, M.A. Gonotkov K.A. Sedova, J. Cuprova, M.A. Vaykshnorayte, E.R. Diez, N.J. Prado, J.E. Azarov // International Journal of Molecular Science. - 2023. - V.24. - № 15. - P. 1-16. **WoS, Scopus, PubMed.**

### **Другие публикации в научных изданиях:**

1. **Дуркина А.В.** Длительное применение мелатонина ускоряет процессы активации миокарда / Дуркина А.В., Берникова О.Г., Седова К.А., Азаров Я.Э. // Материалы VII Всероссийской с международным участием школы-конференции

«Физиология и патология кровообращения», Москва, 3-6 февраля 2020 года – М.: РА «ИЛЬФ», 2020. - С. 159-160.

2. **Durkina A.V.** Long-term melatonin treatment accelerates myocardial activation processes / Durkina A.V., Bernikova O.G., Sedova A.K., Azarov J.E. // 4<sup>th</sup> Wroclaw Scientific Meetings, 9-10 October 2020. - Wroclaw: Wydawnictwo Naukowe. - 2020. - P. 103-104.

3. **Durkina A.** Melatonin Treatment Does Not Modify Ectopic Activity During Ischemia and Reperfusion in Rats / Durkina A., Bernikova O., Mikhaleva N., Paderin N., Gudyreva J., Mamedova T., Sedova K., Gonotkov M., Kuzmin V., Azarov J. // The FASEB Journal. Special Issue: Experimental Biology 2021 Meeting Abstracts, May 2021. - Vol. 35. - P. 1.

4. Gonotkov M.A. Melatonin receptor blockade slows ventricular conduction by IK1 downregulation / Gonotkov M.A., **Durkina A.V.**, Bernikova O.G., Azarov J. // European Heart Journal. - Vol. 42, Issue Supplement 1. - October 2021. - ehab724.3206.

5. **Дуркина А.В.** Лечение мелатонином улучшает проведение миокарда путем повышения регуляции натриевого тока в сердце крыс / Дуркина А.В., Берникова О.Г., Гонотков М.А., Михалева Н.Я., Седова К.А., Малыхина И.А., Кузьмин В.С., Велегжанинов И.О., Азаров Я.Э. // Материалы IV Всероссийской (XIX) молодежной научной школы-конференции «Молодежь и наука на Севере – 2022» (В 2-х томах). Том I. Сыктывкар, 21-25 марта 2022 г. – Сыктывкар: ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, 2022. - С. 234.

6. **Дуркина А.В.** Влияние мелатонина на электрофизиологические характеристики миокарда сердца крыс при старении / Дуркина А.В., Миннебаева Е.В., Гонотков М.А., Азаров Я.Э., Берникова О.Г. // Материалы четвертой молодежной школы-конференции «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций», Звенигород, 15-17 сентября 2023 г. - М.: Издательство «Наука», 2023. – С. 28-29.

### **Благодарности**

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю доктору биологических наук, доценту Азарову Яну Эрнестовичу за мотивацию и всестороннюю поддержку. Автор бесконечно благодарен Берниковой Олеся Геннадьевне и Гоноткову Михаилу Анатольевичу за совместное проведение экспериментов и неоценимую помощь в обсуждении результатов исследований. Автор выражает признательность всем сотрудникам лаборатории физиологии сердца за поддержку и помощь на всех этапах работы.





Подписано в печать 03.02.2025  
Компьютерный набор. Гарнитура Times New Roman. Формат 60x90<sup>1/16</sup>.  
Бум. IQ allround. Отпечатано на ризографе. Усл. печ. л. 1.0.  
Тираж 100. Заказ 161.

Информационно-издательский отдел  
Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской  
академии наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Федерального исследовательского центра «Коми научный центр Уральского  
отделения Российской академии наук»  
(ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН).

Республика Коми, г. Сыктывкар, ГСП-2, 167982,  
г. Сыктывкар, ул.Первомайская, д.50