

УДК 612.179.1:616-092.9

ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕРИРОВАНИЯ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ HCN-КАНАЛОВ У КЛЕТОК ПРАВОГО ПРЕДСЕРДИЯ 13-ДНЕВНЫХ ЭМБРИОНОВ КУРИЦЫ И МЫШИ

Лебедева Е.А., Гонотков М.А., Головки В.А.

Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, e-mail: lebedeva.physiol.komisc@ya.ru

Ток, активируемый гиперполяризацией (I_p), протекающий по HCN-каналам, участвует в формировании фазы медленной диастолической деполяризации у клеток водителя ритма синоаурикулярной области сердца взрослых млекопитающих. Однако функциональный вклад HCN-каналов в генерирование электрических импульсов в эмбриональном сердце остается до конца не ясным. В данной работе с помощью микроэлектродной техники и фармакологического анализа оценен вклад HCN-каналов в генерацию электрических импульсов клеток правого предсердия у эмбрионов курицы и мыши. Анализ эффектов ионов цезия (2 мМ) и ивабрадина (3 мкМ) у клеток эмбрионов мыши показал, что экспозиция этих блокаторов уменьшает частоту генерации потенциалов действия в среднем на 30% за счет увеличения длительности фазы диастолической деполяризации (фаза 4). Тогда как ингибирование HCN-каналов у клеток синоаурикулярной области куриного эмбриона не приводит к отрицательному хронотропному эффекту. Заключаем, что на данном этапе эмбриогенеза HCN-каналы в миокарде эмбрионов мыши играют более, а у куриных эмбрионов – менее важную роль в формировании медленной диастолической деполяризации и регуляции частоты спонтанных сокращений.

Ключевые слова: ивабрадин, ионы цезия, сердце эмбриона, ток, активируемый гиперполяризацией, мышца, курица

PECULIARITIES OF SPONTANEOUS ACTIVITY GENERATION AT HCN-CHANNELS INHIBITION IN RIGHT ATRIUM CELLS OF 13-DAY-OLD EMBRYONIC CHICK AND MOUSE

Lebedeva E.A., Gonotkov M.A., Golovko V.A.

Institute of Physiology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, FRC Komi SC UB RAS, Syktyvkar, e-mail: lebedeva.physiol.komisc@ya.ru

Hyperpolarization-activated current (I_f), formed by HCN – channels, is supposed to be important for the regulation and the generation of spontaneous activity in sinoatrial nodal myocytes of adult mammals. However, the contribution HCN – channels to cellular mechanism that initiate and regulate this process in embryonic heart are not yet well understood. In this study using microelectrode technique and pharmacological analysis we investigated the role HCN-channel to the generation of spontaneous activity in the right atrial cells of mouse and chicken embryos. We studied the effects of cesium (2 mM) and ivabradine (3 μ M) and demonstrated that these blockers decreases the generation of action potential by 30% by increasing the duration phase 4 in embryonic cells of the mouse. In contrast, inhibition of the HCN-channel in embryo chick cells did not lead to a negative chronotropic effect. We conclude that, at this stage of embryonic development, the HCN-channel in the myocardium of mouse embryos play a more important role in the formation of slow diastolic depolarization and regulation of spontaneous rate than in chicken embryos.

Keywords: ivabradine, cesium, embryo heart, hyperpolarization-activated current (I_f), mouse, chicken

Ток, активируемый гиперполяризацией (I_p), или «funny» ток, протекающий по чувствительным к циклическим нуклеотидам катионным каналам (hyperpolarization – activated cyclic nucleotide gated channels) HCN, участвует в формировании фазы медленной диастолической деполяризации (пейсмекерный потенциал, фаза 4) у клеток водителя ритма синоаурикулярной (СА) области сердца взрослых млекопитающих [1, 2]. Мутации в генах, кодирующих HCN-каналы, вызывают брадикардию, но не приводят к подавлению спонтанной электрической активности в СА области [3, 4]. Однако функциональный вклад HCN-каналов в генерирование электрических импульсов в эмбриональном сердце остается неясным. Представления о роли ионных токов в мио-

карде эмбрионов сложились на основе работ, выполненных на изолированных клетках желудочков куриных эмбрионов [5; 6] и культурах эмбриональных стволовых клетках млекопитающих [7]. Использование различных объектов и методик стало причиной значительного расхождения в экспериментальных данных [6]. Так, ряд авторов придерживаются мнения, что ток I_f играет ведущую роль в автоматизме в эмбриональном сердце [8], другие считают, что в основе спонтанных сокращений лежат входящие Ca^{2+} -токи [9] или « Ca^{2+} -часы» [10]. В связи с этим существует необходимость в проведении исследований на ткани правого предсердия эмбрионального миокарда – зоны, в которой возникает электрическая активность. Использование многоклеточных препаратов позволяет со-

хранить электрическое взаимодействие между клетками, приблизить условия эксперимента к естественным, что обеспечит более полное понимание механизмов возникновения электрических импульсов в эмбриональном миокарде [11].

Цель исследования: с помощью ингибированного анализа и микроэлектродной техники оценить функциональный вклад HCN-каналов в формирование электрической активности клеток водителя ритма правого предсердия у эмбрионов курицы и мыши. В качестве ингибиторов HCN-каналов использовали ионы цезия и ивабрадин. Однако применение Cs⁺ имеет некоторые ограничения ввиду его способности блокировать выходящие K⁺-токи. Ивабрадин широко применяется в клинической практике, но его эффект может зависеть от величины максимального диастолического потенциала и частоты генерации ПД [12]. Поэтому для получения более точных результатов мы использовали оба блокатора.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили на эмбрионах курицы и мыши в возрасте 12–14 суток. Экспериментальный протокол соответствовал международным правилам «Для использования лабораторных животных» (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8-е издание, опубликованное National Academies Press (US) 2011 г.). Сердце извлекали и помещали в раствор Тироде следующего состава (мМ/л): 140 NaCl; 10 NaHCO₃; 5,4 KCl; 1,8 CaCl₂; 1 MgSO₄; 0,33 Na₂HPO₄; 10 глюкоза; 5 NEPEs (pH 7,4); удаляли желудочки и левое предсердие, правое предсердие вскрывали. Спонтанно сокращающийся препарат, размер которого не превышал 1×1 мм, помещали в проточную, аэрируемую, термостатируемую камеру с раствором Тироде (31 °С). Потенциалы действия регистрировали с помощью стандартной микроэлектродной техники со стороны субэндокарда. В качестве ингибиторов тока I_f использовали ионы цезия (2мМ) и ивабрадин (3 мкМ). Обработка результатов проводилась в программе PowerGraph Professional версия 3.3 (Dlsoft, Россия) и с помощью оригинальных программ вычисления параметров потенциалов в программной среде Delphy, разработанных с.н.с., д.б.н. Н.В. Артеевой. Данные приведены как среднее арифметическое ± стандартное отклонение (M ± σ). Значимость различий определяли по U-критерию Манна – Уитни. Различия считали достоверными при p < 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

На сопоставимых сроках эмбрионального развития в контрольном растворе Тироде (31 °С) у клеток правого предсердия эмбрионов курицы и мыши зарегистрированы потенциалы действия (ПД) с фазой медленной диастолической деполяризации (МДД). Анализ основных параметров потенциалов действия выявил, что клетки данного типа у эмбрионов курицы и мыши отличаются

по ряду электрофизиологических характеристик (табл. 1, рис. 1). Частота генерации спонтанных импульсов составила 135 ± 16 и 173 ± 22 имп/мин у препаратов правого предсердия мыши и курицы соответственно. Это различие обусловлено более продолжительной фазой МДД у клеток водителя ритма мыши по сравнению с куриными эмбрионами.

Таблица 1

Электрофизиологические параметры потенциалов действия клеток правого предсердия эмбрионов мыши и курицы

Параметры ПД	Эмбрион мыши	Эмбрион курицы
	n=10	n=15
E _{max} , мВ	-63±9	-74±8*
АПД, мВ	80±11	98±10**
ПП, мВ	-51±9	-66±9
ДПД ₂₀ , мс	38±10	42±19
ДПД ₁₀₀ , мс	131±54	122±24
МДД, мс	319±62	231±45**
ЧСС, имп/мин	135±16	173±22**
dV/dt _{max} , В/с	44±16	109±36**
V ₄ , мВ/с	39±16	37±17
V ₃ , В/с	-1,5±0,5	-2,3±0,6*

Примечание. E_{max} – максимальный диастолический потенциал; АПД – амплитуда ПД; ПП – потенциал порога; ДПД₂₀ и ДПД₁₀₀ – длительность потенциала действия на уровне 20 и 100% реполяризации; ЧСС – частота генерации ПД; МДД – длительность медленной диастолической деполяризации; dV/dt_{max} – скорость фазы быстрой деполяризации; V₄ – скорость фазы конечной реполяризации; V₃ – скорость фазы медленной диастолической деполяризации. n – количество препаратов. * p < 0,05 и ** p < 0,01 – достоверность различий по сравнению с эмбрионами мыши.

Эффекты ионов цезия и ивабрадина на генерацию ПД у эмбрионов мыши

При аппликации Cs⁺ (2 мМ, n = 4) в перфузирующий раствор зарегистрировано удлинение МДД на 45%, что приводило к замедлению ЧСС на 26%. У 75% препаратов наблюдалось замедление скорости фазы МДД (V₄) на 40% (табл. 2; рис. 2, А). В 25% случаях экспозиция цезия инициировала аритмию (рис. 2, Б). Эффекты ивабрадина (3 мкМ, n = 4) были сопоставимы с эффектами ионов цезия. Аппликация ивабрадина вызывала снижение частоты генерации ПД на 31% за счет увеличения длительности МДД на 50% (табл. 2; рис. 2, Б). Остальные параметры ПД достоверно не изменялись.

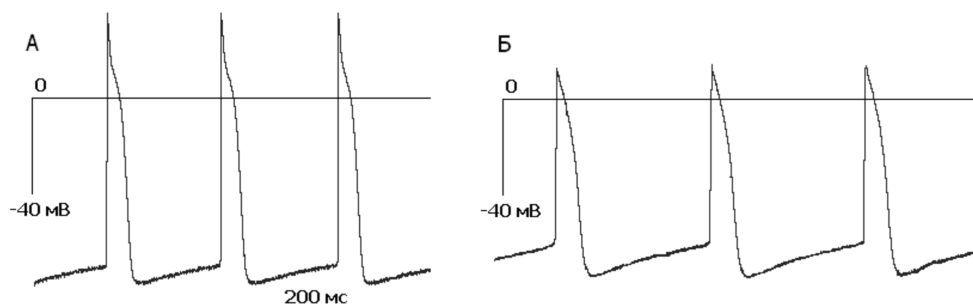


Рис. 1. Конфигурация потенциалов действия в контрольном растворе Тироде клеток водителя ритма правого предсердия у эмбрионов курицы (А) и мыши (Б) на 12–14 сутках эмбрионального развития

Таблица 2

Эффекты ионов цезия и ивабрадина на параметры ПД клеток правого предсердия у эмбрионов мыши

Параметры ПД	Контроль n = 4	Cs ⁺ 2 мМ n = 4	Контроль n = 4	Ивабрадин 3 мкМ n = 4
E _{max} , мВ	-77 ± 13	-74 ± 19	-70 ± 13	-66 ± 8
АПД, мВ	91 ± 19	89 ± 22	88 ± 18	88 ± 16
ДПД ₁₀₀ , мс	156 ± 49	166 ± 56	123 ± 4	141 ± 27
МДД, мс	474 ± 174	682 ± 226*	593 ± 111	875 ± 51*
ЧСС, имп/мин	102 ± 27	75 ± 20*	85 ± 13	59 ± 3*
dV/dt _{max} , В/с	71 ± 59	72 ± 60	56 ± 20	43 ± 17
V ₄ , мВ/с	25 ± 17	16 ± 7	19 ± 8	17 ± 8

Примечание. * p < 0,05 – достоверность различий по сравнению с соответствующим контролем.

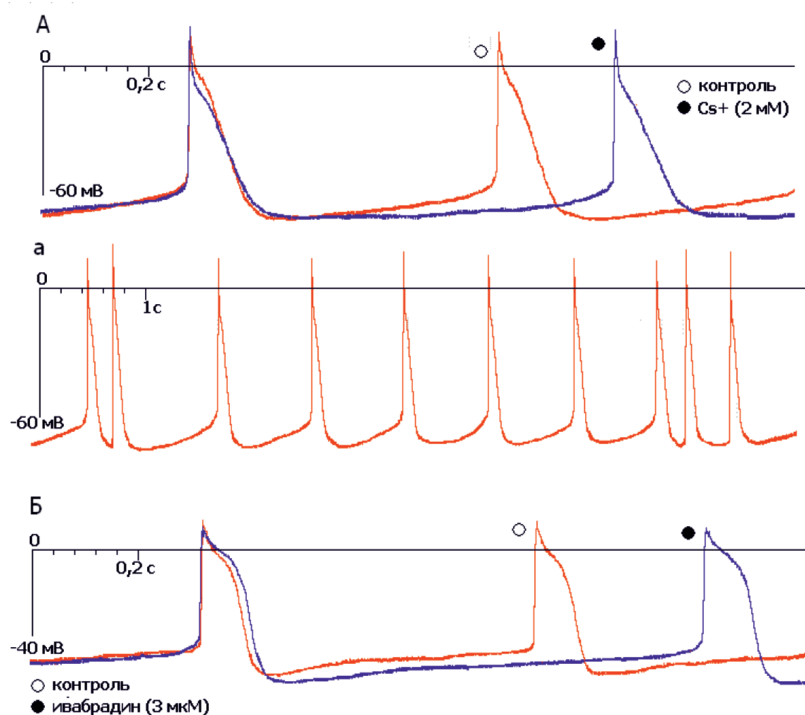


Рис. 2. Изменение конфигурации ПД при ингибировании каналов тока I_T у клеток правого предсердия эмбриона мыши. А – эффекты ионов цезия (2 мМ); а – нарушения генерации ПД, зарегистрированные при добавлении Cs⁺; Б – эффекты ивабрадина (3 мкМ)

Таблица 3

Эффекты ионов цезия и ивабрадина на параметры ПД клеток правого предсердия куриного эмбриона

Параметры ПД	контроль n = 6	Cs ⁺ 2 мМ n = 6	контроль n = 5	Ивабрадин 3 мкМ n = 5
E _{max} , мВ	-81 ± 7	-77 ± 8	-77 ± 7	-78 ± 9
АПД, мВ	109 ± 6	96 ± 13	105 ± 12	101 ± 11
ДПД ₁₀₀ , мс	137 ± 26	133 ± 28	102 ± 21	110 ± 19
МДД, мс	265 ± 17	215 ± 28*	305 ± 65	316 ± 53
ЧСС, имп/мин	150 ± 7	173 ± 11*	150 ± 18	142 ± 16
dV/dt _{max} , В/с	110 ± 15	80 ± 24	97 ± 19	92 ± 18
V ₄ , мВ/с	36 ± 28	42 ± 29	41 ± 10	41 ± 9

Примечание. *p < 0,05 – достоверность различий по сравнению с соответствующим контролем.

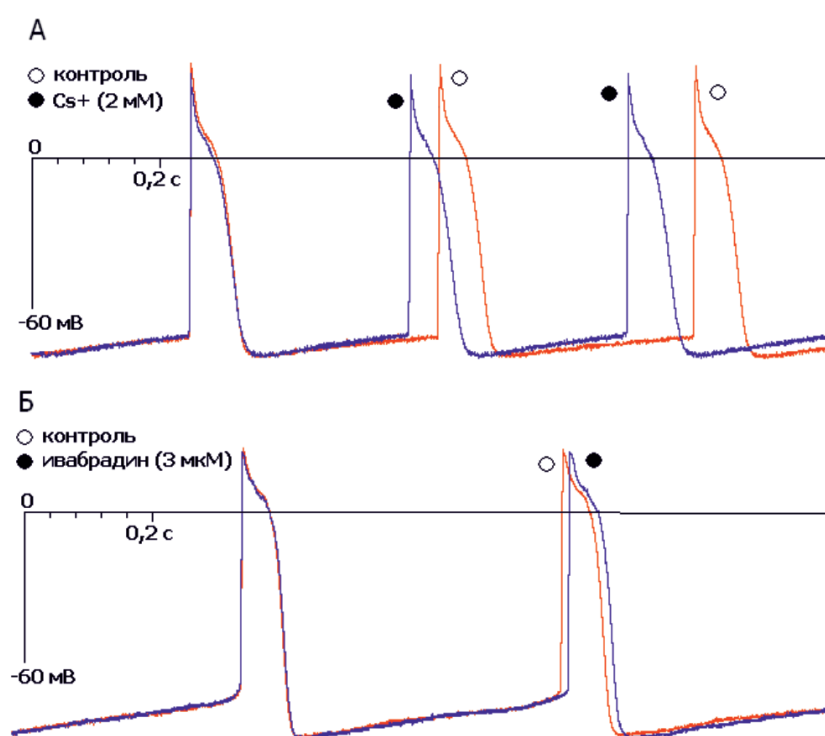


Рис. 3. Изменение конфигурации ПД при ингибировании каналов тока I_r у клеток правого предсердия куриного эмбриона. А – эффекты ионов цезия (2 мМ); Б – эффекты ивабрадина (3 мкМ)

Эффекты ионов цезия и ивабрадина на генерацию ПД у куриных эмбрионов

У клеток правого предсердия куриного эмбриона экспозиция Cs⁺ (2 мМ, n = 6) приводила к увеличению частоты генерации ПД на 15% за счет укорочения фазы МДД на 25%. При экспозиции ивабрадина (3 мкМ, n = 5) достоверных изменений в конфигурации электрофизиологических параметров ПД у данного типа клеток не зарегистрировано (табл. 3, рис. 3).

Таким образом, в настоящей работе установлено, что на сопоставимых сроках эмбрионального развития (12–14 сутки) ингибирование HCN-каналов вызывает разные эффекты на генерацию электрических импульсов у эмбрионов курицы и мыши.

Экспозиция блокаторов HCN-каналов у клеток водителя ритма правого предсердия эмбрионов мыши приводила к замедлению частоты спонтанных сокращений в среднем на 30%, что сопоставимо с ранее полученными данными на изолированных

клетках желудочков эмбрионов [9, 10] и эмбриональных стволовых клетках мыши [7]. Аналогичный эффект зарегистрирован на изолированных препаратах синоаурикулярной области взрослых мышей: экспозиция цезия замедляла частоту генерации ПД на 35% [13], а ивабрадина – на 24% [14]. У новорожденных мышей различий в плотности тока I_f и в экспрессии HCN-каналов не обнаружено [15]. Все это позволяет заключить, что ток I_f , протекающий по HCN-каналам, возникает в момент появления первых электрических импульсов в сердце мыши (8,5 сутки) [9] и его вклад в автоматизм сохраняется в период эмбриогенеза, а также в постнатальном периоде. Это свидетельствует о важности тока I_f для формирования пейсмекерного потенциала в клетках СА узла мыши на всех этапах онтогенеза.

Полученные ранее результаты исследований клеточных механизмов автоматизма сердца куриных эмбрионов более неоднозначны. Известно, что ток I_f был зарегистрирован в изолированных клетках предсердия и желудочка сердца куриного эмбриона и диапазон его активации составил от -120 до -90 мВ. Однако такое значение максимального диастолического потенциала (E_{\max}) нетипично для клеток правого предсердия куриного эмбриона в нормальных физиологических условиях. Авторы заключили, что I_f лежит в основе спонтанной деполяризации, которая наблюдается в клетках желудочка в течение первой недели эмбрионального развития. Однако в клетках предсердия ток I_f не является существенным фактором, лежащим в основе спонтанной активности [5].

Наши данные, полученные на основе ингибиторного анализа, продемонстрировали, что у клеток правого предсердия куриного эмбриона ионы цезия и ивабрадин не вызывали достоверного отрицательного хронотропного эффекта на генерацию ПД. Можно предположить, что HCN-каналы не являются функционально активными на данном этапе онтогенеза и, следовательно, ток I_f не играет существенной роли в инициации электрических импульсов.

Заключение

Таким образом, клетки правого предсердия куриных и мышинных эмбрионов продемонстрировали разную чувствительность к блокаторам HCN-каналов. Вклад тока I_f у эмбрионов мыши в частоту генерирования электрических импульсов составляет ~30%. У куриных эмбрионов на данном этапе эмбрионального развития ток I_f не является функционально важным и не уча-

ствует в формировании фазы пейсмекерного потенциала (фаза 4). Заключаем, что на данном этапе эмбриогенеза HCN-каналы в миокарде эмбрионов мыши играют более, а у куриных эмбрионов – менее важную роль в формировании медленной диастолической деполяризации и регуляции частоты спонтанных сокращений.

Работа поддержана грантом РФФИ мол_а № 18-34-00654.

Список литературы

1. DiFrancesco D. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ. Res.* 2010. vol. 106. P. 434–446. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.208041.
2. Yaniv Y., Maltsev V.A., Ziman B.D., Spurgeon H.A., Lakatta E. G. The «funny» current (I(f)) inhibition by ivabradine at membrane potentials encompassing spontaneous depolarization in pacemaker cells. *Molecules.* 2012. vol. 17. no. (7):8241–54. DOI: 10.3390/molecules17078241.
3. Nof E., Glikson M., Antzelevitch C.J. Genetics and Sinus Node Dysfunction. *Atr Fibrillation.* 2009. vol. 1. no. 6. P. 28–35. DOI: 10.4022/jafib.151.
4. Roubille F., Tardif J.C. New therapeutic targets in cardiology: heart failure and arrhythmia: HCN channels. *Circulation.* 2013. vol. 127. no. 19. P. 1986–1996. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000145.
5. Brochu R.M., Clay J.R., Shrier A. Pacemaker current in single cells and in aggregates of cells dissociated from the embryonic chick heart. *J. Physiol.* 1992. vol. 454. P. 503–515.
6. Krogh-Madsen T., Schaffer P., Skriver A.D., Taylor L.K., Pelzmann B., Koidl B., Guevara M.R. An ionic model for rhythmic activity in small clusters of embryonic chick ventricular cells. *Am. J. Physiol Heart Circ Physiol.* 2005. vol. 289. no. 1. P. 398–413. DOI: 10.1152/ajpheart.00683.2004.
7. Barbuti A., Crespi A., Capilupo D., Mazzocchi N., Baruscotti M., DiFrancesco D. Molecular composition and functional properties of f-channels in murine embryonic stem cell-derived pacemaker cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2009. vol. 46. no. 3. P. 343–351. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2008.12.001.
8. Harzheim D., Pfeiffer K.H., Fabritz L., Kremmer E., Buch T., Waisman A., Kirchhof P., Kaupp U.B., Seifert R. Cardiac pacemaker function of HCN4 channels in mice is confined to embryonic development and requires cyclic AMP. *EMBO J.* 2008. vol. 27. no. 4. P. 692–703. DOI: 10.1038/emboj.2008.3.
9. Liang H., Halbach M., Hannes T., Fleischmann B.K., Tang M., Schunkert H., Hescheler J., Reppel M. Electrophysiological basis of the first heart beats. *Cell Physiol Biochem.* 2010. vol. 25. no. 6. P. 561–570. DOI: 10.1159/000315075.
10. Wang P., Tang M., Gao L., Luo H., Wang G., Ma X., Duan Y. Roles of I(f) and intracellular Ca²⁺ release in spontaneous activity of ventricular cardiomyocytes during murine embryonic development. *J Cell Biochem.* 2013. vol. 114. no. 8. P. 1852–1862. DOI: 10.1002/jcb.24527.
11. Ophhof T. Embryological development of pacemaker hierarchy and membrane currents related to the function of the adult sinus node: implications for autonomic modulation of biopacemakers. *Med Biol Eng Comput.* 2007. vol. 45. no. 2. P. 119–132. DOI: 10.1007/s11517-006-0138-x.
12. Thollon C., Bedut S., Villeneuve N., Coge F. Use dependent inhibition of hHCN4 by ivabradine and relationship with reduction in pacemaker activity. *Br. J. Pharmacol.* 2007. vol. 150. P. 37–46. DOI: 10.1038/sj.bjpp.0706940.
13. Liu J., Dobrzynski H., Yanni J., Boyett M. R., Lei M. Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels. *Cardiovasc. Res.* 2007. vol. 73. P. 729–738. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.11.016.
14. Golovko V., Gonotkov M. The contribution of currents involving potassium ions in the
15. formation of action potential in true pacemaker cells of mouse sino-audicular node. *Cardiovasc. Res.* 2014. vol. 103. P. 102–103. DOI: 10.1093/cvr/cvu098.69.
16. Adachi T., Shibata S., Okamoto Y., Sato S., Fujisawa S., Ohba T., Ono K. The mechanism of increased postnatal heart rate and sinoatrial node pacemaker activity in mice. *J Physiol Sci.* 2013. vol. 63. no. 2. P. 133–146. DOI: 10.1007/s12576-012-0248-1.