

## КАЛИЕВЫЕ КАНАЛЫ ИГРАЮТ КЛЮЧЕВУЮ РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ АВТОМАТИИ В СИНОАУРИКУЛЯРНОМ УЗЛЕ МЫШИ

Головко В.А.<sup>1</sup>, Козловская А.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии – обособленное структурное подразделение ФГБУН ФИЦ «Коми НЦ УрО РАН»  
ул. Первомайская, 50, г. Сыктывкар, 167982, РФ; e-mail: golovko@physiol.komisc.ru

<sup>2</sup> Сыктывкарский государственный университет им. П. Сорокина  
г. Сыктывкар, РФ

Поступила в редакцию: 26.08.20

**Аннотация.** Исследовали роль калиевых токов в формировании морфологии потенциалов действия клеток истинного водителя ритма (ИВР) в синоаурикулярном (СА) узле мыши. Биофизические параметры регистрировали у клеток спонтанно сокращающихся полосок миокарда с помощью микроэлектродной техники. Фармакологический анализ проводили путем аппликации специфических блокаторов калиевых каналов, а также неселективного канала тока, активируемого гиперполяризацией HCN. Установили, что клетки ИВР располагаются вдоль артерии СА-узла и отличаются самой медленной скоростью нарастания потенциала действия (ПД) в фазу 0. Ивабрадин (3 мМ) замедлял частоту генерации ПД на 24% за счет увеличения скорости фазы медленной диастолической деполяризации (МДД). E-4031 – блокатор быстрого выходящего калиевого тока,  $I_{Kr}$ , влиял на длительность и скорость фазы реполяризации, а в концентрации 1 мкМ вызывал увеличение длительности МДД и замедление частоты генерации ПД. Полная блокада  $I_{Kr}$  вызывает деполяризацию сарколеммы и прекращение электрической активности. Хроманол 293В блокировал каналы медленного выходящего калиевого тока  $I_{Ks}$ . Вклад  $I_{Ks}$  в фазу реполяризации составлял 20-30%, а частота генерации ПД замедлялась в среднем на 7%. Проходящий ток  $I_{to}$  вносил существенный вклад в частоту генерации ПД клеток СА-узла мыши. Блокатор каналов тока  $I_{to}$  (0,5 мМ) вызывал увеличение ДПД<sub>20</sub> в среднем на 43%, а в концентрации 5 мМ – на 80%. При этом частота генерации ПД снижалась на 14%. Таким образом, калиевые токи играют ключевую роль в формировании ПД клеток СА-узла мыши и участвуют в модуляции ритма спонтанных сокращений.  
**Ключевые слова:** синоаурикулярный узел, потенциал действия, медленная диастолическая деполяризация, калиевые токи, блокаторы, мышшь

Вольтаж – чувствительные калиевые каналы (К-каналы) – это селективные поры на сарколемме миоцитов, способные периодически пропускать ионы  $K^+$ . Механизмы регуляции открывания и закрывания К-каналов установлены [1,2]. Однако функциональная роль калиевых токов до конца не выяснена. Широко используемые для исследования К-каналов методы кристаллографии и криоэлектронной микроскопии не позволяют получить информацию о круговороте ионов  $K^+$  в клетках. Такая информация необходима для фармакологической коррекции нарушений генерации электрической активности в синоаурикулярном (СА) узле, задающем ритм сокращений всего сердца.

Мыши являются удобной моделью для изучения электрофизиологии сердца. Созданы мутантные линии мышечной ткани с различными нарушениями сердечной деятельности и, в том числе, функции СА-узла. С использованием мыши получены новые сведения о генетических, молекулярных и системных механизмах, участвующих в возникновении и поддержании сердечных аритмий, приводящих к остановке сердца [3, 4].

Однако, несмотря на значимость для дальнейшего развития исследований, в литературе мало надежной информации об основных электрофизиологических параметрах потенциалов действия клеток синусно-предсердного узла контрольных мышечных тканей (wild-type) [5-7]. Особенно это касается активируемого гиперполяризацией тока  $I_f$ , который переносится по неселективным HCN-каналам ионами натрия и калия. В обзорных статьях [8, 9] приводятся сведения о том, что вклад тока  $I_f$  в спонтанную активность СП-узла некоторых млекопитающих варьировал от 3 до 30%.

Показано, что в клетках СА-области кролика и морской свинки выходящие быстрый и медленный ( $I_{Kr}$  и  $I_{Ks}$ ) калиевые токи задержанного выпрямления участвуют в формировании максимального диастолического потенциала ( $E_{max}$ ) и фазы реполяризации ПД [10,11]. Вклад  $I_{Kr}$  и  $I_{Ks}$  в генерацию ПД клеток водителя ритма до сих пор точно не известен. Считается, что у кролика и мыши преобладает  $I_{Kr}$  [7,10,12], тогда как у морской свинки оба тока участвуют в равной степени [11]. Вместе с тем, по данным работы [7], хроманол 293В, блокирующий выходящий медленный калиевый ток, не влиял на частоту генерации ПД у мыши.

Cha и соав. [13] методом моделирования проверили данные о вкладе  $I_{Kr}$  в реполяризацию ПД для изолированных клеток СА-узла мыши [14]. Подавление  $I_{Kr}$  приводило к замедлению частоты на 28%, при этом  $I_{Ks}$  можно было в расчет не принимать. Из клинической практики известно, что антиаритмик III класса хроманол 293В может подавлять  $I_{Ks}$ . По-видимому, выходящий быстрый калиевый ток играет важную роль в формировании фазы конечной реполяризации ПД и фазы диастолы, тогда как функциональная роль  $I_{Ks}$  не вполне понятна.

Целью работы было оценить вклад калиевых токов в формировании морфологии потенциалов действия СА-узла с помощью фармакологического анализа в условиях техники микроэлектродных отведений на модели мыши.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальный протокол соответствовал международными правилам “Для использования лабораторных животных” (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8-е издание, опубликованным National Academics Press (США) в 2011 г.).

В экспериментах использовали двухмесячных самцов мышей альбиносов ( $n=98$ ) массой  $30\pm 5$  г. Животных обездвигивали мгновенным смещением шейных позвонков. Вскрывали грудную полость и извлекали сердце. Изолированное сердце помещали в раствор Тироде (мМ/л): NaCl – 140, NaHCO<sub>3</sub> – 10, KCl – 5,4, CaCl<sub>2</sub> – 1,8, MgSO<sub>4</sub> – 1, глюкоза – 10, HEPES – 5, pH 7,4. Препараты (спонтанно бьющиеся полоски размером  $3\times 2\times 0.3$  мм) включали фрагмент *crista terminalis*, сегмент верхней и нижней полых вен. Препарат помещали в экспериментальную камеру с перфузируемым раствором Тироде (температура  $30\pm 1$  °С), раствор аэрировали газовой смесью (O<sub>2</sub> – 95% и CO<sub>2</sub> – 5%). Блокаторы ионных каналов добавляли в солевой раствор в нужной концентрации. Продолжительность действия блокаторов 15-30 мин. Если препарат отмывался до стационарного уровня, то эксперимент продолжали.

ПД регистрировали с помощью стеклянных микроэлектродов с начальным сопротивлением 40-60 МΩ. Анализировали 15 биофизических параметров ПД клеток СА узла мыши, работающих в режиме истинного водителя ритма (ИВР). Обработку данных проводили в программе BIOSTAT 4.03. Использовали непараметрический критерий Вилкоксона для связанных выборок и U-критерий Манна–Уитни для несвязанных. Различия считали значимыми при  $p<0,05$ . Данные представлены как средняя арифметическая со стандартной ошибкой.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки водителя ритма локализовались вдоль артерии СА-узла. ПД, зарегистрированные в зоне бифуркации артерии имели  $dV/dt_{\max}$  фазу 0 равную в среднем  $3\pm 1$  В/с ( $n$  полосок = 28). Уровень  $E_{\max}$  был равен – 54 мВ, а пороговый потенциал составлял  $-42 \pm 5$  мВ при частоте  $294 \pm 30$  имп./мин (рис. 1 А-Г).

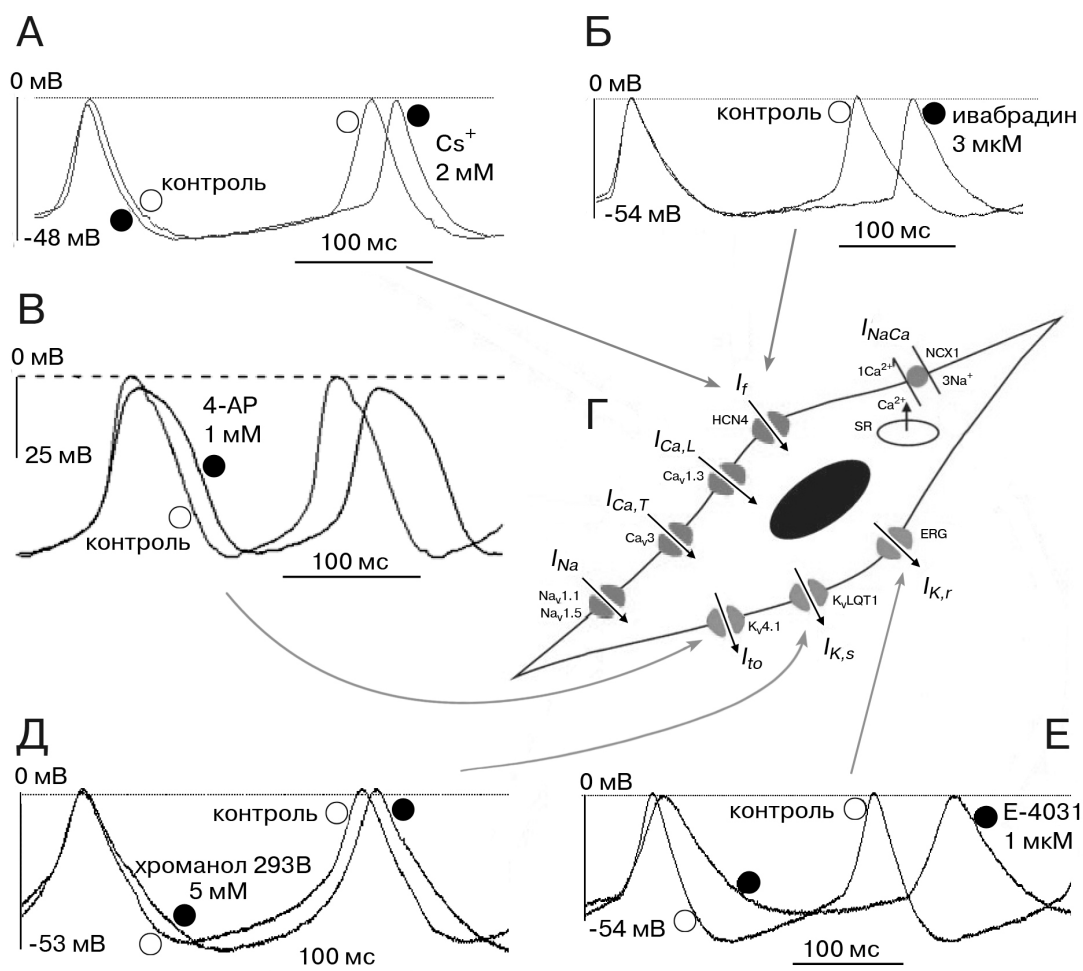
Эффекты ивабрадина – специфического блокатора, активируемого гиперполяризацией тока  $I_f$  исследовали в диапазоне концентраций от 0.01 до 3 мМ. Анализ данных показал, что пороговая концентрация ивабрадина для клеток ИВР СА-узла мыши составила 0.08 мМ. Концентрация, вызывающая 50% замедление ( $EC_{50}$ )  $V_4$  была равна 0,4 мМ. Ивабрадин на 5 минуте экспозиции вызывал увеличение длительности МДД от 80 до 130 мс (рис. 1 Б). В результате величина  $V_4$  снижалась наполовину, а частота генерации ПД – на 25% по сравнению с контролем. Следовательно, ивабрадин замедлял частоту генерации ПД, главным образом, за счет увеличения длительности и снижения скорости фазы медленной диастолической деполяризации.

Метилсульфонанилид (Е-4031) блокирует ток  $I_{K_r}$ . Е-4031 в диапазоне концентрации от 0,01 до 1 мМ дозозависимо снижал скорость фазы конечной реполяризации и увеличивал ДПД<sub>90</sub>. В результате замедлялась частота генерации ПД. В концентрации 0.5 мМ блокатор вызывал увеличение ДПД<sub>90</sub> в среднем на 20-25% ( $n=6$ ). Амплитуда ПД снижалась за счет деполяризации  $E_{\max}$  от –53 до –46 мВ, длительность МДД увеличивалась на 37%. Частота генерации ПД снижалась на 25% по сравнению с контролем (рис. 1 Д).

Хроманол 293В блокирует каналы тока  $I_{K_s}$ . Нами установлено, что аппликация хроманола 293В (5 мМ) вызывала повышение  $E_{\max}$  от –52 до –55 мВ ( $n=6$ ) и смещала уровень порогового потенциала на 4 мВ в сторону позитивности (рис.1 В). Несмотря на то, что скорость фазы МДД увеличивалась, частота генерации ПД снижалась в среднем на 7% (6-20%) по сравнению с контролем (рис. 1 Д). Следовательно, чувствительность к хроманолу проявляли параметры ПД, связанные с величиной порогового потенциала ДПД<sub>90</sub> и скоростью фазы конечной реполяризации.

Соединение 4 – аминопиридин является блокатором каналов проходящего тока  $I_{to}$ . Изучение эффектов 4-АП в диапазоне концентрации от 0,05 до 5 мМ на биофизические параметры ПД показало, что блокатор в концентрации 0.5 мМ вызывал наибольшее (в среднем на 43%) увеличение длительности ПД на уровне 20% реполяризации (ДПД<sub>20</sub>) (рис. 1 В). Это приводило и к увеличению ДПД<sub>90</sub>. Минимальная (пороговая) концентрация 4-АП, оказывающая действие на клетки работающие в режиме ИВР составляла около 0,3 мМ. Повышение концентрации 4-АП от 1 до 5 мМ вызывало увеличение ДПД<sub>20</sub> на 80% и замедление частоты генерации ПД на 14% по сравнению с контролем. Полученные данные свидетельствуют о том, что у клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма, 4-АП удлинял ДПД<sub>20</sub> и снижал  $dV/dt_{\max}$ , что приводило к снижению частоты генерации ПД.

Итак, нами определены параметры ПД клеток СА-узла мыши и выявлены эффекты блокаторов калиевых каналов, а также неселективного канала HCN4 тока, активируемого гиперполяризацией,  $I_f$ . Имеющиеся в литературе сведения о биофизических параметрах ПД клеток СА-узла мыши единичны и противоречивы [5,6,15, 16]. Зарегистрированные нами параметры ПД наиболее сходны с данными, полученными на полосках СА-области мыши [6]. Наши данные микроэлектродной идентификации клеток показали, что в зоне бифуркации



**Рисунок 1.** Влияние специфических блокаторов ионных каналов на конфигурацию ПД клеток с самой медленной  $dV/dt_{max}$  в СА узле мыши: А и Б – эффекты ивабрадина и CsCl, В – эффекты 4-аминопиридина; Г – схема ионных токов на сарколемме клетки ИВР; Д – эффекты хроманола 293В; Е – эффекты E-4031

артерии располагается центральная часть СА-узла сердца мыши. Частота генерации ПД клеток СА-узла мыши составляет в среднем около 400 имп./мин., что в 2-3 раза больше, чем у подавляющего числа млекопитающих (кролик, морская свинка, собака и др.). Это накладывает отпечаток на параметры ПД, что ставит под сомнение корректность сопоставления мыши с другими млекопитающими.

Подавляющая часть данных о вкладе тока, активируемого гиперполяризацией,  $I_f$ , в автоматию СА-узла получена на сердце кролика [17]. Специфический блокатор данного тока CsCl (2 мМ) вызывал уменьшение частоты генерации ПД клеток СА-узла кролика на 3-20% за счет уменьшения скорости МДД [8]. Ивабрадин в концентрации 3  $\mu$ М понижал частоту сердцебиений изолированного перфузированного сердца мыши на 35% [18]. В наших опытах на изолированных полосках СА-узла мыши ивабрадин (3 мкМ) понижал частоту генерации ПД на 25% по сравнению с контролем, в основном за счет увеличения длительности и снижения скорости фазы медленной диастолической деполяризации. Следовательно, можно полагать, что вклад тока, активируемого гиперполяризацией,  $I_f$ , составляет 20-30% и не является единственным в формировании фазы МДД (рис. 1 А). Возможно, его функция состоит в стабилизации спонтанного ритма. Установлено, что мутации гена *HCN4*, кодирующего белки каналов тока  $I_f$ , связаны с развитием аритмий у мыши и человека [4, 19].

Выходящий быстрый калиевый ток,  $I_{K,r}$ , является важным током, регулирующим фазу реполяризации ПД. Его деактивация приводит к смещению потенциала покоя. Имеющиеся данные, свидетельствуют о том, что данный ток является определяющим в сердце кролика [10] и изолированного сердца мыши [12]. При экспозиции блокатора E-4031 отмечали замедление частоты сердцебиений на 35-70%. Мы установили, что пороговая концентрация блокатора E-4031 для клеток ИВР мыши составляла около 0,01  $\mu$ М. Аппликация блокатора в концентрации 0,5  $\mu$ М вызывала эффект только на длительность и скорость фазы реполяризации. Повышение концентрации до 1  $\mu$ М вызывало увеличение длительности МДД и замедление частоты генерации ПД. Таким образом, замедление  $I_{K,r}$  в момент превалирования входящего тока  $I_f$  приводит к увеличению длительности МДД и замедлению скорости фазы медленной диастолической деполяризации. Полная блокада  $I_{K,r}$  может вызвать деполяризацию сарколеммы и прекращение электрической активности.

Вклад медленного калиевого тока  $I_{K,s}$  в формировании ПД в клетках СА-узла мыши остается дискуссионным. Высказано мнение, что у мелких животных (мышь, крыса) преобладает  $I_{K,r}$ , а  $I_{K,s}$  отсутствует или инактивирован

[20]. Некоторые исследователи предполагают, что преобладание  $I_{Kr}$  является одним из механизмов адаптации к высокой частоте сердцебиений [21]. При помощи методики «patch-clamp» на изолированных клетках СА-узла мыши не зарегистрировали общего выходящего калиевого тока при экспозиции хроманола. В наших опытах хроманол 293В блокировал каналы тока  $I_{Ks}$ . Мы оцениваем его вклад в фазу реполяризации в 20-30%. Частота генерации ПД замедлялась в среднем на 7%.

Ток  $I_{to}$  вносит существенный вклад в частоту генерации ПД клеток СА-узла мыши. Об этом свидетельствует тот факт, что 4-АП блокатор каналов тока  $I_{to}$  в концентрации 0.5 мМ вызывал увеличение ДПД<sub>20</sub> в среднем на 43%, а в концентрации 5 мМ – на 80%. В результате частота генерации ПД снижалась на 10 и 16%, соответственно. Представляется перспективным использование препаратов на основе пиридина, которые могут тонко регулировать частоту генерации ПД в клетках СА-узла, увеличивая длительность фазы плато.

Таким образом, калиевые токи играют ключевую роль в формировании ПД клеток СА-узла мыши и участвуют в модуляции ритма спонтанных сокращений.

#### Список литературы/References:

1. Bartos D.C., Grandi E., Ripplinger C.M. Ion channels in the heart. *Compr Physiol.*, 2015, vol. 5, pp. 1423-1464.
2. Bezanilla F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev.*, 2000, vol. 80, pp. 555-592.
3. Stieber J., Hofmann F., Ludwig A. Pacemaker channels and sinus node arrhythmia. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2004, vol. 14, pp. 23-28.
4. Herrmann S., Fabritz L., Layh B., Kirchhof P., Ludwig A. Insights into sick sinus syndrome from an inducible mouse model. *Cardiovasc. Res.*, 2011, vol. 90, pp. 38-48.
5. Mangoni M.E., Nargeot J. Properties of the hyperpolarization-activated current  $I_f$  in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovasc. Res.*, 2001, vol. 52, pp. 51-64.
6. Verheijck E.E., van Kempen M.J., Veereschild M., Lurvink J., Jongasma H.J., Bouman L.N. Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. *Cardiovasc. Res.*, 2001, vol. 52, pp. 40-50.
7. Cho H.S., Takano M., Noma A. The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node. *J. Physiol.*, 2003, vol. 550, pp. 169-180.
8. Vinogradova T.M., Bogdanov K.Y., Lyashkov A.E. et al. Rhythmic  $Ca^{2+}$  oscillatory drive sinoatrial nodal cell pacemaker function to make the heart tick. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2005, vol. 1047, pp. 138-156. DOI: 10.1196/annals.1341.013.
9. Lakatta E.G., DiFrancesco D. What keeps us ticking: a funny current, a calcium clock, or both? *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2009, vol. 47, pp.157-170.
10. Verheijck E.E., van Ginneken A.C., Bourier J., Bouman L.N. Effects of delayed rectifier current blockade by E-4031 on impulse generation in single sinoatrial nodal myocytes of the rabbit. *Circ. Res.*, 1995, vol.76, pp. 607-615.
11. Matsuura H., Ehara T., Ding W.G., Omatsu-Kanbe M., Isono T. Rapidly and slowly activating components of delayed rectifier  $K^+$  current in guinea-pig sinoatrial node pacemaker cells. *J. Physiol.*, 2002, vol. 540, pp. 815-830.
12. Clark R.B., Mangoni M.E., Lueger A., Couette B., Nargeot J., Giles W.R. A rapidly activating delayed rectifier  $K^+$  current regulates pacemaker activity in adult mouse sinoatrial node cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2004, vol. 286, pp. 1757-1766.
13. Cha C.Y., Himeno Y., Shimayoshi T., Amano A., Noma A. A novel method to quantify contribution of channels and transporters to membrane potential dynamics. *Biophys. J.*, 2009, vol. 97, pp. 3086-3094.
14. Kharche S., Yu J., Lei M., Zhang H. A mathematical model of action potentials of mouse sinoatrial node cells with molecular bases. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2011, vol. 301, pp. 945-963.
15. Lei M., Jones S.A., Liu J., Lancaster M.K., Fung S.M., Dobrzynski H., Camelliti P., Maier S.K.G., Noble D., Boyett M.R. Requirement of neuronal and cardiac-type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking. *J. Physiol.*, 2004, vol. 559, pp. 835-848.
16. Golovko V.A., Gonotkov M.A., Lebedeva E.A. Effects of 4-aminopyridine on action potentials generation in mouse sinoauricular node strips. *Physiological Reports*, 2015, vol. 3 (7), p. e12447. DOI: 10.14814/phy2.12447:1-8.
17. DiFrancesco D. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ. Res.*, 2010, vol.106, pp. 434-446.
18. 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, pp. 729-738.
19. Schulze-Bahr E., Neu A., Friederich P., Kaupp U. B., Breithardt G., Pongs O., Isbrandt D. Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J. Clin. Invest.*, 2003, vol. 111, pp. 1537-1545.
20. Ono K., Shibata S., Iijima T. Properties of the delayed rectifier potassium current in porcine sinoatrial node cells. *J. Physiol.*, 2000, vol. 524, pp. 51-62.
21. Lei M., Honjo H., Kodama I., Boyett M. R. Heterogeneous expression of the delayed-rectifier  $K^+$  currents  $I_{Ks}$  and  $I_{Kr}$  in rabbit sinoatrial node cells. *J. Physiol.*, 2001, vol. 535, pp. 703-714.

**THE POTASSIUM CHANNELS PLAY A PIVOTAL ROLE IN FORMATION OF AUTOMATICITY IN THE MOUSE SINOAURICULAR NODE****Golovko V.A.<sup>1</sup>, Kozlovskaya A.V.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Institute of Physiology, Komi Science Centre URD RAS  
*Pervomaiskaya st., 50, Syktyvkar, 167982, Russia; e-mail: golovko@physiol.komisc.ru*<sup>2</sup>P. Sorokin Syktyvkar State University  
*Syktyvkar, Russia*

**Abstract.** The role of potassium currents in the formation of action potential morphology of true pacemaker cells in the mouse sinoauricular node (SAN) was studied. Biophysical parameters were recorded in cells using microelectrode. Pharmacological analysis was performed by applying specific potassium channel blockers, as well as a non-selective current channel activated by hyperpolarization HCN. It was found that the true pacemaker cells are located along the SAN artery and differ in the slowest velocity of action potential (AP) upstroke  $dV/dt_{max}$  ( $\approx 3$  V/s). Ivabradine (3  $\mu$ mol) decreased the frequency of AP generation by 24% due to an increase in the duration and velocity of the slow diastolic depolarization (SDD) phase. E4031 - blocker of fast inward potassium current,  $I_{Kr}$ , affected the duration and velocity of the repolarization phase. E4031 (1  $\mu$ mol) caused an increase in SDD duration and a decreased in the frequency of AP generation. Complete inhibition of  $I_{Kr}$  channels can cause depolarization of the sarcolemma and blocks of electrical activity. Chromanol 293B blocked the channels of slow inward potassium current,  $I_{Ks}$ . The contribution of  $I_{Ks}$  to the repolarization phase was 20-30%. The frequency of AP generation slowed down by an average of 7%. The  $I_{to}$  current made a significant contribution to the frequency of AP generation in SAN cells of the mouse. 4-AP aminopyridine – blocker of  $I_{to}$  channels (0.5 mmol) caused an increase in AP duration by an average of 43%, and in the concentration of 5 mmol – by 80%. At the same time, the frequency of AP generation decreased by 14%. Thus, potassium currents play a key role in the formation of AP in the mouse CA node cells and participate in the modulation of the rhythm of spontaneous contractions.

**Key words:** sinoauricular node, action potential, slow diastolic depolarization, potassium currents, blockers, mouse.