

Г.В. Соткіс, Р.М. Лазаренко, О. І. Болдирєв, О.І. Войтичук,  
В.Є. Досенко, Л.В.Тумановська, Я.М. Шуба

## Ідентифікація E-4031-чутливого компонента калієвого струму в клітинах лінії P19 ембріональної карциноми миші, диференційованих у кардіоміоцити

*В кардиодифференцированных клетках линии P19 эмбриональной карциномы мыши при помощи метода patch-clamp идентифицирован «быстрый» калиевый ток задержанного выпрямления ( $I_{Kr}$ ). Индукция кардиомиоцитарной дифференциации осуществлялась путем культивирования клеток P19 при наличии диметилсульфоксида (1 %), а критериями ее адекватности служили: развитие спонтанной сократительной активности, характерные изменения морфологии, увеличение количества митохондрий, локализованных вблизи сократительных элементов, экспрессия мРНК кардиоспецифического актина и легких цепей миозина, а также наличие входящих натриевого и кальциевого токов. Идентификация  $I_{Kr}$  была произведена на основе чувствительности к специфическому антагонисту E-4031, который в концентрации 1 мкмоль/л блокировал около 50 % суммарного выходящего калиевого тока. Однако в отличие от  $I_{Kr}$  в нативных кардиомиоцитах и гетерологических системах, экспрессирующих калиевые каналы ether-a-go-go(eag)-related gene (ERG1), которые за него ответственны, E-4031-чувствительный компонент калиевого тока в кардиомиоцитдифференцированных клетках P19 не обнаруживал характерного внутреннего выпрямления, что, вероятно, является следствием специфической регуляции и/или субъединичного состава эндогенных ERG1-основанных каналов в этих клетках. Дальнейшие исследования обнаруженного феномена отсутствия выпрямления E-4031-чувствительного компонента калиевого тока может содействовать открытию новых механизмов, которые его определяют. Кардиомиоцитдифференцированные клетки P19 могут также послужить удобной in vitro моделью для изучения фармакологической регуляции  $I_{Kr}$ , который, как известно, является основной мишенью побочного кардиотоксического действия многих клинически используемых препаратов.*

### ВСТУП

Найперший орган, який формується в процесі розвитку ембріона і без функціонування якого подальший ембріогенез неможливий – це серце [29]. Диференціювання клітин попередників у різноманітні кардіоспецифічні фенотипи – передсердні, шлуночкові, вузлові, провідні – складний процес, що супроводжується експресією спеціалізованих генів і появою мембранних іонних каналів, рецепторів і транспортерів, які визначають електростимульовані та скорочувальні властивості кожного типу клітин.

Хоча дотепер мембранні властивості нативних, повністю диференційованих кардіоміоцитів добре визначені, однак як ці властивості набуваються в ході кардіогенезу все ще залишається нез'ясованим. Водночас така інформація має не тільки фундаментальне значення, а і є необхідною передумовою розробки стратегій терапевтичної пересадки серцевих клітин.

Попередні праці для визначення властивостей електричного та функціонального розвитку серця проводились або на препаратах цілого серця [4], або на ізольованих

© Г.В. Соткіс, Р.М. Лазаренко, О. І. Болдирєв, О.І. Войтичук, В.Є. Досенко, Л.В.Тумановська, Я.М. Шуба

клітинах з ембріонального органа [14]. Останнім часом для дослідження властивостей та особливостей функціонування кардіоміоцитів почали широко використовуватися модельні системи, котрі передбачають диференціювання клітин серцевого м'яза із плюрипотентних попередників – стовбурових клітин [2, 25, 26]. Особливий інтерес нині викликають можливості використання кардіопотентних клітин як замісної терапії при лікуванні наслідків кардіоміопатій, зокрема для компенсації постінфарктної втрати серцевого м'яза. Такі клітини приживляються в ділянках пошкодженого міокарда та диференціюються в кардіоміоцити, формуючи інтеркалярні диски та покращуючи роботу серця [6, 7, 13, 22].

Нині існує декілька типів плюрипотентних клітинних ліній ссавців. Серед них виділяють ембріональні лінії стовбурових, карциномних і фетальних клітин. На відміну від двох інших типів, клітини ембріональної карциноми не потребують шару фібробластів для росту в культурі [2]. Клітини лінії P19 карциноми миші, які ми використовували в роботі, комерційно доступні та здатні до постійного росту в збагаченому ембріональною сироваткою середовищі. Вплив специфічних хімічних агентів призводить до диференціації плюрипотентних клітин лінії P19 у такі, що властиві різним типам тканин, включаючи серцеву [15, 26]. Так, під дією ретиноевої кислоти клітини лінії P19 дають початок нейронам, клітинам астро- та мікроглії, в той час як вплив диметилсульфоксиду (ДМСО) чи окситоцину призводить до формування клітин кардіоміоцитарного чи скелетном'язового фенотипу [15, 26]. Процес диференціювання, як правило, проводять через утворення клітинних агрегатів – так званих ембріональних тілець. *In vitro* диференціювання клітин ембріональної карциноми в кардіоміоцити спричинює появу всіх спеціалізованих типів клітин серця [2, 5].

Очевидною перевагою використання в дослідах кардіоміоцитдиференційованих ліній клітин є можливість здійснювати їх тривале культивування *in vitro*, що дозволяє спостерігати часозалежність змін структурних, функціональних і електрозбудливих характеристик на різних етапах диференціювання, а також проводити молекулярні маніпуляції для з'ясування механізмів спостережуваних процесів [2, 25]. Складності, які при цьому виникають, полягають в асинхронності диференціації та гетерогенності популяції одержуваних клітин, що складається із суміші різних серцевих фенотипів – пеймейкерного, провідного, скоротливого разом з недиференційованими клітинами [2, 25, 28].

У даній роботі ми провели ідентифікацію кардіоспецифічного калієвого струму –  $I_{Kr}$  у кардіоміоцитдиференційованих клітинах P19 на основі його фармакологічної чутливості до класу III антиаритмічного препарату, аналога соталолу – E-4031. Калієві канали, які цей струм переносять, є дуже схильними до побічної блокувальної дії багатьох клінічно застосовуваних препаратів, що при суперпозиції з іншими несприятливими чинниками часто призводить до специфічної форми препаратіндукованої аритмії – поліморфної шлуночкової тахікардії [24]. Ідентифікація  $I_{Kr}$  у модельній системі диференційованих в кардіоміоциті клітин P19 буде сприяти дослідженню механізмів його модуляції ендогенними та екзогенними факторами в кардіоспецифічному середовищі, а також розробці засобів захисту проти небажаної кардіотоксичної дії лікарських препаратів.

## МЕТОДИКА

*Культивування клітин лінії P19.* У наших дослідах клітини лінії P19 культивували в середовищі MEM ALPHA ("Gibco", Великобританія) з додаванням 7,5 % телячої сироватки та 2,5 % ембріональної бичачої сироватки

ватки; 2,2 г/л  $\text{NaHCO}_3$  та 5000 од/мл пеніциліну чи стрептоміцину. Типова культура клітин мала вигляд моношару. Виділення окремих клітин проводили тоді, коли щільність культури становила близько 80 %.

*Кардіоспецифічне диференціювання.* Диференціювання клітин лінії P19 в кардіоміоциті досягалося при культивуванні 450–700 клітин у 20 мкл середовища з додаванням 20 % ембріональної бичачої сироватки та 1 % ДМСО у висячих краплях протягом 2 діб. Утворені таким чином ембріональні тілця (агрегати) впродовж наступних 5 діб культивували в суспензії, а потім знову висаджували в чашки Петрі.

Кардіоміоцитоподібні клітини ізолювали з ембріональних тілець на 12–15-ту добу культивування. Ділянки ембріональних тілець, котрі характеризувалися спонтанною скоротливою активністю, вирізали ланцетом і піддавали ферментативній обробці протягом 30 хв при 37 °С у такому розчині (ммоль/л):  $\text{NaCl}$  – 120,  $\text{KCl}$  – 5,4,  $\text{MgSO}_4$  – 5, пірувату  $\text{Na}$  – 5, глюкози – 20, таурину – 20,  $\text{HEPES}$  – 10, 1 мг/мл колагенази В і 30 мкмоль/л  $\text{CaCl}_2$ , рН 6,9. Процес дисоціації клітин продовжувався протягом 1 год при кімнатній температурі в гіперкалієвому розчині такого складу (ммоль/л):  $\text{KCl}$  – 85,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 30,  $\text{MgSO}_4$  – 5,  $\text{EDTA}$  – 1,  $\text{Na}_2\text{ATP}$  – 2, пірувату – 5, креатину – 5, таурину – 20, глюкози – 20, рН 7,4. Дисоційовані окремі кардіоміоцити поміщали в чашки Петрі з культуральним середовищем та інкубували при 37 °С.

*Полімеразна ланцюгова реакція.* Через 1, 3, 7, 15, 22 доби після додавання ДМСО культуру клітин лінії P19 диспергували, центрифугували при 500 g протягом 3 хв і відразу використовували для виділення РНК за допомогою Trizol RNA-Prep (“Isogene”, Росія). За контроль брали клітини P19, що культивувалися без ДМСО. Зворотну транскрипцію проводили за допомогою RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (“Fermentas”, Литва), викорис-

товуючи 150–200 нг тотальної РНК і випадкові гексамерні праймери. Отриману таким чином одноланцюгову ДНК використовували для полімеразної ланцюгової реакції – ампліфікації фрагментів генів, що кодують кардіоспецифічний актин і легкі ланцюжки міозину.

Послідовність нуклеотидів у праймерах для ампліфікації була такою: прямий – 5′-TGT TAC GTC GCC TTG GAT TTT GAG-3′, зворотній – 5′-AAG AGA GAG ACA TAT CAG AAG C-3′ для гена актину та прямий – 5′-GCC AAG AAG CGG ATA GAA G-3′, зворотній – 5′-CTG TGG TTC AGG GCT CAG TC-3′ для гена легких ланцюжків міозину. Ампліфікаційна суміш містила 5 мкл 5-кратного PCR-буфера, 1,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидів, по 30 пмоль/л кожного з праймерів і 0,5 ОД Taq-полімерази (“АмпліСенс”, Росія) та ДНК-матрицю, отриману в результаті зворотної транскрипції. Об’єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в термоциклері GeneAmp System 2700 (“Applied Biosystems”, США). Для ампліфікації фрагментів зазначених генів проводили 34 цикли: денатурація – 94 °С (1 хв), гібридизація праймерів – 63 °С (40 с) і елонгація – 74 °С (1 хв). Візуалізацію й оцінку яскравості ампліфікатів після горизонтального електрофорезу (170 В протягом 30 хв) в 2%-му агарозному гелі, що містив бромистий етидій, проводили за допомогою транслюмінатора та програмного забезпечення ViTran (“Биоком”, Росія).

*Електронно-мікроскопічне дослідження.* Для електронно-мікроскопічного дослідження клітини поміщали в епоксидну смолу після попередньої фіксації в 2,5%-му розчині глутаральдегіду в какодилатному буфері та наступної постфіксації в 1%-му розчині осмієвої кислоти. Ультратонкі мікроскопічні зрізи зафарбовували уранілацетатом і цитратом свинцю. Дослідження

проводили з використанням електронного мікроскопа Jem – 100 CX (Японія).

*Електрофізіологічні експерименти та розчини.* В електрофізіологічних дослідах використовували клітини лінії P19, котрі піддавали кардіодиференціюванню за описаною процедурою при різних термінах інкубації. Мембранні струми в клітинах реєстрували з використанням методики patch-clamp у конфігурації “ціла клітина”. Інтегральні струми вимірювали у відповідь на стимуляцію клітини імпульсами потенціалу в кожному конкретному випадку так, щоб створити умови для активації того чи іншого типу струму – натрієвого, кальцієвого чи калієвого.

У дослідах використовували зовнішньоклітинні розчини такого складу (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 5,4, CaCl<sub>2</sub> – 1,8, MgCl<sub>2</sub> – 1, HEPES – 10, глюкоза – 10; pH 7,4. З метою відокремлення низькопорогового кальцієвого струму від натрієвого та калієвого, використовували такий зовнішньоклітинний розчин (ммоль/л): TEACl – 50, хлориду холіну – 100, MgCl<sub>2</sub> – 1, SrCl<sub>2</sub> – 10, HEPES – 10 (pH доводили розчином ТЕАОН до 7,3). Реєструвальну піпетку заповнювали внутрішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): КОН – 100, KCl – 40, MgCl<sub>2</sub> – 1, HEPES – 10, EGTA – 8, MgATФ – 5, CaCl<sub>2</sub> – 2,6; pH 7,2. Піпетки виготовляли з боросилікатного скла за допомогою мікрокузні Фонбрюма і вони мали опір у межах 3–5 МОм.

Зміни зовнішнього розчину проводили за допомогою багатоканальної мікропіпетки зі спільним витоком, який розташовували дуже близько до клітини. Повну заміну зовнішнього розчину робили не більше ніж за 1 с.

Усі реактиви, які використовували для приготування розчинів були від фірми “Sigma”, (США). Експерименти проводили з використанням підсилювача “Dagan”, (США) та персонального комп’ютера. Для реєстрації струмів використовували прог-

рамне забезпечення pCLAMP-8 („Axon Instruments”, США), а для обробки й аналізу результатів – Origin-7 („Microcal”, США).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Перед початком електрофізіологічних досліджень необхідно було впевнитися, що умови культивування та диференціювання дійсно призводять до появи клітин з ознаками специфічними для кардіоміоцитів. З цією метою ми дослідили зміни морфології, ультраструктури та експресії кардіо-маркерів у клітинах P19, що піддавалися ДМСО-індукованому диференціюванню.

Зміни морфології та ультраструктури кардіоміоцитоподібних клітин P19. Однією з ознак, за якою можна припустити, що справді відбувається кардіоспецифічне диференціювання клітин ембріональної карциноми *in vitro*, є зміна їх морфології. При розгляді під фазоконтрастним мікроскопом недиференційовані клітини P19 мали близьку до округлої форму, відносно невеликий діаметр (близько 30 мкм) і високе співвідношення площі ядро/цитоплазма (рис. 1,а,б). Після 10 діб ДМСО-індукованого диференціювання клітини, ізольовані зі спонтанно-скоротливих кластерів, в основному були видовженої форми зі збільшеними лінійними розмірами (близько 50 мкм) та оптично щільнішою цитоплазмою, що загалом є ознаками морфології кардіоміоцитів (див. рис. 1,в). Свідченням збільшення розмірів клітин у результаті диференціювання було підвищення ємності їх мембрани ( $C_m$ ), виміряної в електрофізіологічних експериментах. Так, якщо недиференційовані клітини характеризувалися середнім значенням  $C_m$  46 пФ ± 9 пФ (n=8), то після 10-добового терміну диференціювання вона збільшувалася до 69 пФ ± 12 пФ (n=15).

Електронно-мікроскопічний аналіз ультраструктури також показав, що ДМСО стимулює появу кардіоспецифічних ознак у

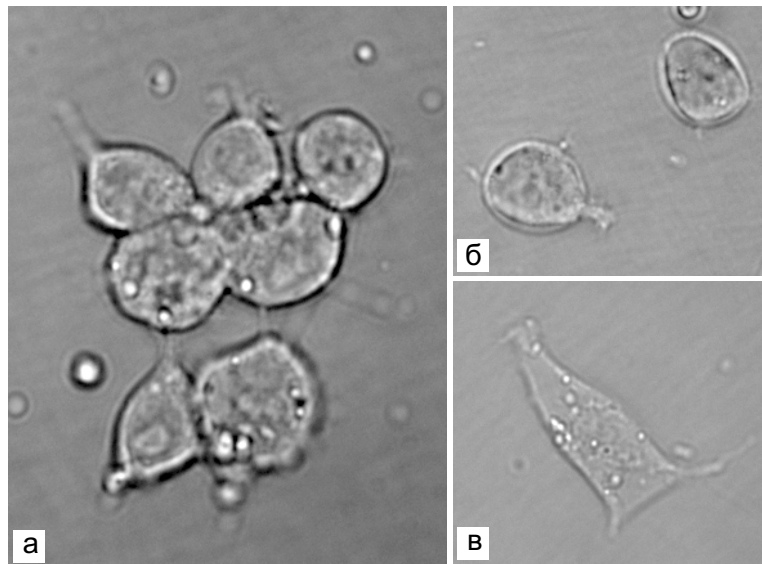


Рис. 1. Морфологічні зміни клітин лінії P19 при кардіодиференціюванні, індукованому диметилсульфоксидом (ДМСО): а – характерна морфологія клітин лінії P19 після 2 діб культивування у висячих краплях – утворення клітинних агрегатів, б – недиференційовані (без ДМСО), в – диференційовані клітини на 10-ту добу культивування

клітинах лінії P19. При цьому найбільш очевидною зміною було істотне збільшення в диференційованих клітинах кількості мітохондрій (рис. 2,а), котрі локалізувалися біля скоротливих філаментів (див. рис. 2,б), що є типовим для пізнього ембріонального етапу розвитку кардіоміоцитів [3].

Експресія кардіоспецифічних генів. Морфологічні та ультраструктурні зміни є важливими, але не достатніми критеріями кардіоспецифічного диференціювання. Так, за даними ван дер Хейдена [26], у популяції морфологічнооднакових кардіоподібних клітин P19 існує частина тих, що спонтанно скорочуються, але є “мовчазними” щодо мембранних струмів та електричної активності. Тому для одержання додаткових доказів диференціації ми перейшли до визначення експресії мРНК кардіомаркерів – кардіоспецифічного актину та легкого ланцюжка міозину (MCL-2v) за допомогою методу зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції (RT-PCR).

У препаратах РНК, виділеної зі спонтанно скоротливих кластерів клітин P19, уже на 3-тню добу після ДМСО-індукованого

диференціювання, спостерігається значне підвищення експресії специфічної мРНК згаданих маркерів, яка була майже повністю відсутня на 1-шу добу. Слід зазначити, що експресія мРНК кардіомаркерів після 3 діб ДМСО-індукованого диференціювання далі практично не збільшувалася залишаючись на більш-менш постійному рівні аж до 22-ї доби (рис. 3, а,б). Це дає підстави зробити висновок, що основна індукція кардіоспецифічних генів у клітинах P19 відбувається протягом перших 3 діб після початку диференціювання, хоч це не означає, що цього часу буде достатньо для появи всіх функціональних білків.

Відомо, що в кардіоміоцитах, диференційованих з ембріональних стовбурових клітин, продукти серцевих генів експресуються під жорстким контролем. На ранніх етапах диференціювання (з 0–1 доби), в ембріональних тільцях з’являються мРНК, що кодують транскрипційні фактори GATA-4 та Nkx2.5, потім (на 7–8-му добу) – мРНК, що кодує передсердний натрійуретичний фактор (ANF), легкі ланцюжки міозину (MLC-2v), важкі ланцюжки міозину

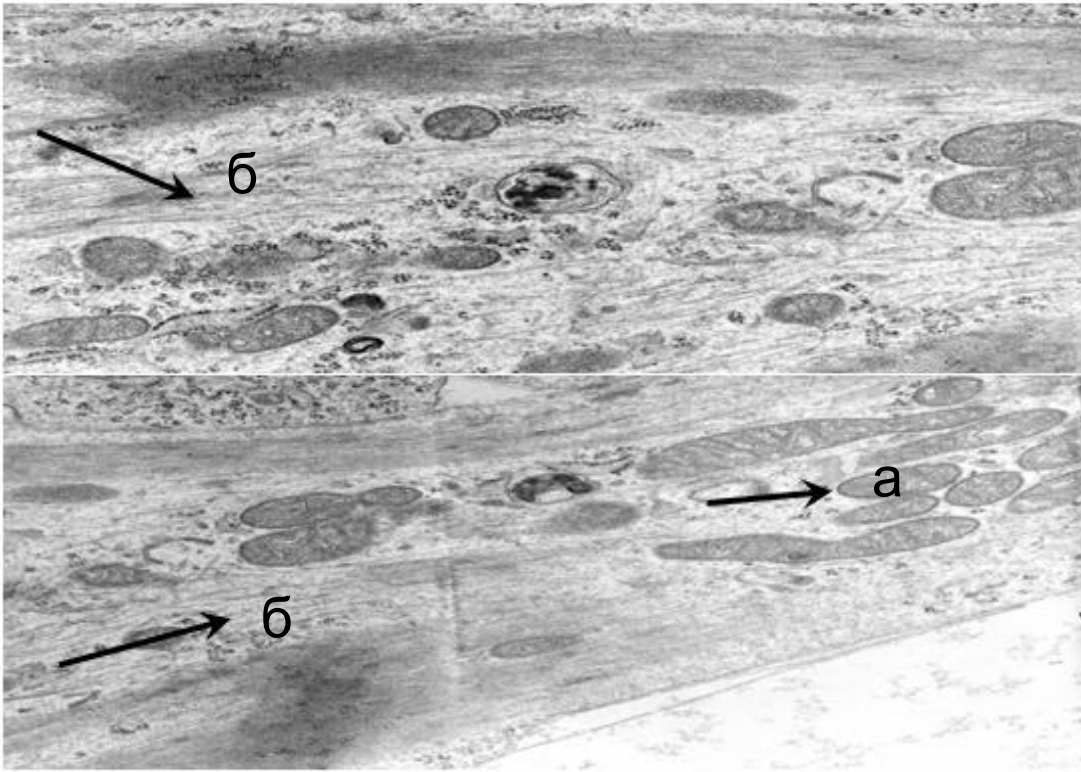


Рис. 2. Результати електронно-мікроскопічного дослідження ультраструктури кардіодиференційованих клітин, проведеного на 20-ту добу після індукції диференціювання за допомогою диметилсульфоксиду: а – компактне скупчення великої кількості мітохондрій, б – скоротливі мікрофіламенти, котрі розміщені дуже близько до цих мітохондрій. Таке розташування внутрішньоклітинних структур вказує на формування притаманного серцевим клітинам скоротливого апарату

( $\alpha$ -МНС,  $\beta$ -МНС),  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник тощо. Саркомерні білки також мають певний порядок експресії в процесі розвитку

кардіодиференційованих клітин. Спочатку в них з'являється мРНК титину Z-дисків, потім  $\alpha$ -актиніну, важких і легких ланцюгів

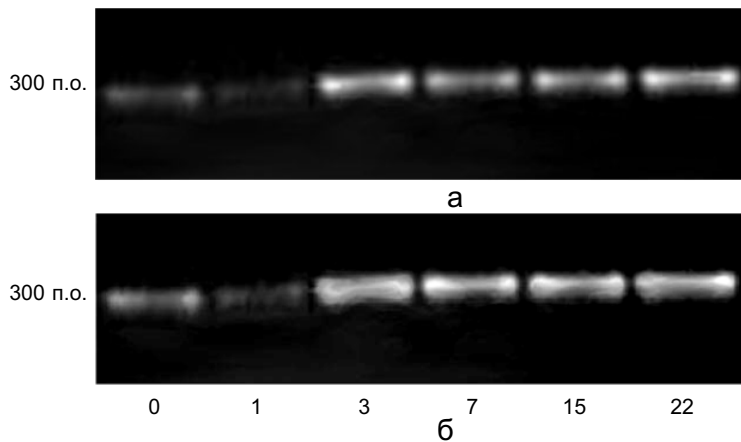


Рис. 3. Результати електрофорезу ампліфікатів гена кардіоспецифічного актину (а) та легких ланцюжків міозину – MLC2v (б), де п.о. – пари нуклеїнових основ, 0, 1, 3, 7, 15, 22 – доби після додавання диметилсульфоксиду до культури клітин лінії P19

міозину,  $\alpha$ -актину, серцевого тропоніну Т, М-протеїну [2]. Відтак, поява кардіоспецифічних продуктів генів у ембріональних стовбурових клітинах є функцією від часу, так само як і при нормальному розвитку міокарда.

Визначений нами початок експресії мРНК кардіоспецифічного актину та MLC-2v з 3-ї доби індукції диференціювання клітин P19 і підтримання стабільно високого рівня цих компонентів упродовж наступних етапів розвитку (досліджено до 22-ї доби) дає нам нижню часову межу, з якої можна очікувати появу характерних для серцевих клітин властивостей електричної збудливості та мембранних іонних каналів, які її зумовлюють.

Кардіоспецифічні входні струми серцеподібних клітин P19. На ранніх стадіях ембріогенезу в електричному та функціональному плані головною рисою, що вказує на кардіоміоцитний напрямок диференціювання є здатність клітин до спонтанної скоротливої активності. Більшість слабодиференційованих серцевих клітин є пейсмейкерами, однак при кінцевому диференціюванні (наприклад у шлуночковий чи передсердний фенотип) така їх здатність втрачається [32]. Залежно від стадії та від обраного шляху кінцевого диференціювання

кардіоміоцити можуть спонтанно або у відповідь на стороннє збудження генерувати потенціали дії (ПД) різної форми. Молекулярне підґрунтя для генерації специфічних ПД у кардіоміоцитах створюють головним чином натрієві, кальцієві та калієві іонні канали [1, 19, 21, 23, 33]. У процесах електромеханічного sprzęження важливе місце посідають механізми, котрі регулюють внутрішньоклітинну концентрацію іонів кальцію.

В експериментах patch-clamp на недиференційованих клітинах P19 ми не виявили помітних трансмембранних струмів, які можна було б зіставити з функціонуванням потенціалзалежних іонних каналів, характерних для збудливих клітин. У відповідь на ступінчасту стимуляцію в діапазоні потенціалів  $\pm 100$  мВ ми спостерігали тільки невеликі, часо- та потенціалнезалежні струми втрат.

Після 12-ї доби ДМСО-індукованого кардіодиференціювання, коли згідно з літературними даними стає помітною експресія мРНК багатьох потенціалзалежних каналів [26], більшість з досліджених клітин при деполяризації від підтримуваного потенціалу  $V_h = -100$  мВ демонстрували значний входний потенціалзалежний натрієвий струм (рис. 4,а,б), який було легко

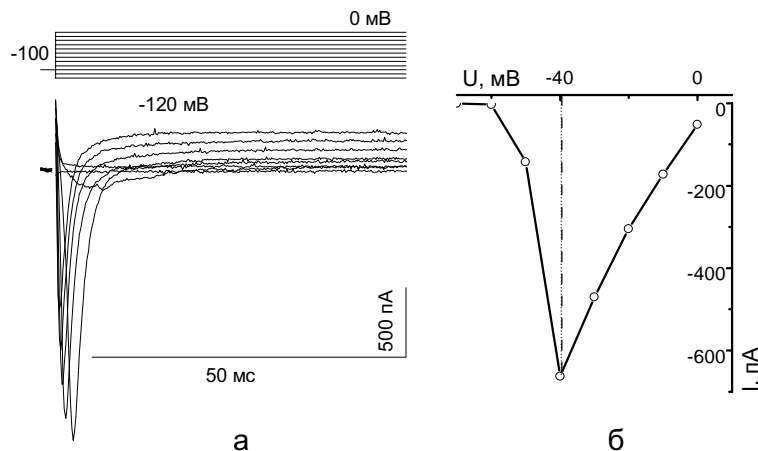


Рис. 4. Приклад реєстрації швидкого потенціалкерваного натрієвого струму в кардіодиференційованих клітинах лінії P19 (а) у відповідь на протокол стимуляції зображений вище. Крива вольт-амперної залежності (б) демонструє характерні для даного струму поріг активації (близько -60 мВ) та пік при -40 мВ

ідентифікувати за характерними, швидкою кінетикою, активацією й інактивацією.

Еквімолярна заміна зовнішньоклітинних іонів натрію на іони холіну, які не здатні проникати через натрієві канали, не призвела до повного зникнення вхідного струму. Залишковий струм мав майже в 10 разів меншу амплітуду та більш повільну кінетику активації й інактивації (рис. 5,а), хоч його потенціалзалежність залишалася практично незмінною (див. рис. 5,б). Цей струм прогресивно зменшувався зі зсувом підтримуваного потенціалу в бік деполяризації, повністю зникаючи при  $V_h = -60$  мВ, а також усувався внаслідок вилучення іонів кальцію із зовнішньоклітинного середовища. За сукупністю характеристик, а саме: максимальна амплітуда при  $-40$  мВ (див. рис. 5,б), чутливість до деполяризаційного зсуву підтримуваного потенціалу та наявності зовнішньоклітинного кальцію ми ідентифікували залишковий струм як такий, що переноситься через низькопорогові кальцієві канали.

Низькопороговий кальцієвий струм характерний для практично всіх типів серцевих клітин з переважною експресією в передсердних міоцитах, міоцитах синоатріального вузла, клітинах Пуркінє та значно меншою вираженістю в шлуноч-

кових міоцитах, в яких домінуючим є високопороговий кальцієвий струм L-типу [26]. Слід зазначити, що вираженого кальцієвого струму L-типу в кардіодиференційованих клітинах P19 ми не спостерігали, що може свідчити про незначний внесок шлуночкового фенотипу в популяцію диференційованих клітин.

Ідентифікація калієвого струму  $I_{Kr}$  в кардіоподібних клітинах P19. Одним з наших головних завдань була ідентифікація в кардіодиференційованих клітинах P19 так званого швидкого  $I_{Kr}$ . Останній відіграє головну роль у реполяризації серцевого ПД. Пороутворювальна субодиниця каналу, який переносить цей струм, кодується геном ERG1 (ether-a-go-go (eag)-related gene), відомим ще під назвою KCNH2 [16]. Продукт людської форми цього гена, спочатку названий HERG, демонструє дуже схожі функціональні властивості, хоч і не ідентичні з ендогенним серцевим  $I_{Kr}$ -каналом [17]. Пригнічення  $I_{Kr}$ , що є наслідком або мутацій ERG1 гена, або фармакологічної блокади самого каналу є причинами спадкового, та, відповідно, набутого синдрому подовженого QT-інтервалу електрокардіограми [10]. У комбінації з такими факторами ризику як гормональний статус жінки, психофізичний стрес, гіпо-

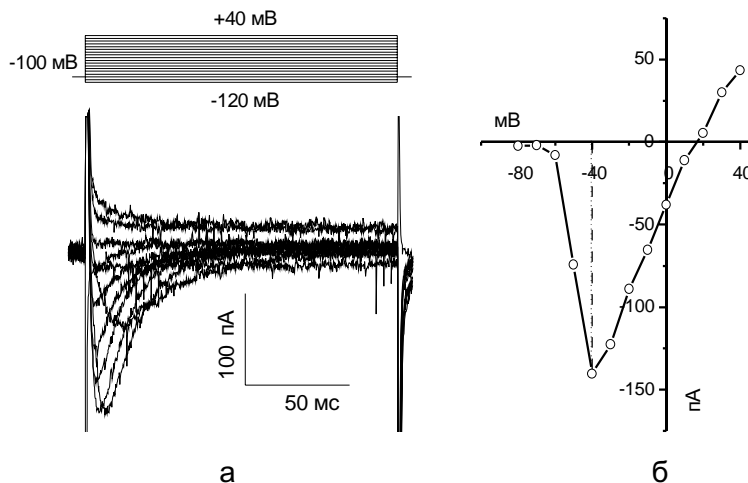


Рис. 5. Запис низькопорогового кальцієвого струму в кардіоміоцитах, диференційованих з клітин P19 (а) у відповідь на протокол стимуляції, зображений вище і його вольт-амперна залежність (б)



калемія, гіпомігнезія фармакологічноіндукований синдром подовженого QT-інтервалу часто призводить до виникнення летальної тахікардії шлуночків [12]. При наявності  $I_{Kr}$  у серцеподібних клітинах P19 ці клітини можуть бути зручною *in vitro* моделлю для вивчення його фармакологічної та гормональної модуляції з метою вироблення захисних заходів проти препаратіндукованих аритмій.

Загальний вихідний калієвий струм як у нативних кардіоміоцитах, так і в кардіодиференційованих плюрипотентних клітинах є результатом комплексної активності декількох типів калієвих каналів [18, 26] і тому має мультикомпонентну природу. В таких випадках єдиним надійним способом виділення  $I_{Kr}$  компонента є фармакологічний. Специфічним блокатором як нативних  $I_{Kr}$ -каналів, так і рекомбінантних ERG1-каналів є клас III антиаритміків, аналог соталолу – E-4031 [11]. На рис. 6,а наведено приклад вихідних струмів кардіодиференційованих клітин P19, одержаних з використанням імпульсної схеми, що дозволяє максимізувати внесок  $I_{Kr}$ -компонента за рахунок особливостей його потенціалзалежності [21]. При такій схемі максимальний внесок  $I_{Kr}$  очікується в “хвостовий” струм, що генерується у відповідь на тестову реполяризацію (в діапазоні від  $-120$  до  $+40$  мВ) після кондиціонуючої деполяризації до  $+60$  мВ (див. рис. 6,а). Прикладання  $1$  мкмоль/л E-4031 призводило до істотного пригнічення як струму у відповідь на кондиціонуючу деполяризацію, так і “хвостових” струмів на реполяризацію (див. рис. 6,б). Для виділення E-4031-чутливого компонента, який повинен відповідати  $I_{Kr}$ , ми від струмів без блокатора (див. рис. 6,а) відняли струми, які залишилися, з його наявністю (див. рис. 6,а,б,в,г).

Вольт-амперна характеристика, побудована за максимальними значеннями різницевого E-4031-чутливого “хвостових” струмів, демонструвала потенціал реверсії

близько  $-90$  мВ, що свідчило про їх калієву природу та помірне вихідне випрямлення (див. рис. 6,д). Як це не дивно, але остання риса суперечить визнаній властивості як ендogenous  $I_{Kr}$  у нативних кардіоміоцитах так і того, що пов’язаний з гетерологічною експресією ERG1-каналів – здатності до внутрішнього випрямлення. Зазвичай ця властивість виявляється в тому, що при потенціалах, вищих за  $-40$  мВ, на вольтамперних характеристиках “хвостових” струмів з’являється ділянка з від’ємною провідністю, яку пояснюють наявністю процесу надзвичайно швидкої потенціалзалежної інактивації каналів, що розвивається зі збільшенням деполяризації [31].

Таким чином, наші результати показують наявність у кардіоміоцитдиференційованих клітинах P19 E-4031-чутливого компонента калієвого струму, який можна порівняти з  $I_{Kr}$ . Однак відсутність внутрішнього випрямлення цього струму свідчить про те, що ERG1-канали в клітинах P19, які за нього відповідають, імовірно зазнають специфічних регуляторних впливів з боку внутрішньоклітинних факторів та/або додаткових субодиниць, що на такому випрямленні позначаються. Літературні дані вказують на експресію в клітинах P19, починаючи з 12-ї доби диференціювання, мРНК двох сплайс-варіантів мишачої ізоформи ERG1 – MERG1A та MERG1B [26]. Специфіка асоціації цих ізоформ в ендogenous гетеротетрамерний  $I_{Kr}$ -канал теж може зумовлювати характер його випрямлення. Хоч молекулярні детермінанти внутрішнього випрямлення ERG1 загалом відомі [31], відсутність такого випрямлення в клітинах P19 може сприяти виявленню додаткових механізмів, що за нього відповідають.

Отримані в нашій роботі результати, у різний спосіб демонструють серцеву природу диференційованих під впливом ДМСО клітин лінії P-19 ембріональної карциноми миші та функціональну експре-

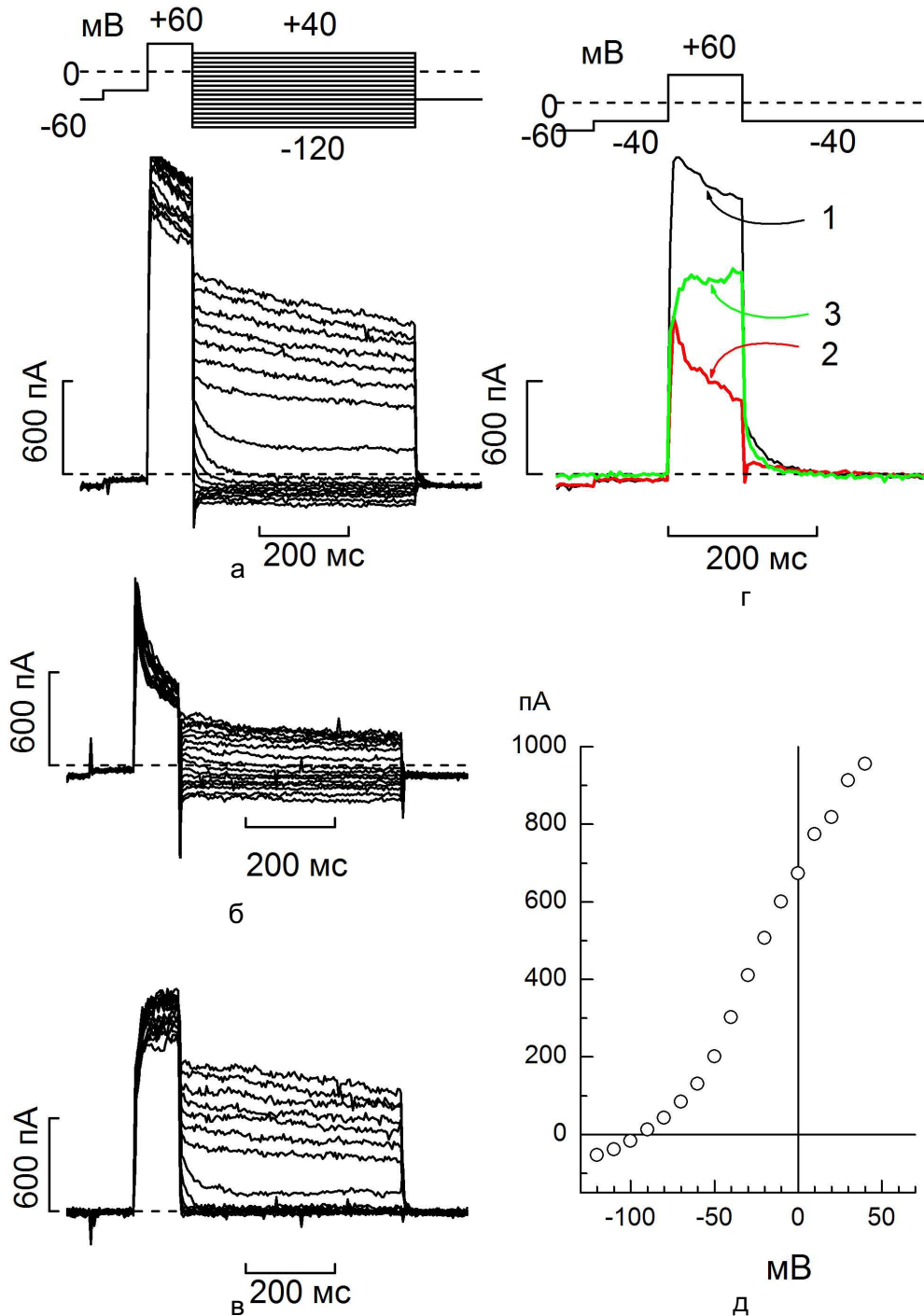


Рис. 6. Реєстрація E-4031-чутливого струму в клітинах P19 на 10-ту добу після індукції кардіодиференціювання: а – запис струму у відповідь на протокол стимуляції, зображений вище; б – запис струму, що розвивався при наявності 1 мкмоль/л блокатора E-4031; в – струм різниці, одержаний внаслідок віднімання а від б; г – суперпозиція струмів у відповідь на даний протокол стимуляції, 1 – контрольний струм, 2 – заблокований E-4031, 3 – струм різниці, д – вольт-амперна характеристика E-4031-чутливого хвостового струму, що демонструє помірне вхідне випрямлення

сію в них калієвих каналів, що відповідають за струм  $I_{Kr}$ . Деяка гетерогенність в експресії трансмембранних струмів, що спостерігалася в наших електрофізіологічних дослідженнях, очевидно, пояснюється гетерогенністю популяції одержуваних клітин. Дійсно, для таких досліджень ми виділяли клітини зі спонтанно-скоротливих кластерів на 8–30-ту добу від початку індукції диференціювання, однак для більш якісної фіксації потенціалу в експериментах patch-clamp намагалися вибрати окремі, електрично ізольовані від інших клітини, що мали більш-менш правильну форму без довгих відростків та спонтанно не скорочувалися. Таким чином, коли за іншими, крім електрофізіологічних, критеріями ми мали змогу визначити серцеву належність цілих кластерів клітин, то дати відповіді на питання, до якого саме типу кардіоміоцитів (пейсмейкерного, провідного чи робочого) належить кожна конкретна клітина ми не могли.

Внесок у гетерогенність електрозбудливих властивостей може робити також відсутність синхронізації диференціювання. Загалом, вважається, що спонтанна скоротлива активність характерна для слабодиференційованих кардіоміоцитів на початкових стадіях диференціювання, а в кінці його така здатність втрачається [2]. Також відомо про відсутність або незначність функціональної експресії швидких потенціалкерованих натрієвих каналів у незрілих кардіоміоцитах. Відсутня в них і фоновна калієва провідність, що в свою чергу призводить до збільшення вхідного опору плазматичної мембрани та підвищення потенціалу спокою [32]. Це збільшує ймовірність перебування швидких натрієвих каналів у інактивованому стані. Дослідження розвитку ембріональних кардіоміоцитів миші виявили, що L-тип кальцієвих каналів домінує на ранніх стадіях розвитку, а натрієві струми посилюються безпосередньо перед народженням миші [8]. У мишачій культурі кінцеве кардіодиференціювання

відбувається протягом 22 діб [19].

Деякі літературні дані [20, 27] вказують також на те, що пейсмейкерна активність ембріональних кардіоміоцитів відбувається головним чином внаслідок внутрішньоклітинних осциляцій концентрації  $Ca^{2+}$  і входження його іонів через плазматичну мембрану потрібне лише для поповнення вмісту кальцію в клітині. Для прогресивного збільшення частоти серцевих скорочень у процесі диференціювання кардіоміоцитів зі стовбурових попередників і власне забезпечення пейсмейкерної активності важливу роль відіграє функціонування  $RyR2$  ріанодинових рецепторів ендоплазматичного ретикулула [30] та/або інозитолтрифосфатзалежного шляху внутрішньоклітинної сигналізації [9].

Таким чином, очевидно, що для відповіді на питання, до якого типу кардіоміоцитів належать досліджувані кардіоміоцитарподібних клітини P19, на якій стадії диференціювання вони перебувають та які іонні канали при цьому експресують, слід крім інших застосовувати метод зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції для окремих клітин разом з електрофізіологічними реєстраціями струмів через плазмалему. Також відповідь на це питання можуть дати реєстрації потенціалів дії та їх аналіз.

**A.V. Sotkis, Lazarenko R.M., Boldyrev O.I., Voitychuk O.I., Dosenko V.Je., Shuba Ia.M.**

#### **IDENTIFICATION OF E-4031-SENSITIVE POTASSIUM CURRENT COMPONENT ( $I_{Kr}$ ) IN CARDIODIFFERENTIATED MURINE P19 EMBRYONIC CARCINOMA CELLS**

Pluripotent mouse P19 embryonic carcinoma cells represent a convenient *in vitro* model for studying various aspects of cardiac differentiation. Here by using whole-cell patch-clamp recording we have identified the rapid delayed rectifier  $K^+$  current,  $I_{Kr}$ , in P19 cell induced to differentiate into cardiac phenotype by DMSO (1%). Cardiac differentiation was confirmed by the appearance of spontaneously beating cells, their morphological features, ultrastructural clusterization of mitochondria around contraction elements, expression of cardiac actin mRNAs and

MLC2v, and by the presence of inward sodium and calcium currents.  $I_{Kr}$  was isolated based on the sensitivity to the specific blocker, E-4031, which at concentration of 1 mM blocked more than 50% of the total outward  $K^+$  current. However, in contrast to  $I_{Kr}$  in native cardiac myocytes and in heterologous systems expressing  $I_{Kr}$ -carrying ERG1 potassium channel, E-4031-sensitive  $K^+$  current in cardiac-like P19 cells lacked characteristic inward rectification, suggesting specific regulation and/or subunit composition of endogenous ERG1-based channel in these cells. Establishing the reason(s) for this phenomenon will advance the understanding of the mechanisms of  $I_{Kr}$ -channel rectification. Cardiac-differentiated P19 cells might also be useful for studying pharmacological modulation of  $I_{Kr}$ , which is recognized target for cardiotoxic side effects of numerous drugs.

*O.O. Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Banach K., Halbach P.Hu., Hescheler J., Egert U. Development of electrical activity in cardiac myocyte aggregates derived from mouse embryonic stem cells // *Amer. J. Physiol. Heart. Circulat. Physiol.* – 2003. – **284**. – P. H2114–H2123.
- Boheler K.R., Czyz J., Tweedie D. et al. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes // *Circulat. Res.* – 2002. – **91**. – P. 189–201.
- Goffart S., Kleist-Retzow J.C., Wiesner R.J. Regulation of mitochondrial proliferation in the heart: power-plant failure contributes to cardiac failure in hypertrophy // *Cardiovasc. Res.* – 2004. – **64**. – P. 198–207.
- Kamino K., Hirota A., Fujii S. Localization of pacemaking activity in early embryonic heart monitored using voltage-sensitive dye // *Nature.* – 1981. – **290**. – P. 595–597.
- Kehat I., Gepstein L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes // *J. Clin. Invest.* – 2001. – **108**. – P. 407–414.
- Krugliakov P.V., Sokolova I.B., Amineva K. et al. Mesenchymal stem cell transplantation for myocardial repair of rat experimental heart failure // *Tsitologija.* – 2004. – **46**. – P. 1043–1054.
- Laflamme M.A., Gold J., Xu C. et al. Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells // *Amer. J. Pathol.* – 2005. – **167**(3). – P. 663–671.
- Mangoni M.E., Couette B., Bourinet E. et al. Functional role of L-type  $Ca^{2+}$ -channels in cardiac pacemaker activity // *PNAS.* – 2003. – **100**. – P. 5543–5548.
- Mery A., Aimond F., Menard C., Mikoshiba K. et al. Initiation of embryonic cardiac pacemaker activity by inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent calcium signaling // *Molec. Biol. Cell.* – 2005. – **16**. – P. 2414–2423.
- Mitcheson J.S., Chen J., Lin M. et al. A structural basis for drug-induced long QT syndrome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – **97**. – P. 12329–12333.
- Mitcheson J.S., Hancox J.C. An investigation of the role played by the E-4031-sensitive (rapid delayed rectifier) potassium current in isolated rabbit atrioventricular nodal and ventricular myocytes // *Pflug. Arch – Eur. J. Physiol.* – 1999. – **438**. – P. 843–850.
- Morissette P., Hreiche R., Turgeon J. Drug-induced long QT syndrome and torsade de pointes // *Can. J. Cardiol.* – 2005. – **21**. – P. 857–864.
- Nagaya N., Kangawa K., Itoh T. et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy // *Circulation.* – 2005. – **112**. – P. 1128–1135.
- Nuss H.B., Marban E. Electrophysiological properties of neonatal mouse cardiac myocytes in primary culture // *J. Physiol.* – 1994. – **479**. – P. 265–279.
- Paquin J., Danalache B.A., Jankowski M. et al. Oxytocin induces differentiation of P-19 embryonic stem cells to cardiomyocytes // *PNAS.* – 2002. – **99**. – P. 9550–9555.
- Pond A.L., Nerbonne J.M. ERG proteins and functional cardiac I(Kr) channels in rat, mouse, and human heart // *Trends Cardiovasc. Med.* – 2001. – **11**. – P. 286–294.
- Sanguinetti M.C., Jiang C., Curran M.E., Keating M.T. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel // *Cell.* – 1995. – **81**. – P. 299–307.
- Sanguinetti M.C., Jurkiewicz N.K. Delayed rectifier outward  $K^+$  current is composed of two currents in guinea pig atrial cells // *Amer. J. Physiol.* – 1991. – **260**. – P. H393–H399.
- Satin J., Kehat I., Caspi O. et al. Mechanisms of spontaneous excitability in human stem cell derived cardiomyocytes // *J. Physiol.* – 2004. – **559**, 2. – P. 479–496.
- Sauer H., Theben T., Hescheler J. et al. Characteristics of calcium sparks in cardiomyocytes derived from embryonic stem cells // *Amer. J. Physiol. Heart. Circulat. Physiol.* – 2001. – **281**. – P. H411–H421.
- Shuba Y.M., Degtiar V.E., Osipenko V.N. et al. Testosterone-mediated modulation of HERG blockade by proarrhythmic agents // *Biochem. Pharmacol.* – 2001. – **62**. – P. 41–49.
- Smits A.M., van Vliet P., Hassink R.J. et al. The role of stem cells in cardiac regeneration // *J. Cell. Mol. Med.* – 2005. – **9**. – P. 25–36.
- Stieber J., Herrmann S., Feil S. et al. The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart // *PNAS.* – 2003. – **100**. – P. 15235–15240.
- Tamargo J., Caballero R., Gomez R. et al. Pharmacology of cardiac potassium channels // *Cardiovasc. Res.* – 2004. – **62**. – P. 9–33.

25. Van der Heyden M.A.G., Defize L.F.K. Twenty one years of P19 cells: what an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation // *Ibid.* – 2003. – **58**. – P. 292–302.
26. Van der Heyden M.A.G., van Kempen M.J.A., Tsuji Y., Rook M.B. et al. P19 embryonal carcinoma cells: a suitable model system for cardiac electrophysiological differentiation at the molecular and functional level // *Ibid.* – 2003. – **58**. – P. 410–422.
27. Viatchenko-Karpinski S., Fleischmann K., Sauer L.H. et al. Intracellular  $Ca^{2+}$  oscillations drive spontaneous contractions in cardiomyocytes during early development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – **96**. – P. 8259–8264.
28. White S.M., Claycomb W.C. Embryonic stem cells form an organized, functional cardiac conduction system in vitro // *Amer. J. Physiol. Heart. Circulat. Physiol.* – 2005. – **288**. – P. H670–H679.
29. Woodcock E.A., Matkovich S.J. Cardiomyocyte structure, function and associated pathologies // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2005. – **37**. – P. 1746–1751.
30. Yang H., Tweedie D., Wang S. et al. The ryanodine receptor modulates the spontaneous beating rate of cardiomyocytes during development // *PNAS.* – 2002. – **99**. – P. 9225–9230.
31. Yang T., Snyders D.J., Roden D.M. Rapid inactivation determines the rectification and  $[K^+]_o$  dependence of the rapid component of the delayed rectifier  $K^+$  current in cardiac cells // *Circulat. Res.* – 1997. – **80**. – P. 782–789.
32. Zhang Y.M., Hartzell C., Narlow M., Dudley S.C. Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential // *Circulation.* – 2002. – **106**. – P. 1294–1299.
33. Zhang Y.M., Shang L., Hartzell C. et al. Characterization and regulation of T-type  $Ca^{2+}$ -channels in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes // *Amer. J. Physiol. Heart. Circulat. Physiol.* – 2003. – **285**. – P. H2770–H2779.

*Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов до редакції 12.09.2005*