

## Исследование электрофизиологических свойств телочитов атриовентрикулярного узла и перифокальной зоны синусного узла у человека и свиньи

Митрофанова Л. Б.<sup>1</sup>, Бобков Д. Е.<sup>2,3</sup>, Оганесян М. Г.<sup>1</sup>, Карпушев А. В.<sup>1</sup>, Кошевая Е. Г.<sup>1</sup>, Горшков А. Н.<sup>1,2,3</sup>, Федотов П. А.<sup>1</sup>, Борцова М. А.<sup>1</sup>, Гребенник В. К.<sup>1</sup>

Об электрофизиологических свойствах телочитов, обнаруженных в рабочем миокарде и синусном узле (СУ), мало известно. Экспрессия телочитами HCN4 позволяет предположить способность генерировать пейсмекерные потенциалы. Для доказательства проведения электрического импульса необходимо наличие потенциал-зависимых натриевых каналов. Предполагается, что телочиты находятся и в атриовентрикулярном узле (АВУ).

**Цель.** Морфологическое и электрофизиологическое исследование телочитов АВУ и перифокальной зоны СУ.

**Материал и методы.** Фрагменты правого предсердия, АВУ 7 сердец реципиентов и 3 сердец свиней забирались, соответственно, при трансплантации сердца и после эксперимента для выделения культур телочитов, гистологического, иммуногистохимического исследования с антителами к CD117, Anti-NaV1.5 (SCN5A), CD34, прижизненной конфокальной лазерной микроскопии с хлоридом кальция. Использовались методы patch-clamp.

**Результаты.** В культурах АВУ обнаружены CD117<sup>+</sup> клетки с длинными отростками, наличие в них калиевого тока плотностью 700 пА/пФ при деполяризации мембраны до +90 мВт у человека и свиньи методом patch-clamp, кальциевые осцилляции с периодом порядка 200 сек у свиньи при повышении Ca<sup>2+</sup> концентрации. В вытянутых клетках, располагающихся между кардиомиоцитами и среди фиброзной ткани перифокальной зоны СУ, выявлена коэкспрессия Anti-NaV1.5 и CD34.

**Заключение.** В АВУ обнаружены телочиты, в культурах которых определялся K<sup>+</sup> ток и кальциевые осцилляции. В телочитах перифокальной зоны СУ человека были обнаружены натриевые каналы SCN5A. Этот факт свидетельствует о возможности клеток проводить электрический импульс.

**Ключевые слова:** телочиты атриовентрикулярного узла и правого предсердия, конфокальная лазерная микроскопия культур и тканевых срезов, patch-clamp, кальциевые осцилляции.

**Отношения и деятельность:** нет.

<sup>1</sup>ФГБУ НМИЦ им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург; <sup>2</sup>ФГБУ НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева, Санкт-Петербург; <sup>3</sup>ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия.

Митрофанова Л. Б.\* — д.м.н., г.н.с. НИЛ патоморфологии, ORCID: 0000-0003-0735-7822, Бобков Д. Е. — к.б.н., н.с. лаборатории биологии клетки в культуре, ORCID: 0000-0002-0358-9266, Оганесян М. Г. — клинический ординатор 2-го года по специальности «Патологическая анатомия», ORCID: 0000-0002-3542-0692, Карпушев А. В. — к.б.н., с.н.с. Института молекулярной биологии и генетики, ORCID: 0000-0001-8437-6424, Кошевая Е. Г. — клинический ординатор 2-го года по специальности «Патологическая анатомия», ORCID: 0000-0002-9656-1704, Горшков А. Н. — к.б.н., зав. лаборатории внутриклеточного сигналинга и транспорта, с.н.с. НИЛ патоморфологии, ORCID: 0000-0003-2303-1144, Федотов П. А. — к.м.н., с.н.с. НИО сердечной недостаточности, ORCID: 0000-0002-7452-1971, Борцова М. А. — зав. кардиологическим отделением № 8, ORCID: 0000-0002-9694-7850, Гребенник В. К. — зав. отделением сердечно-сосудистой хирургии № 3, ORCID: 0000-0003-4353-4160.

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):  
lubamitr@yandex.ru

АВУ — атриовентрикулярный узел, КЛСМ — конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, МИП — механоиндуцированные потенциалы, ПП — правое предсердие, СУ — синусный узел, ТЦ — телочиты.

**Рукопись получена** 24.05.2020

**Рецензия получена** 20.06.2020

**Принята к публикации** 21.06.2020



**Для цитирования:** Митрофанова Л. Б., Бобков Д. Е., Оганесян М. Г., Карпушев А. В., Кошевая Е. Г., Горшков А. Н., Федотов П. А., Борцова М. А., Гребенник В. К. Исследование электрофизиологических свойств телочитов атриовентрикулярного узла и перифокальной зоны синусного узла у человека и свиньи. *Российский кардиологический журнал*. 2020;25(12):3927. doi:10.15829/1560-4071-2020-3927

## Electrophysiological characteristics of telocytes of the atrioventricular node and sinoatrial node perifocal area in humans and pigs

Mitrofanova L. B.<sup>1</sup>, Bobkov D. E.<sup>2,3</sup>, Oganesyanyan M. G.<sup>1</sup>, Karpushev A. V.<sup>1</sup>, Koshevaya E. G.<sup>1</sup>, Gorshkov A. N.<sup>1,2,3</sup>, Fedotov P. A.<sup>1</sup>, Bortsova M. A.<sup>1</sup>, Grebennik V. K.<sup>1</sup>

Little is known about the electrophysiological characteristics of telocytes found in the working myocardium and sinoatrial node (SAN). Telocyte expression of HCN4 suggests the ability to generate pacemaker potentials. To prove the impulse conduction, the presence of voltage-gated sodium channels is required. It is assumed that telocytes are also located in the atrioventricular node (AVN).

**Aim.** Morphological and electrophysiological study of AVN and SAN telocytes.

**Material and methods.** Fragments of the right atrium, AVN of 7 hearts of recipients and 3 hearts of pigs were taken, respectively, during heart transplantation and after the experiment. Isolation of telocyte cultures, histological, immunohis-

tochemical tests with anti-CD117, anti-NaV1.5 (SCN5A), anti-CD34 antibodies, intravital confocal laser microscopy were carried out. The patch-clamp technique was used.

**Results.** In AVN cultures, CD117<sup>+</sup> cells with long processes were found. There was a potassium current with a density of 700 pA/pF during membrane depolarization up to +90 mV in humans and pigs using the patch-clamp technique. Calcium oscillations with a period of about 200 seconds in a pig with an increase in calcium concentration. In elongated cells located between cardiomyocytes and among the fibrous tissue of SAN perifocal zone, the co-expression of anti-NaV1.5 and anti-CD34 antibodies was revealed.

**Conclusion.** In AVN, telocytes were found, in whose cultures potassium current and calcium oscillations were determined. SCNSA sodium channels were found in telocytes of the perifocal area of human SAN. This fact indicates the ability of cells to conduct an electrical impulse.

**Key words:** telocytes of the atrioventricular node and right atrium, laser confocal microscopy of cultures and tissue sections, patch-clamp, calcium oscillations.

**Relationships and Activities:** none.

<sup>1</sup>Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg; <sup>2</sup>Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg; <sup>3</sup>Institute of Cytology, St. Petersburg, Russia.

Mitrofanova L. B.\* ORCID: 0000-0003-0735-7822, Bobkov D. E. ORCID: 0000-0002-0358-9266, Oganeyan M. G. ORCID: 0000-0002-3542-0692, Kar-

pushev A. V. ORCID: 0000-0001-8437-6424, Koshevaya E. G. ORCID: 0000-0002-9656-1704, Gorshkov A. N. ORCID: 0000-0003-2303-1144, Fedotov P. A. ORCID: 0000-0002-7452-1971, Bortsova M. A. ORCID: 0000-0002-9694-7850, Grebennik V. K. ORCID: 0000-0003-4353-4160.

\*Corresponding author:  
lubamitr@yandex.ru

**Received:** 24.05.2020 **Revision Received:** 20.06.2020 **Accepted:** 21.06.2020

**For citation:** Mitrofanova L. B., Bobkov D. E., Oganeyan M. G., Karpushev A. V., Koshevaya E. G., Gorshkov A. N., Fedotov P. A., Bortsova M. A., Grebennik V. K. Electrophysiological characteristics of telocytes of the atrioventricular node and sinoatrial node perifocal area in humans and pigs. *Russian Journal of Cardiology*. 2020;25(12):3927. (In Russ.) doi:10.15829/1560-4071-2020-3927

Телоциты (ТЦ) являются интерстициальными клетками, описанными во многих органах, включая легкие, желудочно-кишечный тракт, мочевой пузырь, предстательную железу, матку, головной мозг и сердце. Несколько исследований показали возможность генерации в ТЦ пейсмекерных потенциалов [1, 2]. ТЦ могут играть важную роль в перистальтике желудочно-кишечного тракта, в дыхании, в сокращении матки, в мимике, но необходимы дополнительные исследования, чтобы понять молекулярные механизмы и межклеточные взаимодействия, с помощью которых эти клетки способствуют возбудимости тканей, инициации пейсмекерных потенциалов. Предполагается, что ТЦ взаимодействуют с соседними мышечными клетками, а их 3D-сеть способствует распространению потенциала действия. Чтобы понять вклад ТЦ в различные механизмы возбудимости, необходимо анализировать белки плазматической мембраны (например, ионные каналы), экспрессируются ли они в этих клетках. Кроме того, ТЦ были описаны как сенсоры для механических стимулов, например, сокращения и растяжения мышцы [3].

Недавно ТЦ были обнаружены в синусном узле (СУ) сердца человека [4]. При этом их телоподии локализованы преимущественно в непосредственной близости от специализированных клеток проводящей системы сердца и от мелких кровеносных сосудов. Телоподии располагаются непосредственно снаружи от базальной мембраны и даже проникают под нее. ТЦ также находятся рядом не только с клетками-пейсмекерами, но и с рабочим миокардом на границе СУ. При этом описано, что наряду с точечными, наноконтактами и плоскими, ТЦ имеют контакты с другими клетками в виде gap junctions, как и рабочий миокард. Verkerk AO, et al. (2007) впервые на человеческом СУ продемонстрировали роль  $I_f$  тока в пейсмекерной активности и определении частоты сердечных сокращений [5]. Гены ионных каналов, отвечающих за этот ток, принадлежат семейству генов *HCN*, тогда как в сердце были найдены

2 изоформы — *HCN1* и *HCN4*. Поскольку доказана экспрессия *HCN4* в ТЦ синусного узла, что может свидетельствовать о том, что эти клетки могут генерировать пейсмекерные потенциалы, была выдвинута гипотеза, что они также могут проводить электрический импульс от клеток-пейсмекеров к рабочему миокарду. Доказательством этого должно послужить наличие потенциал-зависимых натриевых каналов.

Логично предположить, что ТЦ находятся не только в СУ, но и атриовентрикулярном узле (АВУ), который можно исследовать в сердце реципиента при трансплантации и на экспериментальном материале.

Цель исследования: морфологическое и электрофизиологическое исследование ТЦ АВУ и пограничной с синусным узлом зоны правого предсердия (ПП) у человека и свиньи.

### Материал и методы

Материалом исследования послужили фрагменты пограничной с СУ зоны ПП и АВУ 7 сердец реципиентов при трансплантации сердца (табл. 1) и 3 сердец здоровых свиней породы Landrace в возрасте 3-5 мес. после проведения эксперимента аблации легочной артерии. В случаях трансплантации сердца материал забирался стерильным инструментом в течение первых 10 мин после резекции; в эксперименте — в течение первых 15 мин после умерщвления животных. Для выращивания культур клеток фрагменты не более 10 мм из параузловой зоны СУ и АВУ помещались в пробирки с раствором фосфатного буфера и 1% смеси пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (100 мкг/мл; Gibco, США). Для гистологического и иммуногистохимического исследования кусочки миокарда (рис. 1, 2) фиксировались в 10% формалине. Протокол клинических исследований был утвержден местным этическим комитетом НМИЦ им. В. А. Алмазова и соответствовал принципу Хельсинкской декларации. Все процедуры и протоколы были рассмотрены и одобрены Комиссией по уходу и использованию лабораторных животных.

Таблица 1

Сведения о пациентах с трансплантацией сердца

№	Пол	Возраст	Заболевание	Нарушения ритма с заинтересованностью АВУ
1	Ж	50	Хронический миокардит	Нет
2	М	56	ИБС, постинфарктная аневризма	Нет
3	М	47	Некомпактный миокард левого желудочка	Нет
4	М	57	ИБС, постинфарктная аневризма	Нет
5	М	59	Дилатационная кардиомиопатия	Нет
6	М	51	Дилатационная кардиомиопатия	Нет
7	М	59	ИБС, постинфарктная аневризма	Нет

Сокращения: АВУ — атриовентрикулярный узел, ИБС — ишемическая болезнь сердца.

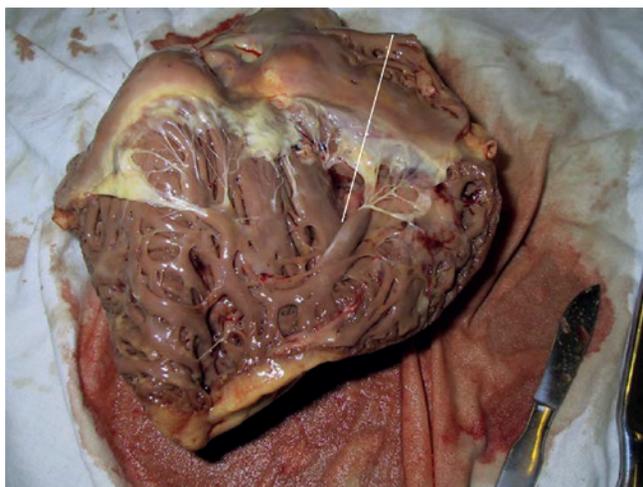


Рис. 1. Линия разреза сердца для забора АВУ. Вскрытые ПП и правый желудочек.



Рис. 2. Фрагменты сердца для серийных гистологических срезов АВУ (отмечен кружочком).

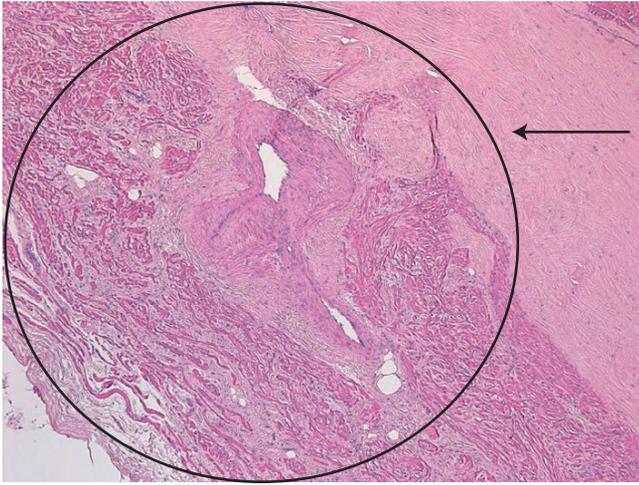
Сведения о пациентах с трансплантацией сердца представлены в таблице 1.

**Гистологическое и иммуногистохимическое исследование.** Для исследования АВУ (у 7 пациентов и 3 свиней) применялись серийные гистологические срезы шагом в 1 мм. Области забора материала для изготовления серийных срезов представлены на рисунках 1 и 2. Срезы окрашивались гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование проводилось по стандартному протоколу с использованием антител: кроличье моноклональное с-Kit (CD117, clone AN26, Genemed, San-Francisco, США), кроличье поликлональное Anti-NaV1.5 (SCN5A; 1978-2016; Alomone Labs (Израиль), мышинное моноклональное антитело к CD34 (cloneQBEnd-10, DAKO, Дания).

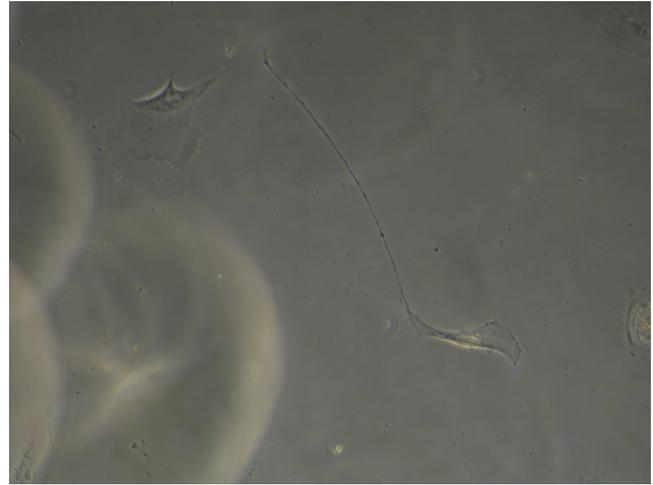
**Культивирование.** Образцы в стерильных условиях доставлялись в лабораторию, где измельчались на кусочки не более 1-2 мм и инкубировались в растворе коллагеназы II (Worthington; 2 мг/мл) в течение 2 ч при 37° С. Затем клеточную суспензию помещали в пробирку и центрифугировали при 300 оборотах в течение 5 мин для лучшего разделения клеток, после чего удаляли надосадочную жидкость,

а в осадок добавляли 1 мл питательной среды, содержащей 70% DMEM/F12 (Invitrogen, США), 20% ECM (Invitrogen, США), 10% телячьей эмбриональной сыворотки (HyClone), 1% раствор аминокислот MEMNEAA (Gibco, США), смесь пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (100 мкг/мл; Gibco, США), L-глутамин (Gibco, США). Затем вновь центрифугировали, добиваясь деактивации коллагеназы. После удаления жидкости в осадок добавляли свежей ростовой среды. Полученную взвесь высевали на покрытые 0,1% желатином культуральные флашки площадью 25 см<sup>2</sup> и культивировали при 37° С, 5% CO<sub>2</sub> и 99% влажности. Культуральную среду меняли в первые сутки после высевания, далее — через каждые 48 ч. Для электрофизиологических исследований использовались клетки 2-4 пассажей. За сутки до проведения исследования клетки пересевали в чашки Петри (35 мм) с покровными стёклами величиной не более 5 мм. Полученные культуры 7 пациентов и 3 свиней инкубировали в стандартных условиях.

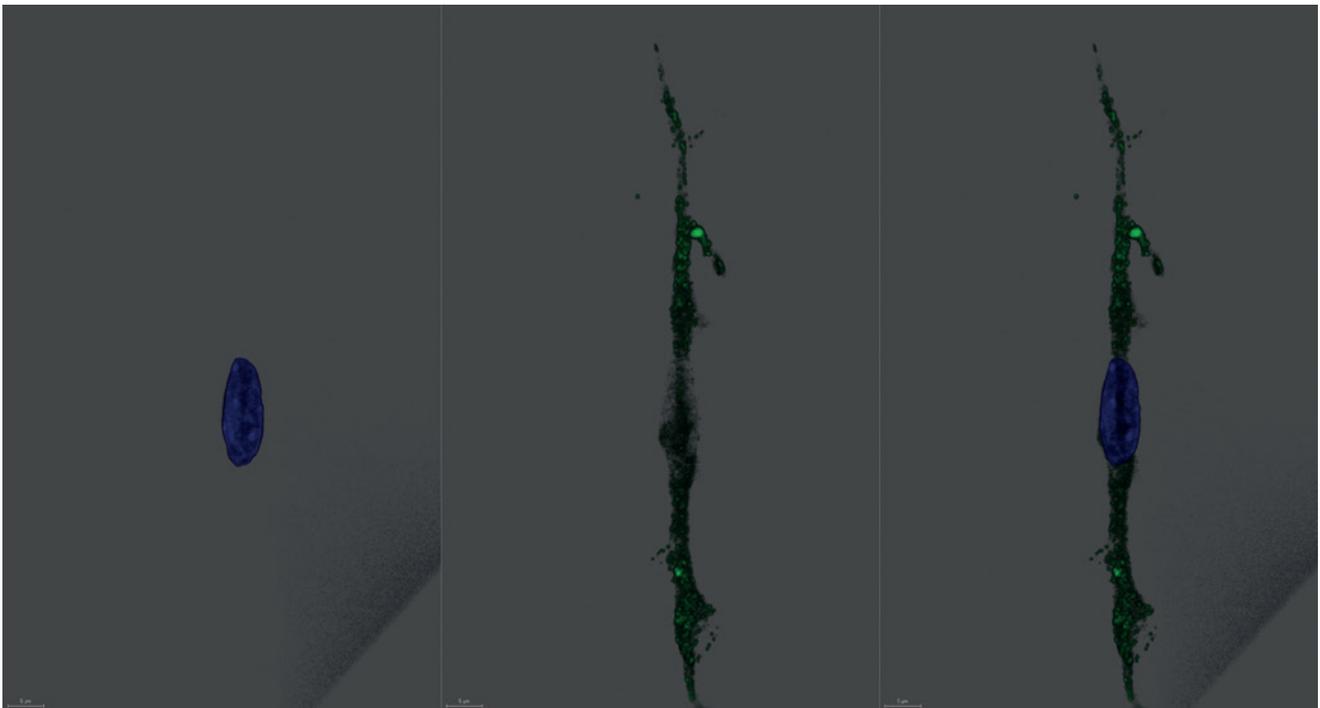
**Электрофизиология.** Исследование функциональных характеристик ионных токов было выполнено с помощью стандартного метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигура-



**Рис. 3.** Компактная зона АВУ (указана кружочком) с центральной артерией АВУ и центральным фиброзным телом (указано стрелкой). Окраска гематоксилином и эозином;  $\times 100$ .



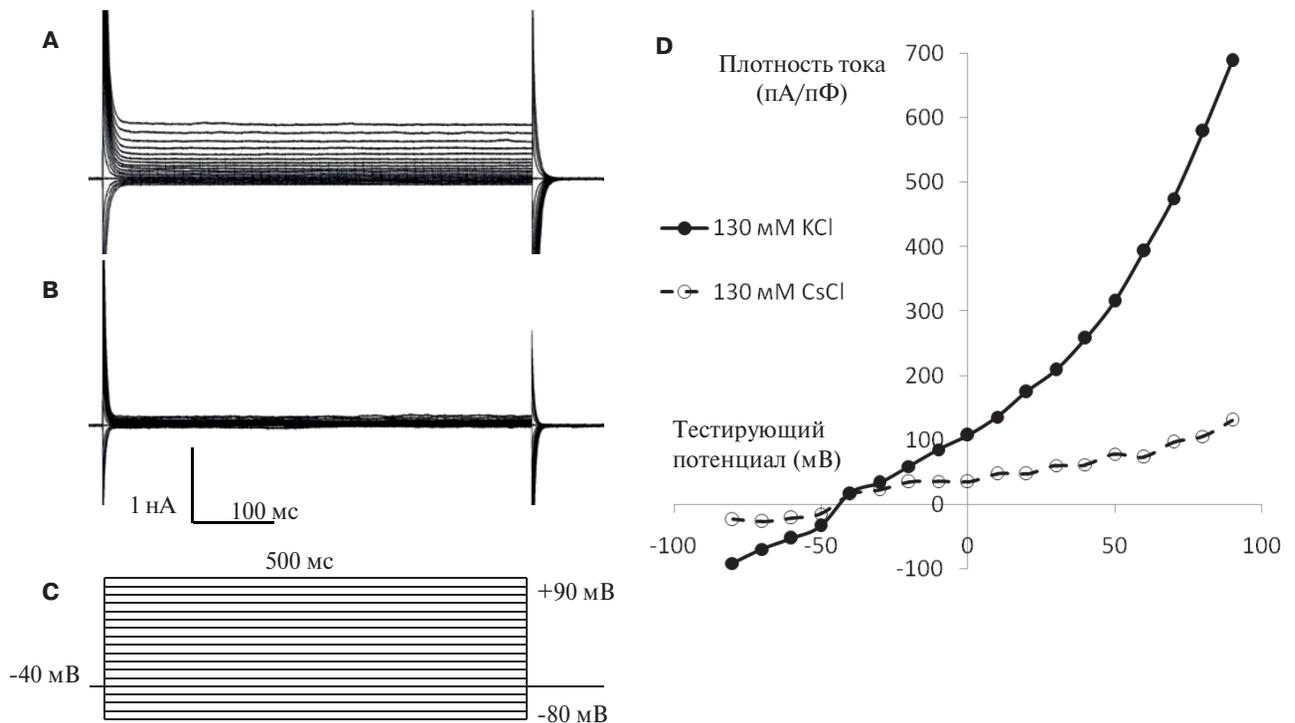
**Рис. 4.** Телоцит АВУ сердца реципиента Ч., 57 лет при фазово-контрастной микроскопии культуры;  $\times 200$ .



**Рис. 5.** Лазерная конфокальная микроскопия телоцитов АВУ свиньи в культуре сердца. Зеленая флуоресценция — на телоподиях CD117+ телоцита, синяя — в ядре (DAPI);  $\times 200$ . Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

ции whole cell (“целая клетка”) на экспериментальной установке на основе усилителя Axopatch 200B и аналого-цифрового преобразователя Digidata 1440A (MolecularDevices, США) при комнатной температуре. Регистрация и первичная обработка данных была осуществлена с помощью программного пакета Clampex 10.3 (MolecularDevices, США). Микропипетки с сопротивлением 1,5-2,5 МОм изготавливались из боросиликатных стеклянных капилляров (BF-150-110-10, Sutter Instruments, США) с помощью горизонтальной вытяжки для

микроэлектродов P-1000 (Sutter Instruments, США). Последовательное сопротивление компенсировалось на 85-90%. Для записи токов клетки помещались в раствор следующего состава (в мМ): NaCl — 140, KCl — 5, CaCl<sub>2</sub> — 1,8, MgCl<sub>2</sub> — 1, Hepes-NaOH — 10, глюкоза — 10 (pH 7,4, NaOH). Пипеточный раствор использовался следующего состава (в мМ): KCl — 130, MgCl<sub>2</sub> — 1, MgATP — 5, фосфокреатин — 5, HEPES — 10, EGTA — 5 (pH 7,3, KOH). Для записи Na<sup>+</sup> тока соли K<sup>+</sup> заменялись на соли Cs<sup>+</sup>. Запись токов выполнялась через 5-10 мин после образования



Примеры записи токов в телецитах, (A) при 130 mM KCl, (B) при 130 mM CsCl в пипеточном растворе. (C) протокол подачи тестирующих стимулов. (D) Вольт-амперная характеристика токов.

Рис. 6. Калиевый ток, зарегистрированный методом локальной фиксации потенциала в телецитах.

конфигурации whole cell. Для характеристики токов рассчитывалась плотность и анализировалась вольт-амперная зависимость. Исследование выполнялось на культурах ТЦ 5 пациентов и 2 свиной АБУ и перифокальной зоны СУ.

**Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия.** С помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) исследовались культуры ТЦ (у 3 пациентов) и гистологические срезы миокарда ПП рядом с СУ (у 2 пациентов). Использовались первичное антитело к c-Kit (CD117) и коктейль первичных антител CD34/Anti-NaV1.5.

В качестве вторичных антител применялись AlexaFluor 647<sup>®</sup> goat anti-mouse (Abcam), AlexaFluor 488<sup>®</sup> goat anti-rabbit (Abcam, Великобритания). После промывания клетки тканевые срезы контрастировались с DAPI (appliChem). В результате мышинные антитела имели красную флуоресценцию, кроличьи — зеленую, двойное (одновременное) окрашивание антителами — оранжево-желтую флуоресценцию, а ядра клеток окрашивались в синий цвет. КЛСМ проводилась на OlympusFV1000D (Япония). Это же оборудование использовалось и для функционального анализа культур ТЦ.

**Синхронная регистрация колебаний внутриклеточных ионов свободного кальция и митохондриального потенциала, вызванных увеличением концентрации кальция во внешней среде.** Клетки первичной культуры ТЦ, полученной из АБУ свиньи, помещали в слайды

с тонким дном, культивировали 24 ч. Затем клетки окрашивались прижизненными флуоресцентными трекерами, позволяющими выявлять свободные ионы кальция (Fluo-4(20 μM/L)) [6] и митохондриальный потенциал (TMRM (20 μM/L)).

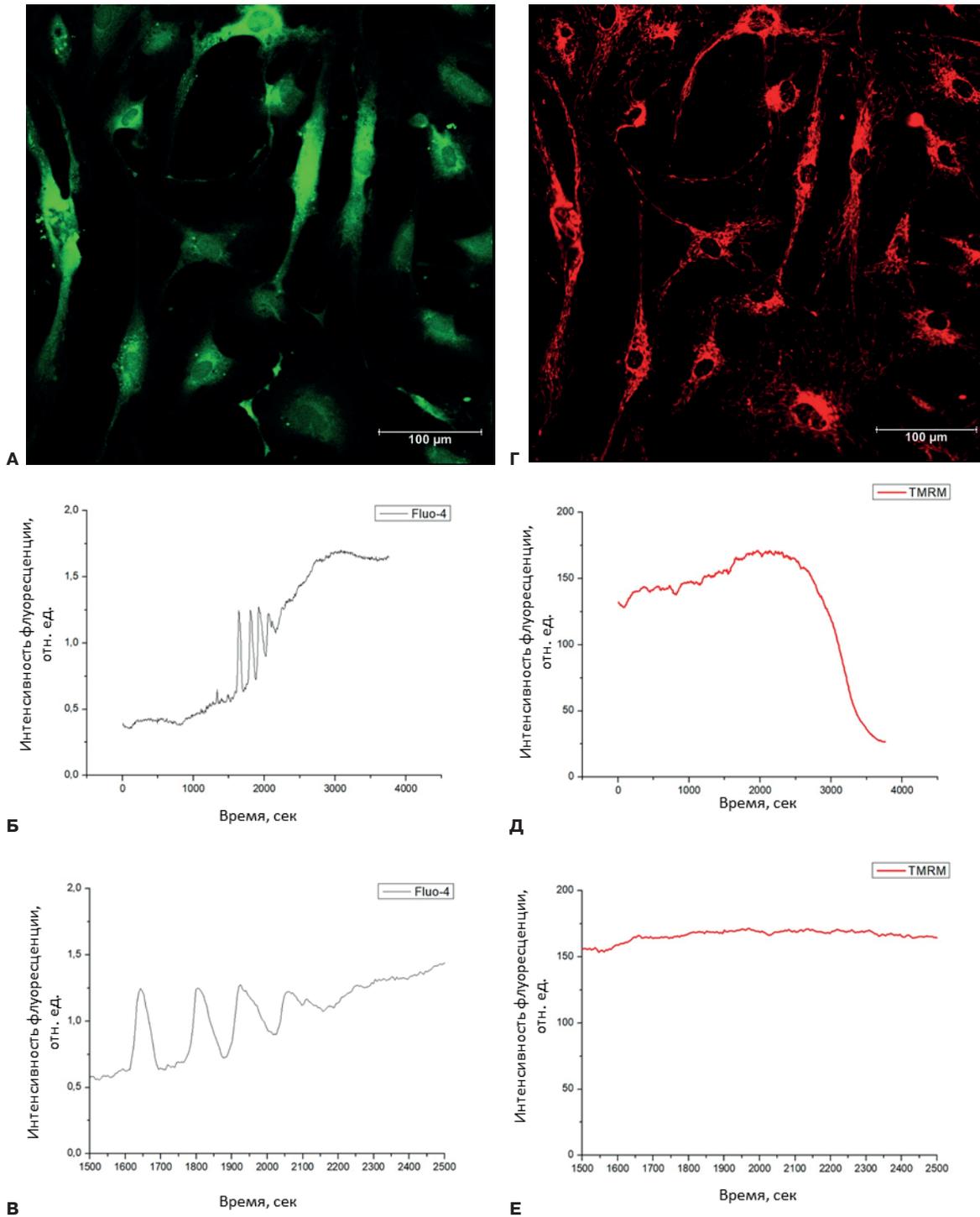
Использовали КЛСМ и 20x объектив с масляной иммерсией.

Для возбуждения флуоресценции красителей использовали аргоновый лазер (50% мощности) с длиной волны 488 нм (Fluo-4-AM) и 561 нм (TMRM). Регистрацию флуоресценции проводили с помощью двух фотоумножителей в спектральном диапазоне 493-540 нм для Fluo-4 и 590-690 нм для митохондриального потенциала.

В выбранных участках производилась регистрация изменений интенсивности флуоресцентного сигнала во времени (режим хвт) в течение 1 ч после добавления в культуральную среду 10 mM CaCl<sub>2</sub> с временным разрешением 12 кадров/мин. Определённые области интереса (ROI, regions of interest) располагались вокруг ядра клетки в пределах отдельного ТЦ. Исследование выполнялось на культуре АБУ одной свиньи.

### Результаты

В результате исследования серийных гистологических срезов АБУ было получено представление, что зона, из которой забирался материал для выращивания культур ТЦ, действительно является специали-

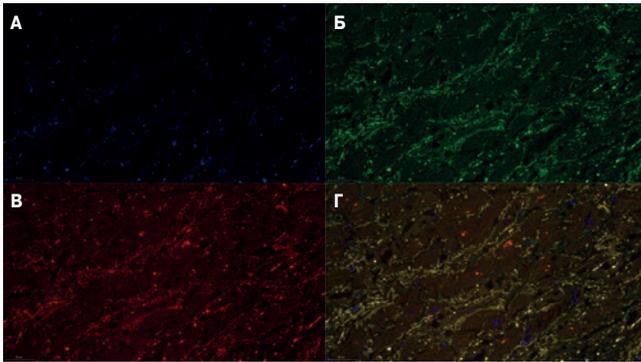


**Рис. 7.** Прижизненная конфокальная микроскопия культуры клеток, окрашенных на кальций (А) и митохондриальный потенциал (Г). Кальциевые осцилляции (Б, В) и митохондриальный потенциал (Д, Е) тельцов после добавления 10 мМ CaCl<sub>2</sub>. На графиках представлены полученные сигналы от одной клетки.

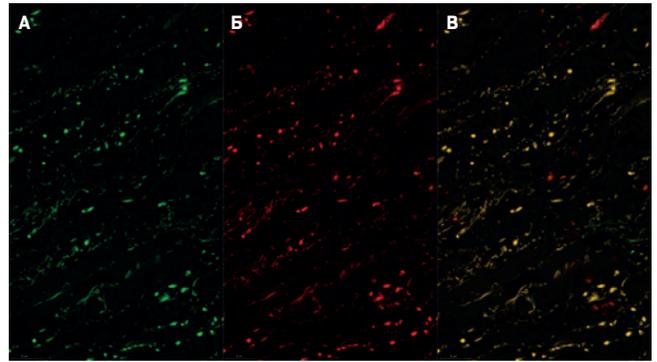
зированной структурой проводящей системы сердца (рис. 3).

Фазовая контрастная микроскопия и КЛСМ показали, что культуры, выращенные из фрагментов АВУ всех пациентов и свиней, представлены действительно ТЦ (рис. 4, 5).

С помощью метода локальной фиксации потенциала в культуре ТЦ из перифокальной зоны СУ и АВУ 5 реципиентов при трансплантации сердца, а также из АВУ 2 свиней в интерстициальных пейсмекерах был зафиксирован калиевый ток плотностью 700 пА/пФ при деполяризации мембраны до +90 мВт (рис. 6).



**Рис. 8.** Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Миокард ПП реципиентки Г., 50 лет из соседней с синусным узлом зоны. **А.** Синяя иммунофлюоресценция ядер клеток (DAPI). **Б.** Зеленая иммунофлюоресценция CD34 на вытянутых клетках и сосудах между кардиомиоцитами. **В.** Красная иммунофлюоресценция Anti-NaV1.5 в кардиомиоцитах и на вытянутых клетках между кардиомиоцитами. **Г.** Желтая иммунофлюоресценция на вытянутых клетках между кардиомиоцитами свидетельствует о коэкспрессии CD34 и Anti-NaV1.5; x200. Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.



**Рис. 9.** Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Соседняя с синусным узлом зона фиброзной ткани ПП реципиента Д., 59 лет. **А.** Зеленая иммунофлюоресценция CD34 на вытянутых клетках. **Б.** Красная иммунофлюоресценция Anti-NaV1.5 на вытянутых клетках свидетельствует о коэкспрессии CD34 и Anti-NaV1.5; x400. Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

С помощью прижизненной конфокальной микроскопии был исследован эффект добавления во внеклеточную среду хлорида кальция (10 мМ) на динамику концентрации внутриклеточных свободных ионов кальция и митохондриального потенциала.

Анализ полученных сигналов позволил выделить несколько стадий, предшествующих гибели клеток. На первой стадии в результате повышения концентрации кальция начинали более интенсивно работать митохондрии, и наблюдались кальциевые осцилляции с периодом порядка 200 сек. Затем наступали необратимые изменения и клеточная гибель (рис. 7).

На графиках представлены полученные сигналы от одной клетки.

Для доказательства наличия натриевых каналов в ТЦ использовался коктейль антител CD34/Anti-NaV1.5. При КЛСМ было обнаружено желтое свечение вытянутых клеток между мышечными волокнами рабочего миокарда и среди фиброзной ткани ПП, граничащей с СУ в сердце реципиента, свидетельствующее о коэкспрессии CD34 и Anti-NaV1.5 (рис. 8, 9).

Таким образом, результаты исследования показали, что в АВУ людей и свиней, равно как и в миокарде ПП, есть ТЦ. ТЦ ПП в соседней с СУ зоне 2 пациентов продемонстрировали наличие натриевых каналов. В культурах ТЦ АВУ и перифокальной зоны СУ людей и свиней был зарегистрирован калиевый ток, а в ТЦ АВУ свиней — кальциевые осцилляции и митохондриальный потенциал.

### Обсуждение

В данном исследовании мы впервые показали наличие ТЦ в АВУ у человека и свиньи и их некоторые

электрофизиологические свойства. Методом patch-clamp в культурах ТЦ из АВУ и перифокальной зоны СУ был зафиксирован калиевый ток плотностью 700 пА/пФ при деполяризации мембраны до +90 мВт, характеристики которого наиболее близки к таковым у фибробластов сердца [7]. Многочисленными исследованиями было доказано, что не только кардиомиоциты, но и фибробласты генерируют механоиндуцированные потенциалы (МИП). Амплитуда МИП фибробластов либо соизмерима с величиной потенциала действия кардиомиоцитов, либо значительно меньше его. МИП фибробластов возникает в ответ на сокращение сердца. Дополнительное растяжение ткани спонтанно сокращающегося сегмента сердца вызывает сдвиг потенциала покоя в сторону гиперполяризации мембраны фибробласта, в то время как кардиомиоциты на растяжение реагируют деполяризацией. Нисходящую фазу МИП, по-видимому, обуславливает ток, который возникает за счет выхода из клетки  $K^+$  через калиевые каналы, активируемые кальцием. Возможно, ТЦ в АВУ и перифокальной зоне СУ выполняют аналогичную роль. В то же время результаты исследования Sheng J, et al. [8] показали, что функционально компетентные  $K^+$  каналы присутствуют в ТЦ предсердий и желудочков человека, и их модуляция может иметь существенное значение в физиопатологии миокарда. Авторы зафиксировали значительной силы  $K^+$  ток, активированный  $Ca^{2+}$  (каналы с высокой проводимостью ВКСа) из  $Ca^{2+}$ -чувствительных  $K^+$  каналов) и  $K^+$  ток входящего выпрямления (IKir), но не переходный  $K^+$  ток (Ito) и не чувствительный к аденозинтрифосфату  $K^+$  ток. Обнаруженные каналы относятся к потенциал-управляемым  $K^+$  каналам. Они активируются при деполяризации, присутствуют в возбудимых и невозбудимых клетках, регулируют потенциал покоя мембраны, определяют форму и частоту потенциала действия [9].

Использование прижизненных флюоресцентных трекеров позволяет одновременно выявлять свободные ионы кальция (Fluo-4) и митохондриальный потенциал (TMRM), а применение прижизненной конфокальной микроскопии с последующим анализом временных рядов полученных сигналов — исследовать патологические процессы в развитии, что и было выполнено нами на ТЦ культуры. Таким образом, в ТЦ АБУ свиней впервые были обнаружены кальциевые осцилляции и зарегистрированы изменения митохондриального потенциала, вызванные повышением концентрации кальция во внеклеточной среде. Ионы кальция играют ключевую роль в регуляции электрических и механических свойств миокарда. В ишемизированном сердце кальциевые осцилляции, возникающие в кардиомиоцитах в результате повышения внутриклеточной концентрации кальция, рассматриваются как аритмогенный субстрат [10].

Потенциал-управляемые  $\text{Ca}^{2+}$  каналы идентифицированы в мембране клеток, обладающих электрической возбудимостью (сердечная мышца, гладкомышечные клетки, нейроны, эндокринные). В некоторых клетках помимо потенциал-управляемой инактивации описана  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая инактивация, связанная с повышением внутриклеточного содержания ионов кальция во время деполяризующего импульса. По фармакологической классификации  $\text{Ca}^{2+}$  каналы делятся на L, N и T каналы. Каналы L-типа идентифицированы в нейронах, кардиомиоцитах, скелетной и гладкой мускулатуре, N-типа — в нервной системе, участвуют в работе сердца и почек. Каналы T-типа были обнаружены в фибробластах и В-лимфоцитах, они активируются при слабой деполяризации [11]. Кальциевые каналы L-типа были обнаружены в ТЦ мочевого пузыря, кальциевые каналы T-типа (субъединицы Cav3.1 и Cav3.2) — в ТЦ в мочевом пузыре, предстательной железе и миометрии [12, 13].

Основные токи через мембраны клеток сердца связаны с транспортом катионов  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ . При этом каждый ионный ток ( $I_K$ ,  $I_{Na}$ ,  $I_{Ca}$  и т. д.) складывается из суммы соответствующих токов, протекающих по множеству “одиночных каналов”, тождественных между собой по своей структуре, селективности и механизму регуляции. Движущей силой для пассивного транспорта ионов через мембрану является электрохимический потенциал, со-

стоящий из двух компонентов — концентрационного градиента ионов (разности их концентраций с внешней и внутренней стороны мембраны) и трансмембранной разности электрических потенциалов. Деполяризация мембраны миоцитов миокарда млекопитающих обеспечивается быстрыми входящими  $\text{Na}^+$  токами через соответствующие ионные каналы.  $\text{Na}^+$  каналы в миокарде являются потенциал-зависимыми [14]. Электрофизиологические исследования миометрии человека не смогли доказать наличие токов  $\text{Na}^+$  в ТЦ [15], в то время как наше исследование продемонстрировало наличие натриевых каналов (SCN5A) в ТЦ перифокальной зоны СУ у людей с помощью КЛСМ с использованием антитела к Anti-NaV1.5. Этот факт свидетельствует о различии электрофизиологических свойств ТЦ в разных органах.

Таким образом, с помощью морфологических и электрофизиологических методов в нашем исследовании было показано наличие  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  каналов в ТЦ. ТЦ имеют электрофизиологические характеристики, схожие как с кардиомиоцитами, так и с фибробластами. Дальнейшие электрофизиологические и другие виды исследования с привлечением новых методов и на большем материале помогут составить более ясное представление о функциях ТЦ в сердце. Исследование этих клеток является захватывающей областью, которая только начинает менять способ изучения развития и функционирования органов.

**Ограничения исследования.** Исследования методом patch-clamp выполнены на культурах ТЦ 5 пациентов и 2 свиней, синхронная регистрация колебаний внутриклеточных ионов свободного кальция и митохондриального потенциала — на 1 сердце свиньи.

### Заключение

В АБУ человека и свиньи были обнаружены ТЦ, в культурах которых методом patch-clamp определялся  $\text{K}^+$  ток и кальциевые осцилляции с митохондриальным потенциалом. В ТЦ перифокальной зоны СУ человека были обнаружены натриевые каналы SCN5A, что свидетельствует о возможности проведения электрического импульса.

**Отношения и деятельность:** все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

## Литература/References

1. Zhu YF, Wang XY, Lowie BJ, et al. Enteric sensory neurons communicate with interstitial cells of Cajal to affect pacemaker activity in the small intestine. *Pflugers Arch*. 2014;466:1467-75. doi:10.1007/s00424-013-1374-1.
2. Si X, Huang L, Gong Y, et al. Role of calcium in activation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels caused by cholecystokinin octapeptide in interstitial cells of cajal. *Digestion*. 2012;85(4):266-75. doi:10.1159/000337077.
3. Banciu DD, Banciu A, Radu BM. Electrophysiological Features of Telocytes. In Wang X., Cretoiu D., eds. *Telocytes Connecting cells*. Singapore: Springer. 2016. p.287-302. ISBN: 978-981-10-1061-3.
4. Mitrofanova LB, Gorshkov AN, Konovalov PV, et al. Syno-atrial node telocytes in the human heart. Morphological evidence for pacemaking and conduction properties. *Russian Journal of Cardiology*. 2017;(9):42-9. (In Russ.) Митрофанова Л.Б., Горшков А.Н., Коновалов П.В. и др. Телоциты в синоатриальном узле человека. Морфологическое доказательство пейсмекерной активности клеток и возможности проводить электрический импульс. *Российский кардиологический журнал*. 2017;22(9):42-9. doi:10.15829/1560-4071-2017-9-42-49.
5. Verkerk AO, Wilders R, van Borren MMGJ, et al. Pacemaker current (If) in the human sinoatrial node. *European Heart Journal*. 2007;28:2472-8. doi:10.1093/eurheartj/ehm339.
6. Kubasov IV, Bobkov DE. Optical and electrical responses of cardiomyocytes in an isolated rat heart during development of hypoxia. *Russian Journal of Physiology*. 2018;104(6):670-5. (In Russ.) Кубасов И.В., Бобков Д.Е. Оптические и электрические ответы кардиомиоцитов в изолированном сердце крысы при развитии гипоксии. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2018;104(6):670-5. doi:10.7868/S0869813918060096.
7. Yue L, Xie J, Nattel S. Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2011;89(4):744-53. doi:10.1093/cvr/cvq329.
8. Sheng J, Shim W, Lu J, et al. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2014;18(2):355-62. doi:10.1111/jcmm.12240.
9. Mel'nikov KN, Vislobokov AI, Kolpakova ME, et al. Potassium of ionic channels of cellular membranes. *Reviews of clinical pharmacology and drug therapy*. 2009;7(1):3-27. (In Russ.) Мельников К.Н., Вислобоков А.И., Колпакова М.Э. и др. Калиевые ионные каналы клеточных мембран. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2009;7(1):3-27.
10. Landstrom AP, Dobrev D, Wehrens XHT. Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias. *Circ Res*. 2017;120(12):1969-93. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.310083.
11. Melnikov KN. Calcium channels of excitable membranes. *Reviews of clinical pharmacology and drug therapy*. 2007;5(1):28-42. (In Russ.) Мельников К.Н. Кальциевые каналы возбудимых мембран. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2007;5(1):28-42.
12. Lang RJ, Tonta MA, Takano H, et al. Voltage-operated Ca<sup>2+</sup> currents and Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> currents in single interstitial cells of the guinea pig prostate. *BJU Int*. 2014;114(3):436-46. doi:10.1111/bju.12656.
13. Cretoiu SM, Radu BM, Banciu A, et al. Isolated human uterine telocytes: immunocytochemistry and electrophysiology of T-type calcium channels. *Histochem Cell Biol*. 2015;143(1):83-94. doi:10.1007/s00418-014-1268-0.
14. DiFrancesco D. Sinoatrial If current: a target for specific heart rate reduction. *Medicographia*. 2002;24(3):218-24.
15. Duquette RA, Shmygol A, Vaillant C, et al. Vimentin-positive, c-kit-negative interstitial cells in human and rat uterus: a role in pacemaking? *Biol Reprod*. 2005;72(2):276-83. doi:10.1095/biolreprod.104.033506.