

УСТОЙЧИВОСТЬ ПРЕДСЕРДНОГО МИОКАРДА КУРИНОГО ЭМБРИОНА К ИНГИБИРОВАНИЮ HCN-КАНАЛОВ И КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ “Ca²⁺-ЧАСОВ”

© 2023 г. Е. А. Лебедева¹, *, М. А. Гонотков¹

¹Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения
Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

*E-mail: lebedeva.physiol.komisc@ya.ru

Поступила в редакцию 22.05.2023 г.

После доработки 12.07.2023 г.

Принята к публикации 12.07.2023 г.

В настоящее время клеточные основы автоматизма сердца эмбрионов, в частности вклад различных ионных механизмов, до конца не ясны и активно изучаются. С помощью микроэлектродной техники мы исследовали фармакологическую чувствительность клеток водителя ритма правого предсердия куриного эмбриона (HH36) к ивабрадину (ингибитор HCN-каналов, по которым протекает ток, активируемый гиперполяризацией (I_f), рианодину (агоноист рианодиновых рецепторов) и SN6 (ингибитор Na⁺/Ca²⁺-обменного механизма). Установлено, что у клеток правого предсердия, обладающих фазой медленной диастолической деполяризации, экспозиция ивабрадина (3 мкМ) не вызывала достоверных изменений электрофизиологических параметров потенциалов действия. Рианодин (1 мкМ) и SN6 (10 мкМ) при добавлении в перфузирующий раствор вызывали сходные эффекты — повышение частоты генерации потенциалов действия в среднем на 15%. При этом не зарегистрировано нарушения автоматизма или прекращения спонтанной активности. Полученные результаты позволяют заключить, что HCN4-каналы, рианодиновые рецепторы и Na⁺/Ca²⁺-обменный механизм на данном этапе эмбрионального развития не являются определяющими для поддержания автоматизма клеток правого предсердия у куриного эмбриона. Вероятно, ионные токи, протекающие через эти каналы и играющие важную роль в электрофизиологии у взрослых животных, в эмбриональном миокарде выполняют модулирующую функцию.

Ключевые слова: куриный эмбрион, HCN-каналы, рианодиновые рецепторы, Na⁺/Ca²⁺-обменный механизм, автоматизм, ивабрадин, рианодин

DOI: 10.31857/S0869813923080071, EDN: WAXHUW

ВВЕДЕНИЕ

Сердце является первым органом, формирующимся во время эмбриогенеза. Его функционирование имеет решающее значение для развития и выживания эмбриона. Несмотря на недавние достижения в медицине, генетике и физиологии механизмы формирования спонтанных импульсов, роль отдельных ионных токов в инициации автоматизма, а также возникновения дисфункции развивающегося сердца в настоящее время до конца не ясны [1].

Поскольку большая часть эмбриональных кардиомиоцитов обладает автоматизмом и способна генерировать электрические импульсы, то представления о роли

ионных токов в эмбриональном миокарде сложились на основе работ, выполненных на кардиомиоцитах желудочков куриных [2–4] и мышинных [5] эмбрионов или стволовых клеток различного происхождения [6–8]. Однако ведущая область сокращений эмбрионального сердца формируется в зоне венозного синуса и будущего предсердия [9, 10], и уже на стадии трубчатого сердца примитивные предсердие и желудочек демонстрируют разную морфологию потенциалов действия [9, 11]. Это позволяет предположить, что и механизмы, инициирующие электрические импульсы, могут иметь различия в зависимости от зоны эмбрионального миокарда. Очевидно, что знание функционирования клеток желудочков эмбриональных сердец или эмбриональных стволовых клеток недостаточно для понимания механизмов автоматизма клеток водителя ритма эмбрионального миокарда [9].

У взрослых животных спонтанное сокращение миоцитов возникает в области синусно-предсердного узла и инициируется сложной связанной системой клеточных “часов”. Первая подсистема, называемая “мембранными часами”, включает сарколеммальные ионные каналы, в частности HCN-каналы, по которым протекает ток, активируемый гиперполяризацией (I_f). Вторая подсистема, называемая “Ca²⁺-часами”, относится к механизмам, ответственным за регуляцию внутриклеточной концентрации Ca²⁺: высвобождение кальция из саркоплазматического ретикулума через рианодиновые рецепторы активирует направленный внутрь ток Na⁺/Ca²⁺-обменного механизма (I_{NCX}), который способствует медленной диастолической деполяризации [12–14].

Наиболее перспективным в настоящее время является рассмотрение становления этих двух механизмов в период эмбриогенеза, поскольку позволит не только понять процессы генерации и регуляции автоматизма, но и расшифровать клеточные и молекулярные механизмы, лежащие в основе врожденных сердечных патологий, что будет содействовать разработке способов направленного фармакологического регулирования активности клеток [10].

Поэтому целью нашей работы стало с использованием микроэлектродной техники и специфических фармакологических веществ оценить функциональный вклад HCN-каналов, по которым протекает ток I_f , рианодиновых рецепторов и Na⁺/Ca²⁺-обменного механизма в генерацию электрических импульсов миокарда куриного эмбриона. В отличие от предыдущих работ, наше исследование проведено на спонтанно сокращающихся препаратах правого предсердия куриного эмбриона в условиях, когда сохраняется электрическое взаимодействие между клетками, и в зоне, где возникает электрическая активность сердца.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оплодотворенные яйца породы кросс КОББ-500 (*Gallus gallus*), полученных с АО “Птицефабрика Зеленецкая”, помещали в инкубатор с регулируемой температурой (38.5°C) и влажностью (55%). В экспериментах использовали эмбрионов в возрасте 10 ± 1 сут (примерно на стадии HH36 по классификации Hamburger и Hamilton [15]). На этой стадии сердце уже имеет четыре камеры, заканчивается формирование синусно-предсердного узла, но при этом влияние нервной системы незначительно.

После извлечения эмбриона, производили декапитацию и вырезали сердце, которое помещали в нормальный солевой раствор следующего состава (мМ): 140 NaCl; 10 NaHCO₃; 5.4 KCl; 1.8 CaCl₂; 1 MgSO₄; 0.33 Na₂HPO₄, 10 глюкоза; 5 HEPES (pH 7.4). Затем отрезали желудочки и левое предсердие, правое предсердие вскрывали и расправляли таким образом, чтобы был доступ к области клапанов каудальной полый вены — места формирования электрических импульсов. Спонтанно со-

кращающийся препарат помещали в проточную, аэрируемую, термостатируемую камеру (31°C). Потенциалы действия регистрировали с помощью стандартного микроэлектродного метода регистрации биоэлектрических потенциалов.

Для фармакологического анализа использовали ивабрадин (блокатор HCN-каналов, 3 мкМ), рианодин (агонист рианодиновых рецепторов, 1 мкМ) и SN6 (блокатор $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма, 10 мкМ). Все компоненты изготовлены фирмой Sigma-Aldrich (США).

Для анализа зарегистрированных потенциалов действия использовали программу PowerGraph Professional версия 3.3 (DIsoft, РФ), а также оригинальные программы вычисления параметров потенциалов действия в программной среде Delphy, разработанной старшим научным сотрудником Института физиологии Коми НЦ УрО РАН д.б.н. Артеевой Н.В. Значимость различий параметров потенциала действия определяли с помощью непараметрического критерия Вилкоксона для связанных выборок и U -критерия Манна–Уитни для несвязанных ($p < 0.05$). Результаты представлены в виде средней арифметической $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm \sigma$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В контрольном растворе в правом предсердии в области клапана каудальной полой вены со стороны субэндокарда зарегистрированы потенциалы действия (ПД), по своей конфигурации схожие с ПД клеток рабочего миокарда предсердия, однако обладающие фазой медленной диастолической деполяризации (фаза 4, пейсмейкерный потенциал). Частота генерации ПД этих клеток в среднем составила 168 ± 29 имп./мин, а скорость фазы быстрой деполяризации ($dV/dt_{\max}$) и скорость фазы медленной диастолической деполяризации (V_4) — 102 ± 35 В/с и 39 ± 14 мВ/с соответственно ($n = 22$).

С помощью специфических блокаторов ионных каналов у данного типа клеток был оценен вклад HCN-каналов, рианодиновых рецепторов и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма в формировании автоматизма.

Эффекты ивабрадина на генерацию ПД у куриных эмбрионов

Ивабрадин представляет собой селективный блокатор семейства HCN-каналов, по которым протекает ток, активируемый гиперполяризацией (I_f , “funny” ток). Добавление в перфузирующий раствор ивабрадина (3 мкМ, $n = 9$) не вызывало достоверных изменений в конфигурации электрофизиологических параметров ПД у клеток правого предсердия куриного эмбриона (рис. 1а, табл. 1).

Эффекты рианодина на генерацию ПД у куриных эмбрионов

Экспозиция рианодина в концентрации 1 мкМ ($n = 7$) приводила к укорочению фазы медленной диастолической деполяризации. В результате частота генерации ПД увеличивалась на $15 \pm 8\%$ (рис. 1б, табл. 1). Нарушения ритмической активности, появление пауз или прекращения генерации ПД при действии рианодина не зарегистрировано даже при продолжительной экспозиции (60 мин).

Эффекты SN6 на генерацию ПД у куриных эмбрионов

В серии экспериментов с SN6 (10 мкМ, $n = 11$) установлено, что пять препаратов правого предсердия куриного эмбриона из одиннадцати оказались к нему не чувствительны — добавление в перфузирующий раствор блокатора не приводило к изменениям конфигурации ПД. У оставшихся шести препаратов экспозиция SN6 вызывала повышение частоты генерации ПД на $15 \pm 9\%$ за счет укорочения дли-

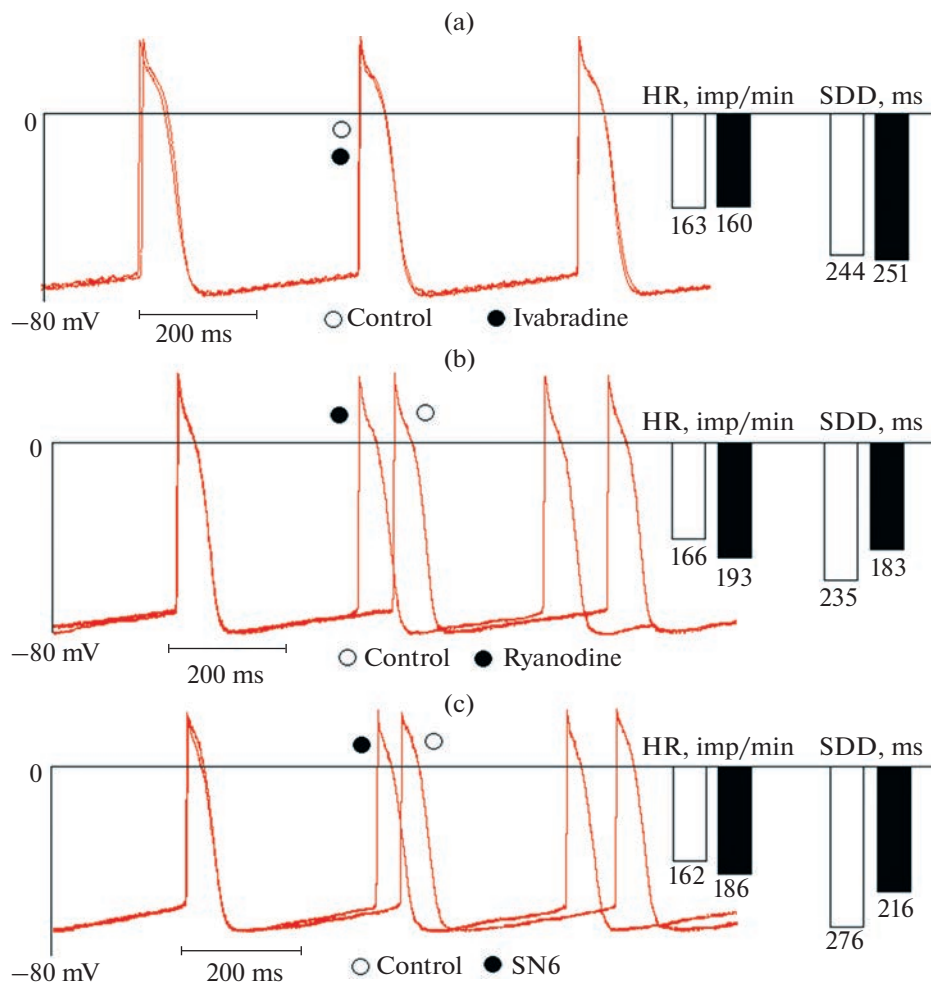


Рис. 1. Конфигурация потенциалов действия клеток правого предсердия куриного эмбриона в контроле и при действии различных ингибиторов. (а) – эффекты ивабрадина (3 мкМ), ингибитора HCN-каналов; (б) – эффекты рианодина (1 мкМ), агониста RyR-каналов; (с) – эффекты SN6 (10 мкМ), ингибитора $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма. HR – частота генерации ПД, имп./мин; SDD – длительность медленной диастолической деполяризации, мс.

тельности фазы медленной диастолической деполяризации на $18 \pm 9\%$ по сравнению с контролем (рис. 1с, табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время все больше работ демонстрируют, что механизм спонтанной деполяризации клеток водителя ритма сердца обусловлен взаимодействием мембранных и кальциевых часов. При этом предполагается, что $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменный механизм играет основную роль в сопряжении внутриклеточного высвобождения Ca^{2+} и деполяризацией мембраны [12–14]. Однако каким образом эти механизмы возникают и взаимодействуют в эмбриональном сердце, остается неясным.

Таблица 1. Электрофизиологические параметры ПД в контроле и при действии блокаторов ионных каналов у клеток, работающих в режиме водителя ритма правого предсердия куриного эмбриона

Параметры ПД	Контроль <i>n</i> = 9	Ивабрадин, 3 мкМ <i>n</i> = 9	Контроль <i>n</i> = 7	Рианодин, 1 мкМ <i>n</i> = 7	Контроль <i>n</i> = 6	SN6, 10 мкМ <i>n</i> = 6
$E_{\max}$	-81 ± 7	-79 ± 7	-74 ± 7	-77 ± 5	-80 ± 7	-78 ± 5
АПД	104 ± 13	103 ± 7	95 ± 9	99 ± 12	104 ± 11	103 ± 7
ДПД ₂₀	34 ± 7	42 ± 10	32 ± 9	30 ± 13	43 ± 13	37 ± 16
ДПД ₉₀	80 ± 10	84 ± 11	75 ± 9	72 ± 13	88 ± 15	81 ± 18
ЧСС	168 ± 10	166 ± 17	174 ± 19	$200 \pm 16^*$	146 ± 17	$168 \pm 15^*$
МДД	251 ± 27	252 ± 42	247 ± 31	$205 \pm 31^*$	303 ± 38	$251 \pm 26^*$
$dV/dt_{\max}$	108 ± 32	103 ± 33	86 ± 32	83 ± 36	101 ± 44	86 ± 43
V_4	40 ± 17	44 ± 18	55 ± 13	68 ± 19	36 ± 4	$47 \pm 12^*$

$E_{\max}$ – максимальный диастолический потенциал, мВ; АПД – амплитуда ПД, мВ; ДПД₂₀ и ДПД₉₀ – длительность потенциала действия на уровне 20 и 90% реполяризации, мс; ЧСС – частота генерации ПД, имп./мин; МДД – длительность медленной диастолической деполаризации, мс; $dV/dt_{\max}$ – скорость фазы быстрой деполаризации, В/с; V_4 – скорость фазы медленной диастолической деполаризации, мВ/с; *n* – количество препаратов; * – $p < 0.05$ достоверность различий по сравнению с контролем.

С помощью фармакологического анализа мы провели оценку вклада HCN-каналов, рианодиновых рецепторов и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма в генерацию электрических импульсов эмбрионального миокарда куриного эмбриона.

Роль HCN-каналов в генерации электрических импульсов

Семейство HCN-каналов (HCN1–4), по которым протекает ток, активируемый гиперполяризацией (I_f , “funny” ток), является одним из важных механизмов генерации импульсов у взрослых животных [13]. Установлено, что у куриных эмбрионов каналы HCN4 экспрессируются уже на стадии сердечной трубки по всему миокарду, но по мере формирования сердца их экспрессия постепенно ограничивается проводящей системой [16]. В то же время установлено, что диапазон активации I_f в препаратах предсердия куриных эмбрионов составляет от -120 до -90 мВ, что ниже физиологического диапазона мембранных потенциалов этих клеток, и добавление I_f в модель электрической активности не влияло на частоту генерации ПД [2, 3].

С помощью ивабрадина мы проанализировали функциональный вклад HCN4-каналов в генерацию электрической активности клеток правого предсердия куриного эмбриона. Несмотря на то, что зарегистрированные ПД обладали пейсмекерных потенциалом, ивабрадин не оказывал достоверного эффекта на электрофизиологические параметры ПД.

Полученные нами данные и анализ литературы позволяют предположить, что HCN-каналы, по-видимому, играют важную роль в качестве факторов морфогенетического контроля во время кардиогенеза [16, 17], но их вклад в автоматизм пейсмекерных клеток эмбрионального миокарда незначителен.

Роль рианодиновых рецепторов в генерации электрических импульсов

Спонтанное высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума, также известное как “ Ca^{2+} -часы”, было предложено в качестве еще одного механизма генерации синусового ритма [12].

Известно, что у взрослых животных рианодин в концентрации 0.3 – 3 мкМ, в которой он является агонистом рианодиновых рецепторов, на первых минутах вызы-

вает небольшое увеличение частоты сердечных сокращений. Предполагается, что рианодин увеличивает выброс Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума, что приводит к усилению работы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма. Однако дальнейшая экспозиция рианодина приводит к постепенному замедлению сердечного ритма на 14–30% [18–20].

В наших экспериментах при добавлении рианодина (1 мкМ) в перфузирующий раствор на первой минуте экспозиции мы наблюдали повышение частоты генерации ПД в среднем на 15%, которое сохранялась в течение всей экспозиции (до 60 мин). Нами не было зафиксировано замедление частоты спонтанных сокращений. Истощение запасов саркоплазматического ретикулума, вызванное открытием рианодиновых рецепторов, не приводило к замедлению электрических импульсов в эмбриональном миокарде курицы, которое было получено ранее у взрослых животных [20].

Роль $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма в генерации электрических импульсов

Считается, что высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума через рианодиновые рецепторы (RyR), способствует поздней части диастолической деполяризации, активируя $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменный механизм (I_{NCX}) [14]. Однако оценка потенциальной роли $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма в генерировании электрических импульсов клеток водителя ритма сердца затруднена из-за отсутствия селективных и высокоэффективных блокаторов [21]. В настоящее время наиболее селективными ингибиторами $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма считаются некоторые производные бензилоксифенила (KB-R7943, SEA0400, SN6 и YM-244769) [21, 22]. У взрослых животных ингибирование $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма приводит к снижению частоты спонтанных сокращений и нарушениям функции клеток водителя ритма [14, 21, 23].

Для изучения вклада $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма в генерацию электрической активности эмбрионального миокарда мы использовали SN6 (10 мкМ). Анализ полученных данных показал, что добавление SN6 в перфузирующий раствор приводило к укорочению фазы 4, что в результате повышало частоту генерации ПД на 15%. Несмотря на то, что есть данные о том, что SN6 может частично ингибировать K^+ - и Ca^{2+} -токи [22], мы не наблюдали достоверных изменений в других параметрах ПД (рис. 1с, табл. 1). Это позволяет предположить, что достоверные эффекты SN6, полученными нами на эмбриональном миокарде курицы, связаны преимущественно с ингибированием $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма. Даже при длительной экспозиции нами не было зарегистрировано снижение частоты генерации ПД, появление аритмий или прекращение генерации электрических импульсов, которые получены для сердца взрослых животных [14, 21, 23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный нами фармакологический анализ показал, что повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , вызванное ингибированием $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма или открытием рианодиновых рецепторов, приводит не к замедлению спонтанной активности, а к ее ускорению. Это позволяет заключить, что несмотря на наличие экспрессии каналов RyR и NCX1 в эмбриональном сердце курицы [4, 24, 25], их функциональный вклад в электрические процессы незначителен. Вероятно, на данном этапе эмбриогенеза еще нет тесной связи между механизмами мембранных часов и Ca^{2+} -часов и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменный механизм не играет важной роли.

Полученные нами результаты позволяют заключить, что HCN4-каналы, рианодиновые рецепторы и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменный механизм на данном этапе эмбрионального развития не являются определяющими для поддержания автоматизма клеток правого предсердия у куриного эмбриона. Вероятно, ионные токи, протекающие через эти каналы и играющие важную роль в электрофизиологии у взрослых животных, в эмбриональном миокарде несут модулирующую функцию.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментальный протокол соответствовал международным правилам “Для использования лабораторных животных” (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8-е издание, опубликованное National Academies Press (US) 2011 г.) и был одобрен независимым комитетом по биоэтике Института физиологии Коми НЦ УрО РАН (закключение от 25.12.2017 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ:

Работа выполнена в рамках общей темы Программы фундаментальных исследований Российской академии наук лаборатории физиологии сердца ИФ Коми НЦ УрО РАН (№ 0415-2019-0006).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Разработка идеи и дизайна исследования, планирование экспериментов (Е.А.Л., М.А.Г.), проведение экспериментальной работы и обработка полученных результатов (Е.А.Л., М.А.Г.), написание и редактирование текста статьи (Е.А.Л., М.А.Г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sedmera D, Kockova R, Vostarek F, Raddatz E (2015) Arrhythmias in the developing heart. *Acta Physiol (Oxf)* 213 (2):303–320.
<https://doi.org/10.1111/apha.12418>
2. Brochu RM, Clay JR, Shrier A (1992) Pacemaker current in single cells and in aggregates of cells dissociated from the embryonic chick heart. *J Physiol* 454: 503–515.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp019276>
3. Krogh-Madsen T, Schaffer P, Skriver AD, Taylor LK, Pelzmann B, Koidl B, Guevara MR (2005) An ionic model for rhythmic activity in small clusters of embryonic chick ventricular cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(1): 398–413.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00683.2004>
4. Shepherd N, Graham V, Trevedi B, Creazzo TL (2007) Changes in regulation of sodium/calcium exchanger of avian ventricular heart cells during embryonic development. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(5): 1942–1950.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00564.2006>
5. Wang P, Tang M, Gao L, Luo H, Wang G, Ma X, Duan Y (2013) Roles of I(f) and intracellular Ca^{2+} release in spontaneous activity of ventricular cardiomyocytes during murine embryonic development. *J Cell Biochem* 114 (8): 1852–1862.
<https://doi.org/10.1002/jcb.24527>
6. Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM, Addicks K (1997) Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res* 36(2): 149–162.
[https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(97\)00193-4](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(97)00193-4)
7. Sartiani L, Bettiol E, Stilitano F, Mugelli A, Cerbai E, Jaconi ME (2007) Developmental changes in cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells: a molecular and electrophysiological approach. *Stem Cells* 25(5): 1136–1144.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0466>

8. *Barbuti A, Crespi A, Capilupo D, Mazzocchi N, Baruscotti M, DiFrancesco D* (2009) Molecular composition and functional properties of f-channels in murine embryonic stem cell-derived pacemaker cells. *J Mol Cell Cardiol* 46(3): 343–351.
<https://doi.org/10.1016/j.jmcc.2008.12.001>
9. *Ophthof T* (2007) Embryological development of pacemaker hierarchy and membrane currents related to the function of the adult sinus node: implications for autonomic modulation of biopacemakers. *Med Biol Eng Comput* 45(2): 119–132.
<https://doi.org/10.1007/s11517-006-0138-x>.
10. *Goenezen S, Rennie MY, Rugonyi S* (2012) Biomechanics of early cardiac development. *Biomech Model Mechanobiol* 11(8): 1187–1204.
<https://doi.org/10.1007/s10237-012-0414-7>
11. *Polo-Parada L, Zhang X, Modgi A* (2009) Cardiac cushions modulate action potential phenotype during heart development [corrected]. *Dev Dyn* 238(3): 611–623.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.21879>
12. *Lakatta EG, Maltsev VA, Vinogradova TM* (2010) A coupled SYSTEM of intracellular Ca²⁺ clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. *Circul Res* 106(4): 659–673.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.206078>
13. *DiFrancesco D, Noble D* (2012) The funny current has a major pacemaking role in the sinus node. *Heart Rhythm* 9(2): 299–301.
<https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2011.09.021>
14. *Morotti S, Ni H, Peters CH, Rickert C, Asgari-Targhi A, Sato D, Glukhov AV, Proenza C, Grandi E* (2021) Intracellular Na⁺ Modulates Pacemaking Activity in Murine Sinoatrial Node Myocytes: An in Silico Analysis. *Int J Mol Sci* 22(11): 5645.
<https://doi.org/10.3390/ijms22115645>
15. *Hamburger V, Hamilton HL* (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88(1): 49–92.
<https://doi.org/10.1002/jmor.1050880104>
16. *Vicente-Steljin R, Passier R, Wisse LJ, Schalij MJ, Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC, Jongbloed MRM* (2011) Funny current channel HCN4 delineates the developing cardiac conduction system in chicken heart. *Heart Rhythm* 8(8): 1254–1263.
<https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2011.03.043>
17. *Pitcairn E, Harris H, Epiney J, Pai VP, Lemire JM, Ye B, Shi NQ, Levin M, McLaughlin KA* (2017) Coordinating heart morphogenesis: A novel role for hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels during cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Commun Integr Biol* 10(3): e1309488.
<https://doi.org/10.1080/19420889.2017.1309488>
18. *Joong B, Tang L, Maruyama M, Han S, Chen Z, Stucky M, Jones LR, Fishbein MC, Weiss JN, Chen P-S, Lin S-F* (2009) Intracellular calcium dynamics and acceleration of sinus rhythm by beta-adrenergic stimulation. *Circulation* 119(6): 788–796.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.817379>
19. *Gao Z, Chen B, Joiner M-LA, Wu Y, Guan X, Koval OM, Chaudhary AK, Cunha SR, Mohler PJ, Martins JB, Song L-S, Anderson ME* (2010) I(f) and SR Ca(2+) release both contribute to pacemaker activity in canine sinoatrial node cells. *J Mol Cell Cardiol* 49 (1): 33–40.
<https://doi.org/10.1016/j.jmcc.2010.03.019>
20. *Rigg L, Terrar DA* (1996) Possible role of calcium release from the sarcoplasmic reticulum in pacemaking in guinea-pig sino-atrial node. *Exp Physiol* 81(5): 877–880.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.1996.sp003983>
21. *Tóth A, Kiss L, Varró A, Nándsi PP* (2009) Potential therapeutic effects of Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibition in cardiac diseases. *Curr Med Chem* 16(25): 3294–3321.
<https://doi.org/10.2174/092986709788803268>
22. *Niu C-F, Yasuhide W, Ono K, Iwamoto T, Yamashita K, Satoh H, Urushida T, Hayashi H, Kimura J* (2007) Characterization of SN-6, a novel Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitor in guinea pig cardiac ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* 573(1–3): 161–169.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.06.033>
23. *Sanders L, Rakovic S, Lowe M, Mattick PAD, Terrar DA* (2006) Fundamental importance of Na⁺-Ca²⁺ exchange for the pacemaking mechanism in guinea-pig sino-atrial node. *J Physiol* 571(3): 639–649.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.100305>
24. *Linask KK, Artman M, Ludwig CA* (2001) Sodium-calcium exchanger (NCX-1) and calcium modulation: NCX protein expression patterns and regulation of early heart development. *Dev Dyn* 221(3): 249–264.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.1131>
25. *Dutro SM, Airey JA, Beck CF, Sutko JL, Trumble WR* (1993) Ryanodine receptor expression in embryonic avian cardiac muscle. *Dev Biol* 155(2): 431–441.
<https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1041>

Resistance of Embryonic Chick Atria to Inhibition of HCN-Channels and Components of the “Ca²⁺-Clock”

E. A. Lebedeva^{a, *} and M. A. Gonotkov^a

^a*Institute of Physiology Komi Science Center, Ural Branch Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia*

^{*}*e-mail: lebedeva.physiol.komisc@ya.ru*

Despite its medical importance, the cellular mechanisms activity and the contribution of various ion channels of embryonic heart automatism are not yet fully understood. In this study we investigated the effects of specific ion-channel inhibitors on the generation of action potentials in pacemaker cells of the right atrium in chicken embryos (HH36). We used microelectrode technique and evaluated the sensitivity of pacemaker cells to ivabradine (inhibitor of HCN-channels, through which the hyperpolarization-activated current, I_p), ryanodine (agonist of ryanodine receptors) and SN6 (inhibitor of Na⁺/Ca²⁺-exchange). It was found that the right atrium cells have a phase of slow diastolic depolarization. However, these cells were not sensitive to ivabradine (3 μM). We did not register significant changes in the electrophysiological parameters of action potentials. When ryanodine (1 μM) and SN6 (10 μM) were added to the perfusion solution, we observed similar effects: spontaneous rate the generation of action potential increased by 15%. Disturbance of rhythmic activity or disruption of the generation of electrical impulses were not observed in right atrial samples of chicken embryos. The obtained results allow us to conclude that, at this of embryonic development stage, HCN4-channels, ryanodine receptors, and the Na⁺/Ca²⁺-exchange are not decisive for maintaining the automatism of the right atrial cells in the chick embryo. We assume that the ion currents flowing through these channels are important in electrophysiology in adult animals, but they have a modulating function in the embryonic myocardium.

Keywords: embryonic chick, HCN-channels, ryanodine receptors, Na⁺/Ca²⁺-exchange, automatism