

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc643085>

EDN: XUODHP



# Кардиомиоциты человека, полученные путём направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, как модель для изучения аритмогенности на примере изопреналина

С.Г. Коваленко<sup>1,2</sup>, Ш.Р. Фролова<sup>1,2</sup>, С.А. Романова<sup>1,2</sup>, В.А. Цвеляя<sup>1,2</sup>, Р.А. Сюняев<sup>3</sup>, К.И. Агладзе<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского, Москва, Россия;

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия;

<sup>3</sup> Независимый исследователь, Долгопрудный, Россия

## АННОТАЦИЯ

**Обоснование.** Кардиомиоциты человека, полученные методом направленной дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), представляют собой перспективную модель для изучения аритмогенности и электрофизиологических реакций при бета-адренергической стимуляции. Изопреналин, неселективный бета-адренергический агонист, широко применяется как в исследованиях электрофизиологии сердца, так и в клинической практике для лечения брадикардии, сердечной блокады и остановки сердца. Однако количественные данные о его воздействии на ионные каналы человеческого сердца остаются ограниченными, так как большинство исследований выполняются на моделях животных и в условиях, не отражающих физиологическую норму.

**Цель.** Исследование влияния изопреналина на потенциалзависимые ионные каналы в желудочковых кардиомиоцитах человека, полученных методом направленной дифференцировки из ИПСК от здорового донора.

**Методы.** Методом пэтч-кламп были зарегистрированы токи ионных каналов, включая быстрые натриевые каналы, кальциевые каналы L-типа и медленные компоненты калиевых каналов задержанного выпрямления. Желудочковые кардиомиоциты человека получены методом направленной дифференцировки из ИПСК здорового донора.

**Результаты.** Установлено, что изопреналин в концентрации 1 мкМ значительно усиливает активность ионных каналов, увеличивая амплитуду быстрых натриевых токов на 73%, кальциевых токов L-типа — на 120% и медленных калиевых токов — на 98%. Кроме того, получены дополнительные параметры электрофизиологической активности, что позволило глубже понять бета-адренергическую реакцию в человеческих кардиомиоцитах.

**Заключение.** Определена ценность использования кардиомиоцитов человека, полученных методом направленной дифференцировки, как надёжной модели для изучения аритмогенности и реакций на бета-адренергическую стимуляцию. Эти количественные данные могут быть полезны для построения математических моделей функции сердца и прогнозирования поведения сердечной ткани при симпатической стимуляции.

**Ключевые слова:** бета-адреностимуляция; изопреналин; человеческие кардиомиоциты; пэтч-кламп; ИПСК; аритмогенность.

## Как цитировать:

Коваленко С.Г., Фролова Ш.Р., Романова С.А., Цвеляя В.А., Сюняев Р.А., Агладзе К.И. Кардиомиоциты человека, полученные путём направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, как модель для изучения аритмогенности на примере изопреналина // Гены и клетки. 2025. Т. 20, № 2. С. 120–129. DOI: 10.17816/gc643085 EDN: XUODHP

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc643085>

EDN: XUODHP

# Human Cardiomyocytes Obtained by Directed Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells as Isoprenaline-Based Model to Evaluate Arrhythmogenicity

Sandaara G. Kovalenko<sup>1,2</sup>, Sheida R. Frolova<sup>1,2</sup>, Serafima A. Romanova<sup>1,2</sup>, Valeria A. Tsvelaya<sup>1,2</sup>, Roman A. Syunyaev<sup>3</sup>, Konstantin I. Agladze<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia;

<sup>2</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia;

<sup>3</sup> Independent researcher, Dolgoprudny, Russia

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Human cardiomyocytes obtained by directed differentiation from induced pluripotent stem cells are a promising model for evaluating arrhythmogenicity and the electrophysiological response to beta-adrenergic stimulation. Isoprenaline is a non-selective beta-adrenergic agonist that is widely used in cardiac electrophysiology studies and clinical practice to treat bradycardia, heart block, and cardiac arrest. However, there is limited quantitative data on its effects on human cardiac ion channels because most studies are conducted on animal models under non-physiological conditions.

**AIM:** The study aimed to evaluate the effects of isoprenaline on voltage-gated ion channels in human ventricular cardiomyocytes obtained by directed differentiation of human induced pluripotent stem cells from a healthy donor.

**METHODS:** The patch clamp technique was used to record currents of ion channels, including fast sodium channels, L-type calcium channels, and delayed rectifier potassium channels. Human ventricular cardiomyocytes were obtained by directed differentiation of human induced pluripotent stem cells from a healthy donor.

**RESULTS:** At a concentration of 1  $\mu$ M, isoprenaline was found to significantly increase ion channel activity, including an increase in the amplitude of fast sodium currents (73%), L-type calcium currents (120%), and delayed rectifier potassium currents (98%). Additional parameters of electrophysiological activity were also obtained, providing a deeper understanding of a beta-adrenergic response in human cardiomyocytes.

**CONCLUSION:** Human cardiomyocytes obtained by directed differentiation were assessed as a reliable model to evaluate arrhythmogenicity and responses to beta-adrenergic stimulation. These quantitative data can be used to create mathematical models of cardiac function and predict the behavior of cardiac tissue under sympathetic stimulation.

**Keywords:** beta-adrenergic stimulation; isoprenaline; human cardiomyocytes; patch-clamp; IPSC; arrhythmogenicity.

## To cite this article:

Kovalenko SG, Frolova SR, Romanova SA, Tsvelaya VA, Syunyaev RA, Agladze KI. Human Cardiomyocytes Obtained by Directed Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells as Isoprenaline-Based Model to Evaluate Arrhythmogenicity. *Genes & cells*. 2025;20(2):120–129. DOI: 10.17816/gc643085 EDN: XUODHP

Submitted: 17.12.2024

Accepted: 23.05.2025

Published online: 18.06.2025

## ВВЕДЕНИЕ

Стимуляция адренорецепторов приводит к увеличению частоты сокращений сердца, скорости проведения возбуждения и к изменению силы мышечных сокращений, т. е. является компенсаторным механизмом, который временно поддерживает сердечный выброс и таким образом — достаточную перфузию органов и снабжение тканей кислородом. Тем не менее в случае патологий, таких как сердечная недостаточность, адреностимуляция желудочков может привести к возникновению аритмий. Потенциально аритмогенными являются внутриклеточные механизмы при воздействии адреналином на ткань сердца. Адреностимуляция неодинаково влияет на длительность реполяризации в клетках эпикарда и эндокарда [1]. Постоянная стимуляция адренорецепторов способствует молекулярным и структурным изменениям кардиомиоцитов и внеклеточного матрикса, включая патологическую гипертрофию [2], фиброз сердца [3] и воспаление [4] с ухудшающимися последствиями для сердечной функции.

В современной медицине неотъемлемой частью терапии сердечной недостаточности является применение  $\beta$ -блокаторов [5]. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в понимании роли передачи сигналов бета-адреностимуляции при заболеваниях сердца и аритмиях, количественное и функциональное понимание роли вегетативной стимуляции в нормальной электрофизиологии сердца и в развитии опасных для жизни аритмий всё ещё не полно [6].

Двумя основными подтипами  $\beta$ -адренорецепторов являются  $\beta$ 1- и  $\beta$ 2-адренорецепторы.  $\beta$ 1-адренорецепторы составляют порядка 80% и инициируют общеклеточный ответ, в то время как  $\beta$ 2-адренорецепторы сгруппированы в кавеоларном домене, в районе T-трубочек [7].  $\beta$ 2-адренорецепторы ассоциированы преимущественно с  $\text{Ca}^{2+}$  каналами L-типа [8]. Последние исследования показали эффективность использования  $\beta$ 2-блокаторов и неселективных  $\beta$ -блокаторов, что демонстрирует важность  $\beta$ 2-рецепторов в развитии сердечной недостаточности [9, 10]. Потенциально аритмогенная роль  $\beta$ 2-рецепторов заключается в формировании задержанной постдеполяризации [11].  $\beta$ 3-адренорецепторы экспрессируются в гораздо меньшей степени, и их функция в сердце изучена слабо [12]. В желудочке человека  $\beta$ 3-адренорецепторы в основном могут противодействовать эффектам активации  $\beta$ 1-и  $\beta$ 2-адренорецепторов.

Стимуляция  $\beta$ -адренергических рецепторов на кардиомиоцитах запускает сигнальный каскад, ведущий к увеличению циклического аденозинмонофосфата, последующей активации протеинкиназы A и фосфорилированию множества мишеней, как в сократительном аппарате клеток, так и в их проводящей системе, включая кальциевые каналы L-типа (ICa, L): Ca, рианодиновые рецепторы и белки миофиламентов, включая тропонин I.

Все эти белки обеспечивают связь возбуждения клетки с сокращением за счёт увеличения количества внутриклеточного кальция в каждую систолу (для усиления сокращения) и снижения чувствительности миофиламентов к ионам кальция (для ускорения релаксации) [13]. Циклический аденозинмонофосфат также напрямую связывается с активируемыми гиперполяризацией циклическими нуклеотидзависимыми каналами, которые преимущественно экспрессируются в сердечных узловых клетках. В итоге увеличивается ток If (входящий ток гиперполяризационно-активируемого канала  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ), что способствует повышению частоты сердечных сокращений.

Изопреналин<sup>1</sup> является чистым неселективным агонистом  $\beta$ -адренорецепторов [14]. Препарат широко используется в клинической практике для лечения различных сердечно-сосудистых патологий, включая блокаду сердца, синдром Морганьи–Адамса–Стокса, а также в качестве средства для купирования бронхоспазма при анестезии<sup>2</sup> [15]. Однако помимо своих терапевтических эффектов изопреналин представляет значительный интерес как инструмент для изучения механизмов бета-адреностимуляции и её роли в развитии аритмогенных реакций в кардиомиоцитах.

Эксперименты на ткани сердца человека редки, в подавляющем большинстве работ используют в качестве экспериментальных моделей кардиомиоциты животных, в то время как вклад и динамика различных ионных токов могут существенно отличаться от таковой у человека [16]. В данной работе в качестве человеческих кардиомиоцитов были выбраны клетки, полученные путём дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) линии здорового донора m34sk3. ИПСК, полученные из соматических клеток путём перепрограммирования, сохраняют генетический фон донора, что делает их бесценной моделью для исследования генетических факторов, лежащих в основе электрофизиологии сердца и аритмогенности. Используя протоколы направленной дифференцировки, исследователи могут создавать кардиомиоциты, которые точно имитируют электрофизиологические свойства желудочковых миоцитов человека.

## ЦЕЛЬ

Исследование влияния изопrenalина на потенциалзависимые ионные каналы в желудочковых кардиомиоцитах человека, полученных методом направленной дифференцировки ИПСК здорового донора, с целью обоснования генетически релевантной основы для моделирования

<sup>1</sup> Лекарственное средство не зарегистрировано в Государственном реестре лекарственных средств Российской Федерации.

<sup>2</sup> Szymanski MW, Singh DP. Isoproterenol. В: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526042/>

электрической активности сердца человека в условиях симпатической стимуляции.

## МЕТОДЫ

В работе изучали действие изопrenalина (isoprenaline hydrochloride; Sigma-Aldrich, США).

Человеческие кардиомиоциты получали из ИПСК пациент-специфичных линий m34sk3 направленной дифференцировкой, используя адаптированный GIWI-протокол [17, 18]. Клеточная линия m34sk3 была предоставлена Национальным медицинским исследовательским центром имени академика Е.Н. Мешалкина. Данная линия ИПСК была создана из клеток, пожертвованных пациентом без сердечно-сосудистых заболеваний.

Для регистрации токов ионных каналов использовали установку пэтч-кламп, которая состояла из следующих основных компонентов: цифровой преобразователь Digidata 1440A (Axon Enterprise, Inc., США); усилитель Axopatch 200B (Axon Enterprise, Inc., США); микроманипулятор MP-285 (Sutter, Германия); инвертированный микроскоп Olympus IX71 (Olympus, Япония); шумоподавитель HumBug (Digitimer Ltd, Великобритания); антивибрационная платформа AVTT75 (Kinetic Systems, США) [19]. Температуру внеклеточного раствора поддерживали в камере с помощью автоматического регулятора температуры TC-324C (Warner Instruments, США). Для изготовления пипеток были использованы пуллер микропипеток P-97 (Sutter, Германия), заготовки из боросиликатного стекла B150-86-10 (Sutter, Германия), микроузнака MF-900 (Narishige, Япония). Применяли следующие растворы:

- внеклеточный раствор для записи тока  $\text{Na}^+$  состоял из 20 мМ NaCl, 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1,8 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 120 мМ CsCl, 10 мМ D-глюкозы, 10 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (HEPES), 0,002 мМ нисолдипина<sup>1</sup>, 0,003 мМ ивабрадина (pH 7,4 доводили с помощью гидроксида цезия);
- внутриклеточный раствор для регистрации тока  $\text{Na}^+$  состоял из 135 мМ CsCl, 10 мМ NaCl, 2 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 5 мМ этиленгликоль-бис(2-аминоэтиловый эфир)-N,N,N,N-тетрауксусной кислоты (EGTA), 5 мМ аденозинтрифосфата магния (MgATP), 10 мМ HEPES (pH 7,2 доводили с помощью гидроксида цезия);
- камерный раствор для регистрации тока  $\text{Ca}^{2+}$  состоял из 160 мМ TEA-Cl, 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ D-глюкозы, 10 мМ HEPES (pH 7,4 доводили с помощью гидроксида цезия);
- пипеточный раствор содержал 145 мМ CsCl, 5 мМ NaCl, 5 мМ EGTA, 10 мМ HEPES/гидроксида натрия, 5 мМ MgATP (pH 7,2 доводили с помощью гидроксида цезия);
- камерный раствор для медленной компоненты калиевого канала задержанного выпрямления (IKs) содержал 150 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1,8 мМ  $\text{CaCl}_2$ ,

15 мМ D-глюкозы, 1 мМ пирувата натрия, 0,001 мМ нисолдипина, 0,001 мМ E-4031, 15 мМ HEPES (pH 7,4 доводили с помощью гидроксида натрия);

- внутриклеточный раствор для IKs содержал 20 мМ KCl, 5 мМ MgATP, 10 мМ EGTA, 125 мМ аспартата калия, 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 2 мМ  $\text{Na}_2$ -фосфокреатина, 2 мМ  $\text{Na}_2$ -гуанозинтрифосфата, 5 мМ HEPES/гидроксида калия (pH 7,2 доводили с помощью гидроксида калия).

Формирование потенциала действия (ПД) регистрировали во внеклеточном растворе, содержащем 150 мМ NaCl, 1,8 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 5,4 мМ KCl, 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 15 мМ HEPES, 15 мМ D-глюкозы, 1 мМ пирувата натрия (pH 7,4 доводили с помощью гидроксида натрия). Внутриклеточный раствор для записи ПД состоял из 5 мМ NaCl, 2 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 150 мМ KCl, 5 мМ MgATP, 5 мМ EGTA, 10 мМ HEPES (pH 7,2 доводили с помощью гидроксида калия). Для всех растворов использовали химически чистые реагенты (99,9%) от компаний «Геликон» (Россия) и «Панэко» (Россия). Фильтрацию растворов производили с помощью мембранных фильтров 0,22 мкм (Merck Millipore, Германия).

Токи ионных каналов в одиночных изолированных кардиомиоцитах регистрировали методом пэтч-кламп в конфигурации «целая клетка». В качестве перфорирующего агента использовали амфотерицин В (Sigma-Aldrich, США), концентрацию которого доводили до 0,24 мг/мл [19]. Эксперименты проводили при физиологической температуре 37 °С. Пипетки вытягивали из боросиликатного стекла в пуллере. После формирования гигаомного сопротивления (Гом) ёмкостные компоненты компенсировали с помощью усилителя. После компенсации сопротивления Ra начинали детектировать потенциалзависимые ионные каналы и формировать ПД с помощью установленных протоколов стимуляции. При необходимости компенсировалось последовательное сопротивление.

Запись токов Na-каналов была проведена с помощью стимулирующего ступенчатого протокола от -80 до 15 мВ длительностью 50 мс. Для записи тока  $\text{Ca}^{2+}$  L-типа использовали ступенчатый протокол от -40 до 50 мВ в течение 300 мс с препульсом от поддерживаемого потенциала от -80 до -40 мВ длительностью 100 мс. Пики ICa, L измеряли при 0 мВ. Медленная (IKs) компонента калиевого тока задержанного выпрямления была получена деполяризующим импульсом от -40 до +50 мВ с шагом 10 мВ и длительностью 2,5 с (при поддерживаемом потенциале -70 мВ). ПД был записан с помощью стимула током в 1 нА при длительности 2,5 мс. Ёмкость мембран в диапазоне от 10 до 30 пФ измеряли с помощью программного обеспечения pCLAMP 10.2 (Molecular Devices, США).

Анализ данных выполняли с использованием программ Clampfit 10.2 (Molecular Devices, США) и Origin Pro 8.1 (Originlab Corporation, США). Усреднение идёт по меньшей мере от трёх разных кардиомиоцитов. Статистическая обработка проводилась с помощью t-критерия Стьюдента. Для всех результатов различия были на уровне  $p < 0,05$ .

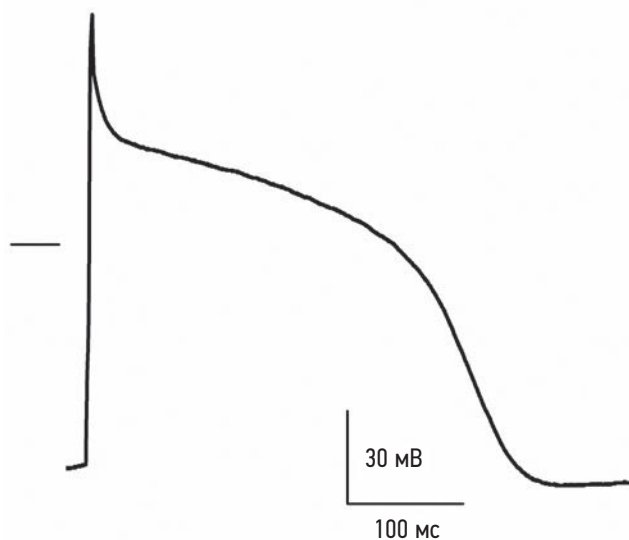
## РЕЗУЛЬТАТЫ

У полученных путём дифференцировки из ИПСК человеческих желудочковых кардиомиоцитов в первую очередь был проверен ПД для данных кардиомиоцитов с помощью метода пэтч-кламп и стимула током в 1 нА при длительности 2,5 мс [19]. Длительность ПД при 80% реполяризации была равна  $350 \pm 14$  мс ( $n=7$ ). Пример записи ПД представлен на рис. 1.

Далее записывали токи быстрого натриевого канала ( $I_{Na_v}$ ),  $I_{Ca, L}$  и  $I_{Ks}$  человеческих кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК здорового донора [19].

Регистрировали быстрый натриевый ток с помощью протокола стимуляции от  $-80$  до  $+15$  мВ с шагом в 5 мВ и длительностью 50 мс. Пример токов в контроле и после действия изопrenalина представлен на рис. 2, *a* (взяты записи максимумов тока с каждой записи в одной клетке). Из полученных данных после нормирования на ёмкости клеток и усреднения была построена вольтамперная кривая (рис. 2, *b*). Амплитуда тока  $I_{Na_v}$  после добавления изопrenalина увеличилась на  $(73 \pm 25)\%$  по сравнению с контролем (рис. 2, *d*). Далее были построены активационные кривые  $t$  для контроля и вещества (рис. 2, *c*). Потенциал полуактивации  $V_{1/2}$  для контроля составлял  $-41,04 \pm 1,15$  мВ, после добавления изопrenalина  $-46,05 \pm 1,33$  мВ. Под действием изопrenalина наблюдается смещение активационной кривой  $t$  влево, смещение полувысоты составляет  $\sim 5$  мВ.

Протокол стимуляции для тока  $I_{Ca, L}$  имеет вид ступеней от  $-40$  до  $+50$  мВ с шагом в 10 мВ и длительностью



**Рис. 1.** Пример формы потенциала действия желудочковых кардиомиоцитов человека, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток линии здорового донора (уровень нулевого потенциала отмечен горизонтальной чертой).

**Fig. 1.** Example of the action potential pattern of human ventricular cardiomyocytes obtained by directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells from a healthy donor. The zero potential level is indicated by the horizontal line.

300 мс. После нормирования токов на ёмкости и усреднения данных были построены вольтамперные кривые (рис. 3). Амплитуда тока  $I_{Ca, L}$  после действия изопrenalина увеличилась на 120% по сравнению с контролем ( $p \leq 0,004$ ). Сами нормированные усреднённые амплитуды составляли: в контроле  $-18,78 \pm 4,32$  пА/пФ, после изопrenalина  $-41,47 \pm 3,43$  пА/пФ. Кроме того, после добавления изопrenalина наблюдалось смещение вольтамперной кривой влево на  $\sim 6$  мВ.

Для регистрации токов  $I_{Ks}$  был использован протокол стимуляции от  $-30$  до  $+60$  мВ с шагом в 15 мВ и длительностью 2,5 с. Пример таких токов показан на рис. 4, *a*. Далее была построена вольтамперная кривая для контроля и после добавления изопrenalина (рис. 4, *b*). Амплитуда тока была нормирована на ёмкость клетки, и при  $+60$  мВ в протоколе максимум плотности тока  $I_{Ks}$  составил в контроле  $3,50 \pm 0,49$  пА/пФ, в присутствии изопrenalина  $6,94 \pm 0,42$  пА/пФ. Если исходить из гистограммы нормированной амплитуды в процентах, можно утверждать, что амплитуда тока  $I_{Ks}$  увеличилась на  $\sim 98\%$  после введения изопrenalина.

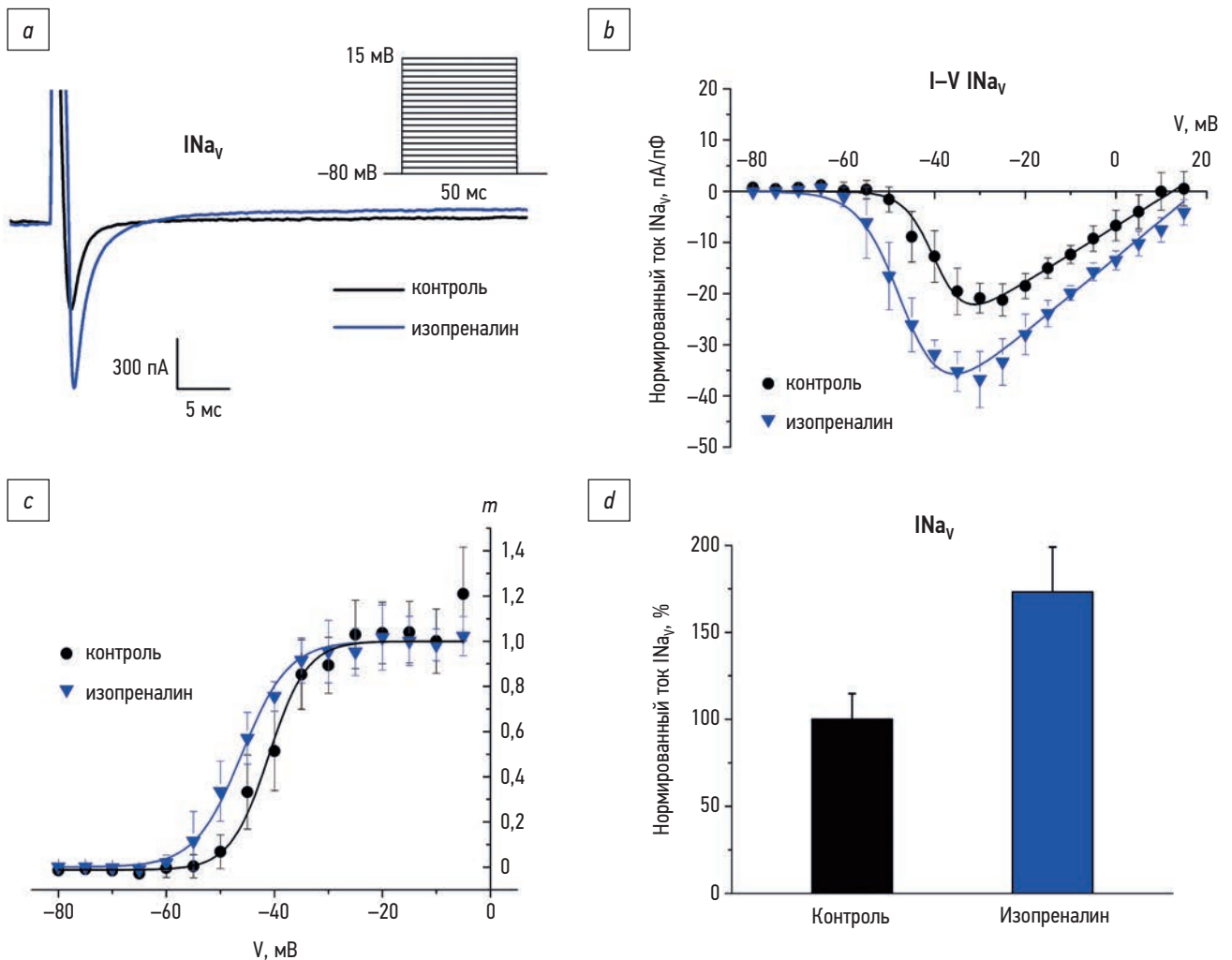
## ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе показано сильное увеличение токов потенциалзависимых каналов человеческих кардиомиоцитов в условиях бета-адреностимуляции.

Одним из ограничений исследования является то, что степень зрелости кардиомиоцитов, дифференцированных из линии ИПСК, может быть неэквивалентна реальным взрослым кардиомиоцитам человека [20]. Для кардиомиоцитов, полученных направленной дифференцировкой, в данной работе характерная форма ПД похожа на желудочкоподобную, длительность ПД также соответствует желудочковым кардиомиоцитам. По опыту нашей лаборатории, данная линия m34sk3 достигает своей максимальной электрофизиологической зрелости к 30-му дню, что было подтверждено стабильным значением скорости распространения волны возбуждения и реакции на периодическую стимуляцию в диапазоне физиологических значений [21].

В виде другого ограничения важно отметить, что токи регистрировались при физиологической температуре  $37^\circ\text{C}$ . Измерение тока  $I_{Na_v}$  представляет сложности из-за его высокой амплитуды и быстрой кинетики, особенно при физиологической температуре. В рамках другой работы авторами показано, что это может приводить к систематической погрешности измерений активационных/инактивационных параметров  $I_{Na_v}$ , которые могут быть учтены при помощи математического моделирования экспериментальных артефактов [22]. Заметим, что в настоящем исследовании представлены нативные значения токов без обработки моделью, а дальнейшая интерпретация с помощью математического моделирования является отдельной задачей.





**Рис. 2.** Влияние изопреналина на быстрые натриевые каналы ( $I_{NaV}$ ) желудочковых кардиомиоцитов человека: *a* — токи  $I_{NaV}$  человеческих кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в контроле (чёрная кривая) и после действия 1 мкМ изопреналина (синяя кривая); *b* — вольтамперные кривые  $I-V$  для  $I_{NaV}$  в контроле (чёрная кривая,  $n=12$ ), после добавления изопреналина (синяя кривая,  $n=9$ ); *c* — кривая активационной воротной переменной  $m$  для быстрых натриевых каналов кардиомиоцитов человека, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (чёрная кривая,  $n=12$ ) и после изопреналина (синяя кривая,  $n=9$ ); *d* — гистограмма изменения амплитуды кардиомиоцитов в процентах в контроле (чёрная колонка,  $n=12$ ) и после изопреналина (синяя колонка,  $n=9$ ) ( $p < 0,009$ ).  $V$  — потенциал, измеряемый в милливольтгах.

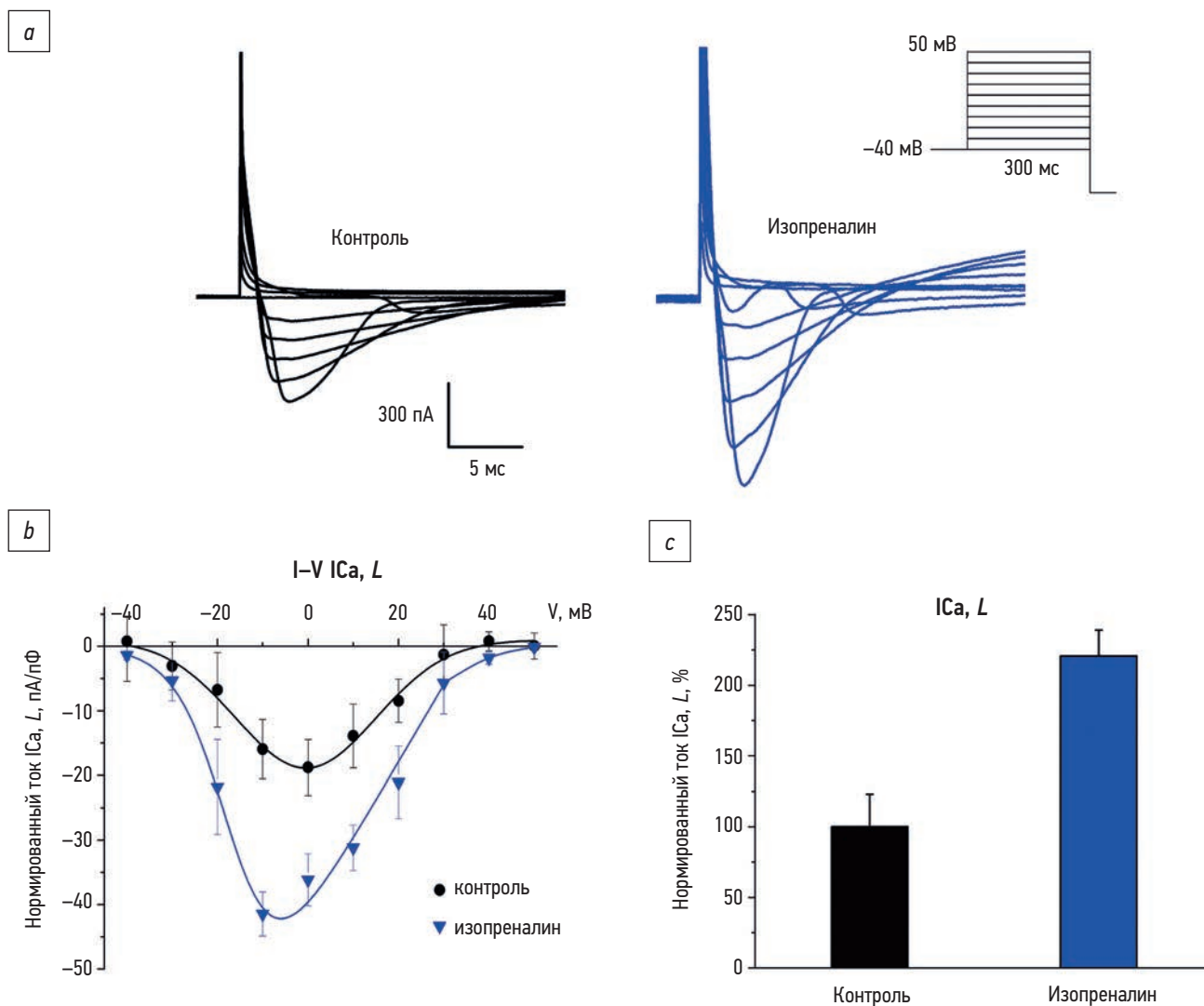
**Fig. 2.** Effects of isoprenaline on fast sodium channels ( $I_{NaV}$ ) of human ventricular cardiomyocytes.

Модуляция  $I_{Ca, L}$  после добавления изопреналина увеличила амплитуду тока этих каналов на 120%, максимум вольтамперной кривой сместился влево на 6 мВ. Подобное повышение тока  $I_{Ca, L}$  в совокупности с другими факторами вызывает увеличение концентрации ионов кальция в цитозоле, что повышает сократительную способность миокарда [13]. Реактивация  $I_{Ca, L}$  увеличивает склонность к ранней постдеполяризации, которая является важной причиной летальных желудочковых аритмий при синдромах удлинённого интервала QT и сердечной недостаточности [23].

Ток  $I_{NaV}$  под влиянием изопреналина увеличился на ~73%, при этом кривая активации сместилась влево на 5 мВ. В момент бета-адреностимуляции зависимое от протеинкиназы А фосфорилирование усиливает ток  $I_{NaV}$  за счёт изменения проводимости [24]. Это может способствовать симпатически опосредованному увеличению

скорости проводимости и формированию повторных аритмий после инфаркта миокарда, что часто характеризуется деполаризацией миокарда [25].

После добавления изопреналина каналы  $I_{Ks}$  увеличили амплитуду тока на 98%. В обычных условиях плотность медленной компоненты калиевых каналов  $I_{Ks}$  ниже, чем быстрого компонента  $I_{Kr}$  у людей и других крупных млекопитающих [26]. Однако известно, что стимуляция  $\beta$ -адренорецепторов увеличивает  $I_{Ks}$ , при этом практически не оказывает эффекта на  $I_{Kr}$  [27], и это противодействует увеличению  $I_{Ca, L}$ , в свою очередь предотвращая увеличение длины ПД. Действительно, физическая нагрузка и стресс являются типичными триггерами аритмии при врождённом синдроме удлинённого интервала QT 1-го типа, связанном с потерей функции  $I_{Ks}$  [28], и могут быть предотвращены блокадой  $\beta$ -адренорецепторов [29].



**Рис. 3.** Влияние изопреналина на кальциевые каналы  $L$ -типа ( $I_{Ca, L}$ ) желудочковых кардиомиоцитов человека: *a* — запись токов  $I_{Ca, L}$  человеческих кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в контроле (чёрная кривая) и после действия 1 мкМ изопреналина (синяя кривая); *b* — вольтамперные кривые  $I$ – $V$  для  $I_{Ca, L}$  в контроле (чёрная кривая,  $n=6$ ) и после добавления изопреналина (синяя кривая,  $n=4$ ); *c* — гистограмма изменения амплитуды в процентах в контроле (чёрная колонка,  $n=6$ ) и после изопреналина (синяя колонка,  $n=4$ ) ( $p \leq 0,004$ ).  $V$  — потенциал, измеряемый в милливольтях.

**Fig. 3.** Effects of isoprenaline on  $L$ -type calcium channels ( $I_{Ca, L}$ ) of human ventricular cardiomyocytes.

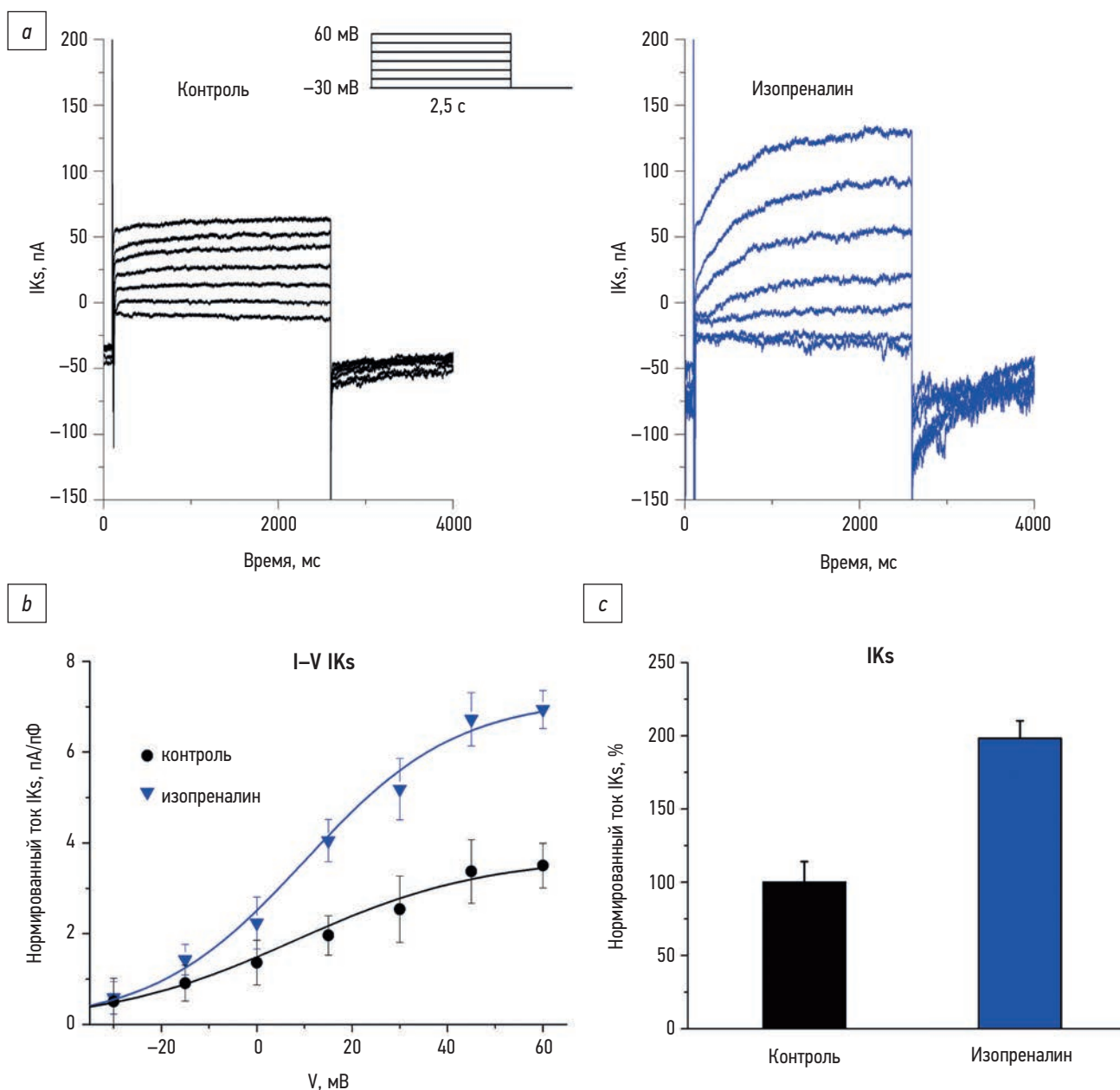
С помощью компьютерного моделирования было показано, что увеличение отношения  $I_{Ks}/I_{Kr}$  без изменения длины ПД ограничивает возникновение ранних постдеполяризаций. Возможно,  $I_{Ks}$  более эффективны в стабилизации длительности ПД и подавлении ранних постдеполяризаций, чем  $I_{Kr}$  [30].

Заметим, что разница в кинетике между более быстрой активацией  $I_{Ca, L}$  и более медленным увеличением  $I_{Ks}$  при активации  $\beta$ -адренорецепторов временно нарушает баланс входящих и выходящих токов [31]. Наблюдаемый дисбаланс может временно пролонгировать ПД и благоприятствовать ранним постдеполяризациям, что было показано с помощью компьютерного моделирования [32]. Более того, более быстрая активация  $I_{Ca, L}$  (по сравнению с  $I_{Ks}$ ) при быстрой стимуляции  $\beta$ -адренорецепторов кратковременно увеличивает реституцию ПД, что приводит

к распаду реентри и ускоряет переход желудочковой тахикардии в фибрилляцию желудочков [33].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что уже при концентрации изопреналина 1 мкМ происходит значительное увеличение потенциал-зависимых ионных токов  $I_{Na}$ ,  $I_{Ca, L}$  и  $I_{Ks}$  человеческих кардиомиоцитов, полученных путём дифференцировки ИПСК. Показано, что разница в кинетике между более быстрой активацией  $I_{Ca, L}$  и более медленным увеличением  $I_{Ks}$  при активации  $\beta$ -адренорецепторов временно нарушает баланс входящих и выходящих токов, что может пролонгировать ПД и благоприятствовать ранней постдеполяризации. Это является фактором развития жизнеугрожающих аритмий.



**Рис. 4.** Влияние изопреналина на медленные калиевые каналы (IKs) желудочковых кардиомиоцитов человека: *a* — токи IKs человеческих кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в контроле (чёрная кривая) и после действия 1 мкМ изопреналина (синяя кривая); *b* — вольтамперные кривые I–V для IKs в контроле (чёрная кривая,  $n=3$ ), после добавления изопреналина (синяя кривая,  $n=3$ ); *c* — гистограмма изменения амплитуды в процентах в контроле (чёрная колонка,  $n=3$ ) и после изопреналина (синяя колонка,  $n=3$ ) ( $p \leq 0,008$ ).  $V$  — потенциал, измеряемый в милливольтях.

**Fig. 4.** Effects of isoprenaline on delayed rectifier potassium channels (IKs) of human ventricular cardiomyocytes.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Вклад авторов.** С.Г. Коваленко — проведение экспериментов по методу пэтч-кламп, анализ и интерпретация результатов исследования, написание и редактирование текста; Ш.Р. Фролова — разработка дизайна исследования по методу пэтч-кламп, проведение экспериментов по методу пэтч-кламп, анализ результатов, редактирование рукописи; С.А. Романова — ведение и дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток; В.А. Цвеляя — разработка дизайна исследования, ведение работы с клеточной культурой; Р.А. Сюняев — разработка концепции исследования, редактирование текста; К.И. Агладзе — концепция исследования, концепция и дизайн статьи, редактирование текста, утверждение итогового варианта текста

рукописи. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

**Благодарности.** Авторы выражают признательность за помощь в работе Абрашевой Веронике Олеговне, а также коллективу лаборатории молекулярной и клеточной диагностики Московского областного научно-исследовательского клинического института имени М.Ф. Владимирского и лаборатории экспериментальной и клеточной медицины Московского физико-технического института.

**Этическая экспертиза.** Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией (2024) и было одобрено Комитетом по этике Московского областного научно-исследовательского клинического



института имени М.Ф. Владимирского (протокол № 7 от 18.04.2024) и Временным комитетом по уходу за животными и научным процедурам Московского физико-технического института (протокол № А2-2012-09-02 от 02.09.2012). Клеточная линия была предоставлена Национальным медицинским исследовательским центром имени академика Е.Н. Мешалкина, обработка одобрена Комитетом по этике Института патологии кровообращения (протокол № 27 от 21.03.2013). Данная линия ИПСК создана из клеток, пожертвованных пациентом без сердечно-сосудистых заболеваний. От донора получено информированное согласие.

**Источники финансирования.** Исследование проведено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации с использованием денежных средств государственного задания (FSMG-2023-0015, соглашение № 075-03-2025-662 от 17 января 2025 г.), а также государственного задания Министерства здравоохранения Московской области (№ 61 Московского областного научно-исследовательского клинического института имени М.Ф. Владимирского). Финансирующие организации не устанавливали ограничений на использование данных и распространение результатов исследования.

**Раскрытие интересов.** Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

**Оригинальность.** При создании настоящей работы применены собственные данные записей пэч-кламп (все рисунки).

**Доступ к данным.** Все данные, полученные в настоящем исследовании, доступны в статье.

**Генеративный искусственный интеллект.** При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовались.

**Рассмотрение и рецензирование.** Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали два члена редакционной коллегии и научный редактор издания.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Author contributions:** S.G. Kovalenko: investigation (patch-clamp), formal analysis, writing—original draft; Sh.R. Frolova: conceptualization, investigation (patch-clamp), formal analysis, writing—original draft; S.A. Romanova: investigation (maintenance and differentiation of induced pluripotent stem cells); V.A. Tselaya: conceptualization, investigation

(cell culture); R.A. Syunyaev: conceptualization, writing—original draft; K.I. Agladze: conceptualization, writing—original draft, writing—review & editing. All the authors approved the version of the manuscript to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

**Acknowledgments:** The authors express their gratitude to Veronika O. Abrasheva and the staff of the Laboratory of Molecular and Cellular Diagnostics at the Moscow Regional Research and Clinical Institute, as well as the staff of the Laboratory of Experimental and Cellular Medicine at the Moscow Institute of Physics and Technology.

**Ethics approval:** The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration (2024) and was approved by the Ethics Committee of the Moscow Regional Research and Clinical Institute (protocol No. 7 dated April 18, 2024) and the Interim Committee on Animal Care and Research Procedures of the Moscow Institute of Physics and Technology (protocol No. A2-2012-09-02 dated September 2, 2012). The cell line was provided by the National Medical Research Center named after academician E.N. Meshalkin. Treatment was approved by the Ethics Committee of the Institute of Circulatory Pathology (protocol No. 27 dated March 21, 2013). This induced pluripotent stem cell line was created using donated cells from a patient with cardiovascular disease. The authors obtained written informed consent from the donor.

**Funding sources:** The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (State Assignment No. FSMG-2023-0015, Agreement No. 075-03-2025-662, dated January 17, 2025), as well as by the Ministry of Health of the Moscow Region (State Assignment No. 61, M. F. Vladimirovsky Moscow Regional Research Clinical Institute). The funding sources did not impose any restrictions on how the study results could be used or disseminated.

**Disclosure of interests:** The authors have no relationships, activities, or interests for the last three years related to for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

**Statement of originality:** All figures in this work were created using original patch-clamp data.

**Data availability statement:** All data generated during this study are available in the article.

**Generative AI:** No generative artificial intelligence technologies were used to prepare this article.

**Provenance and peer review:** This paper was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The review process involved two members of the editorial board and the in-house scientific editor.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Akar FG, Rosenbaum DS. Transmural electrophysiological heterogeneities underlying arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Res*. 2003;93(7):638–645. doi: 10.1161/01.RES.0000092248.59479.AE
2. van Berlo JH, Maillat M, Molkenin JD. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *J Clin Invest*. 2013;123(1):37–45. doi: 10.1172/JCI62839 EDN: RIEZKF
3. Bacmeister L, Schwarzl M, Warnke S, et al. Inflammation and fibrosis in murine models of heart failure. *Basic Res Cardiol*. 2019;114(3):19. doi: 10.1007/s00395-019-0722-5 EDN: DKKZIT
4. Murray DR, Prabhu SD, Chandrasekar B. Chronic beta-adrenergic stimulation induces myocardial proinflammatory cytokine expression. *Circulation*. 2000;101(20):2338–2341. doi: 10.1161/01.cir.101.20.2338
5. Wachter SB, Gilbert EM. Beta-adrenergic receptors, from their discovery and characterization through their manipulation to beneficial clinical application. *Cardiology*. 2012;122(2):104–112. doi: 10.1159/000339271 EDN: RRHKVH
6. Grandi E, Ripplinger CM. Antiarrhythmic mechanisms of beta blocker therapy. *Pharmacol Res*. 2019;146:104274. doi: 10.1016/j.phrs.2019.104274
7. Nikolaev VO, Bünemann M, Schmitteckert E, et al. Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching beta1-adrenergic but locally confined beta2-adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ Res*. 2006;99(10):1084–1091. doi: 10.1161/01.RES.0000250046.69918.d5 EDN: LVSJDH
8. Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, et al. Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res*. 1986;59(3):297–309. doi: 10.1161/01.res.59.3.297
9. Ruwald MH, Ruwald AC, Jons C, et al. Effect of metoprolol versus carvedilol on outcomes in MADIT-CRT (multicenter automatic defibrillator implantation trial with cardiac resynchronization therapy). *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(14):1518–1526. doi: 10.1016/j.jacc.2013.01.020
10. de Peuter OR, Lussana F, Büller HR, et al. A systematic review of selective and non-selective beta blockers for prevention of vascular events in patients with acute coronary syndrome or heart failure. *The Netherlands Journal of Medicine*. 2009;67(9):284–294. EDN: YBABXZ
11. Lang D, Holzem K, Kang C, et al. Arrhythmogenic remodeling of  $\beta_2$  versus  $\beta_1$  adrenergic signaling in the human failing heart. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2015;8(2):409–419. doi: 10.1161/CIRCEP.114.002065 EDN: UGFQHF
12. Cannavo A, Koch WJ. Targeting  $\beta_3$ -adrenergic receptors in the heart: selective agonist and  $\beta$ -blockade. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2017;69(2):71–78. doi: 10.1097/FJC.0000000000000444 EDN: WLQQWX
13. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198–205. doi: 10.1038/415198a EDN: LSCAF

14. Reyes G, Schwartz PH, Newth CJ, Eldadah MK. The pharmacokinetics of isoproterenol in critically ill pediatric patients. *J Clin Pharmacol*. 1993;33(1):29–34. doi: 10.1002/j.1552-4604.1993.tb03899.x
15. Kislitsina ON, Rich JD, Wilcox JE, et al. Shock-classification and pathophysiological principles of therapeutics. *Curr Cardiol Rev*. 2019;15(2):102–113. doi: 10.2174/1573403X15666181212125024 EDN: QQLMGZ
16. Jost N, Virág L, Comtois P, et al. Ionic mechanisms limiting cardiac repolarization reserve in humans compared to dogs. *J Physiol*. 2013;591(17):4189–4206. doi: 10.1113/jphysiol.2013.261198
17. Lian X, Zhang J, Azarin SM, et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc*. 2013;8(1):162–175. doi: 10.1038/nprot.2012.150
18. Burridge PW, Matsa E, Shukla P, et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods*. 2014;11(8):855–860. doi: 10.1038/nmeth.2999
19. Kovalenko SG. *Investigation of electrophysiologic activity of cardiomyocytes of different types and their application for studying pro- and antiarrhythmic properties of used and prospective pharmaceuticals* [dissertation]. Dolgoprudny; 2023. (In Russ.) EDN: CMZBHB
20. Karbassi E, Fenix A, Marchiano S, et al. Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17(6):341–359. doi: 10.1038/s41569-019-0331-x EDN: ACQWTZ
21. Slotvitsky MM, Tselaya VA, Frolova SR, et al. The study of the functionality of cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells for the modeling of cardiac arrhythmias based on long QT syndrome. *Vavilov Journal of Genetics And Breeding*. 2018;22:187–195. doi: 10.18699/VJ18.346 EDN: YSOQDG
22. Abrasheva VO, Kovalenko SG, Slotvitsky M, et al. Human sodium current voltage-dependence at physiological temperature measured by coupling a patch-clamp experiment to a mathematical model. *J Physiol*. 2024;602(4):633–661. doi: 10.1113/JP285162 EDN: JPYFKN
23. Weiss JN, Garfinkel A, Karagueuzian HS, et al. Early afterdepolarizations and cardiac arrhythmias. *Heart Rhythm*. 2010;7(12):1891–1899. doi: 10.1016/j.hrthm.2010.09.017
24. Zhou J, Yi J, Hu N, et al. Activation of protein kinase A modulates trafficking of the human cardiac sodium channel in *Xenopus* oocytes. *Circ Res*. 2000;87(1):33–38. doi: 10.1161/01.res.87.1.33
25. Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh YH. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev*. 2007;87(2):425–456. doi: 10.1152/physrev.00014.2006
26. Jost N, Papp JG, Varró A. Slow delayed rectifier potassium current (IKs) and the repolarization reserve. *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 2007;12(1):64–78. doi: 10.1111/j.1542-474X.2007.00140.x
27. Banyasz T, Jian Z, Horvath B, et al. Beta-adrenergic stimulation reverses the I Kr-I Ks dominant pattern during cardiac action potential. *Pflugers Arch*. 2014;466(11):2067–2076. doi: 10.1007/s00424-014-1465-7 EDN: PGNKWG
28. Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, et al. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation*. 2001;103(1):89–95. doi: 10.1161/01.cir.103.1.89
29. Vincent GM, Schwartz PJ, Denjoy I, et al. High efficacy of beta-blockers in long-QT syndrome type 1: contribution of noncompliance and QT-prolonging drugs to the occurrence of beta-blocker treatment “failures”. *Circulation*. 2009;119(2):215–221. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.772533 EDN: MLRQEJ
30. Devenyi RA, Ortega FA, Groenendaal W, et al. Differential roles of two delayed rectifier potassium currents in regulation of ventricular action potential duration and arrhythmia susceptibility. *J Physiol*. 2017;595(7):2301–2317. doi: 10.1113/JP273191
31. Liu GX, Choi BR, Ziv O, et al. Differential conditions for early afterdepolarizations and triggered activity in cardiomyocytes derived from transgenic LQT1 and LQT2 rabbits. *J Physiol*. 2012;590(5):1171–1180. doi: 10.1113/jphysiol.2011.218164
32. Xie Y, Grandi E, Puglisi JL, et al.  $\beta$ -adrenergic stimulation activates early afterdepolarizations transiently via kinetic mismatch of PKA targets. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;58:153–161. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.02.009
33. Xie Y, Grandi E, Bers DM, Sato D. How does  $\beta$ -adrenergic signalling affect the transitions from ventricular tachycardia to ventricular fibrillation? *Europace*. 2014;16(3):452–457. doi: 10.1093/europace/eut412

## ОБ АВТОРАХ

\* **Агладзе Константин Игоревич**, д-р биол. наук;  
адрес: Россия, 129110, Москва, ул. Щепкина, д. 61/2;  
ORCID: 0000-0002-9258-436X;  
eLibrary SPIN: 6960-8351;  
e-mail: agladze@yahoo.com

**Коваленко Сандаара Георгиевна**, канд. физ.-мат. наук;  
ORCID: 0000-0003-3519-1962;  
eLibrary SPIN: 8236-8387;  
e-mail: sandaara.romanova@phystech.edu

**Фролова Шейда Рауф кызы**, канд. биол. наук;  
ORCID: 0000-0001-5325-8118;  
eLibrary SPIN: 4604-2358;  
e-mail: sh.frolova@monikiweb.ru

**Романова Серафима Артуровна**;  
ORCID: 0000-0002-4223-0133;  
eLibrary SPIN: 8562-6622;  
e-mail: scherbina\_serafima@mail.ru

**Цвеля Валерия Александровна**, канд. биол. наук;  
ORCID: 0000-0002-3554-9736;  
eLibrary SPIN: 7553-1038;  
e-mail: vts93@yandex.ru

**Сюняев Роман Альбертович**, канд. физ.-мат. наук;  
ORCID: 0000-0001-9582-0199;  
eLibrary SPIN: 9735-7072;  
e-mail: roman.syunyaev@gmail.com

## AUTHORS' INFO

\* **Konstantin I. Agladze**, Dr. Sci. (Biology);  
address: 61/2 Shchepkina st, Moscow, Russia, 129110;  
ORCID: 0000-0002-9258-436X;  
eLibrary SPIN: 6960-8351;  
e-mail: agladze@yahoo.com

**Sandaara G. Kovalenko**, Cand. Sci. (Physics and Mathematics);  
ORCID: 0000-0003-3519-1962;  
eLibrary SPIN: 8236-8387;  
e-mail: sandaara.romanova@phystech.edu

**Sheida R. Frolova**, Cand. Sci. (Biology);  
ORCID: 0000-0001-5325-8118;  
eLibrary SPIN: 4604-2358;  
e-mail: sh.frolova@monikiweb.ru

**Serafima A. Romanova**;  
ORCID: 0000-0002-4223-0133;  
eLibrary SPIN: 8562-6622;  
e-mail: scherbina\_serafima@mail.ru

**Valeria A. Tselaya**, Cand. Sci. (Biology);  
ORCID: 0000-0002-3554-9736;  
eLibrary SPIN: 7553-1038;  
e-mail: vts93@yandex.ru

**Roman A. Syunyaev**, Cand. Sci. (Physics and Mathematics);  
ORCID: 0000-0001-9582-0199;  
eLibrary SPIN: 9735-7072;  
e-mail: roman.syunyaev@gmail.com

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author