Пейсмекерные f-каналы миоцитов синусового узла, как новая терапевтическая мишень для снижения частоты сердечных сокращений

Е.И. Асташкин, М.Г. Глезер

Московская медицинская академия им. И.М.Сеченова. Москва, Россия

Pace-maker f-channels of sinus node myocytes as a new therapeutic target for heart rate reduction

E.I. Astashkin, M.G. Glezer

I.M. Sechenov Moscow Medical Academy. Moscow, Russia

Контроль пейсмекерной активности сердца осуществляется высоко специализированными миоцитами синусового узла (СУ) и тесно связан с функциональной активностью f-каналов, через которые протекает I_f ток, переносимый катионами Na^+ и K^+ в цитоплазму клеток. Активация f-каналов происходит при гиперполяризации плазматических мембран пейсмекерных клеток в области диастолических значений мембранного потенциала. Экспериментально продемонстрировано участие I_f тока в запуске процесса медленной диастолической деполяризации (ДД), а также в регуляции скорости протекания этого процесса под влиянием эндогенных нейромедиаторов и экзогенных химических агентов. Снижение количества открытых f-каналов уменьшает величину I_f тока, тормозит скорость ДД и увеличивает время достижения пороговых значений мембранного потенциала. Это обуславливает снижение частоты сердечных сокращений (ЧСС). Величина I_f тока контролируется также в результате прямого связывания с белками f-каналов циклического аденозинмонофосфата, уровень которого в цитоплазме миоцитов СУ изменяется под влиянием нейромедиаторов вегетативной нервной системы (ВНС); с помощью этого механизма ВНС регулирует ЧСС в физиологических условиях. Поиск химических агентов, избирательно влияющих на f-каналы, привел к созданию инновационного лекарственного препарата ивабрадина (Кораксан®), используемого для лечения стенокардии у пациентов с синусовым ритмом. Препарат снижает ЧСС за счет снижения I_f тока и увеличения продолжительности ДД. Уникальной особенностью ивабрадина служит отсутствие его влияния на другие виды ионных каналов.

Ключевые слова: пейсмейкерная активность, синусовый узел, f-каналы, I_f ток, ивабрадин, частота сердечных сокращений, лечение стенокардии.

Heart pace-maker activity is controlled by highly specialized sinus node (SN) myocytes. This control is linked to functional activity of f-channels providing Na+ and K+ If current. F-channels are activated by plasmatic membrane hyperpolarization in pace-maker cells, at diastolic values of membrane potential. Recent experiments have demonstrated that If current activates slow diastolic depolarization (DD) and regulates the rate of this process, together with endogenous neuromediators and exogenous chemical agents. Decrease in the quantity of open f-channels reduces If current, DD rate and increases threshold membrane potential time. As the result, heart rate (HR) decreases. If current is also controlled by cAMP binding to f-channel proteins. cAMP level in SN myocyte cytoplasma is influenced by autonomous nervous system (ANS) neuromediators. This is the mechanism for ANS regulation of HR in physiological settings. Search for chemical agents selectively targeting f-channels resulted in the development of a new medication, ivabradine (Coraxan®), which is used for angina treatment in patients with sinus rhythm. The medication decreases HR by If current reduction and DD time increase. Importantly, ivabradine does not affect other ion channels.

Key words: Pace-maker activity, sinus node, f-channels, If current, ivabradine, heart rate, angina treatment.

©Коллектив авторов, 2007
Тел.: (499)972-96-12
e-mail: glezermg@mtu-net.ru

Введение

Самопроизвольные сокращения сердца на протяжении всей жизни человека возникают в результате спонтанной электрической активности миоцитов, локализованных в синусовом узле (СУ), расположенном в правом предсердии [3]. Электрические токи через плазматическую мембрану таких миоцитов (пейсмекерных клеток) обусловлены транспортом катионов Na^+, K^+ и Ca^{2+} по селективным ионным каналам. Характерным свойством пейсмекерных клеток является их способность без внешних воздействий, спонтанно, с определенной частотой генерировать потенциалы действия (ПД), которые распространяются по сердцу и определяют ритм его сокращений. В основе этой способности лежит активность разных типов ионных каналов, ответственных за формирование особой фазы изменений мембранного потенциала (МП) – фазы медленной деполяризации. Эта фаза совпадает во времени с развитием диастолы и происходит при значениях МП, регистрируемых в этот период. По этой причине ее также часто называют фазой медленной диастолической деполяризации (ДД). Фаза ДД начинается в конце ПД и длится до тех пор, пока значения МП не достигают некоторого порога, с которого возникает новый ПД [2]. Таким образом, именно медленная ДД, представляющая собой один из видов электрической нестабильности наружных мембран пейсмекерных клеток, ответственна за спонтанное возникновение ПД [7]. Возникновение и развитие ДД обусловлены скоординированной активностью ионных каналов разных видов [3,4,11], тесно связаны с работой электрогенного Na^+/Ca^{2+} обменника сарколеммы миоцитов СУ и выходом ионов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума [5]. Однако ведущая роль в запуске медленной ДД и регуляции начальной скорости ее развития принадлежит ионному току, который переносится Na^+ и K^+ по так называемым f-каналам в цитоплазму клеток при гиперполяризации мембраны [1,2,6].

Целью обзора является анализ структуры и свойств f-каналов, а также механизмов, участвующих в формировании и развитии фазы медленной ДД. Особое внимание будет уделено механизму действия ивабрадина – первого инновационного препарата, избирательно снижающего активность f-каналов, который не оказывает существенного влияния на другие типы ионных каналов, принимающих участие в возникновении и развитии ПД, а также контролирующих сократимость кардиомиоцитов (КМЦ).

Некоторые электрофизиологические особенности клеток сердца

Клетки сердца условно можно разделить на три группы:

- КМЦ, специализирующиеся на сокращении;
- клетки СУ и проводящей системы сердца, спонтанно генерирующие ПД и способные к самопроизвольному сокращению;
- электроневозбудимые клетки соединительной ткани.

КМЦ характеризуются несколькими фундаментальными электрофизиологическими (ЭФ) явлениями: автоматизмом, проводимостью, возбудимостью и сократимостью.

Автоматизм сердца – самопроизвольное сокращение сердца, которое происходит без внешних управляющих воздействий. В основе автоматизма сердца в физиологических условиях лежит спонтанное возникновение ПД в пейсмекерных клетках СУ. Как указывалось, автоматизм сердца неразрывно связан с фазой спонтанной медленной ДД, которая выступает как главный отличительный признак пейсмекерных клеток, способных самостоятельно, самопроизвольно генерировать ПД и сокращаться.

Проводимость – распространение ПД, возникшего в пейсмекерных клетках СУ, по всему сердцу, в т.ч. с помощью высоко специализированной проводящей системы.

Возбудимость – возникновение ПД в покоящихся КМЦ в ответ на волну возбуждения.

Сократимость – способность КМЦ к сокращению.

В основе ЭФ процессов лежит направленный перенос зарядов через плазматическую мембрану клеток сердца. Возникновение трансмембранных токов происходит в результате пассивного, не требующего затрат энергии, в частности расхода аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ-ATP), транспорта ионов (диффузия) через биологические мембраны. Этот транспорт может происходить по нескольким механизмам:

- растворение и диффузия гидрофобного иона в липидной фазе мембраны;
- по ионным каналам (водным порам), стенки которых выстланы белками, определяющими свойства каналов;
- с помощью белковых молекул переносчиков.

В клетках сердца транспорт ионов происходит, главным образом, по двум последним механизмам. Основные токи через мембраны клеток сердца связаны с транспортом катионов K^+, Na^+ и 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, состоящий из двух компонентов – концентрационного градиента ионов (разности их концентраций с внешней и внутренней стороны мембраны) и трансмембранной разности электрических потенциалов.

Концентрационный градиент обеспечивается работой ионных насосов, которые осуществляют активный АТР-зависимый транспорт ионов против их

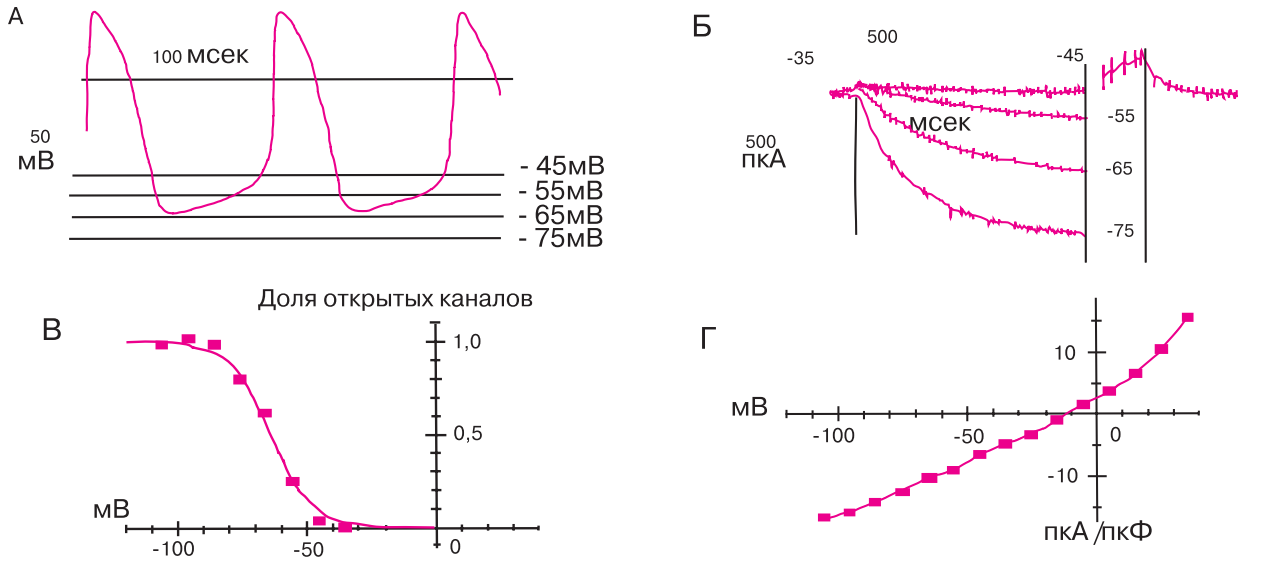


Рис. 1 (А,Б,В,Г) Характеристики тока, протекающего по f-каналам в клетках СУ.

А. Спонтанная электрическая активность миоцитов СУ (пейсмекерных клеток). Указаны значения МП, при которых происходит фаза медленной ДД.

Б. I_f-токи, зарегистрированные в пейсмекерных клетках при ступенчатой гиперполяризации МП от -45 до -75 мВ. Эти же значения МП указаны на рис. 1А, т.е. I_f-ток активируется в области диастолических значений МП.

В. Кривая активации f-каналов в зависимости от приложенных МП. При МП равном -100 мВ все каналы переходят в открытое состояние.

Г. Вольт-амперная характеристика I_f-тока, полученная на изолированой пейсмекерной клетке СУ. При построении кривой была учтена емкость плазматической мембраны. ПР равен ~ -15 мВ, что отражает смешанную природу I_f-тока, который переносится ионами Na^+ и K^+ [2].

электрохимических градиентов. В КМЦ описано существование Na^+/K^+ - насоса (Na-K-АТР-азы) и Ca^{2+}-насоса сарколеммы, а также Ca^{2+}- насоса саркоплазматического ретикулума (Са-АТР-азы), которые используют энергию АТР для формирования и поддержания соответствующих ионных градиентов.

Транспорт ионов по ионным каналам – электрогенен. Это значит, что в результате движения через мембрану ионов возникает разность электрических потенциалов, которой изначально не было. Если же разность потенциалов уже существует, то ее величина влияет на движение ионов. При больших значениях МП за счет энергии разности электрических потенциалов может происходить движение ионов одного вида даже против собственного концентрационного градиента.

При переносе в цитоплазму клеток катионов Na^+ или Ca^{2+}, МП изменяется от отрицательных до более положительных значений (например, от -80 до +20 мВ), т.е. происходит деполяризация наружной мембраны.

При транспорте K^+ из клеток наружу на пике ПД величина МП становится более электроотрицательной и изменяется от +40 мВ до -70 мВ, т.е. плазматическая мембрана реполяризуется.

При достижении МП больших отрицательных значений (-60 или -80 мВ) говорят о гиперполяризации мембраны.

Помимо движущей силы для возникновения тока по ионным каналам необходим переход канала в открытое состояние. Каналы открываются или закрываются в результате изменения МП или при воздействии химических агентов. Некоторые каналы (например, для ионов Na^+, K^+ и Ca^{2+}) переходят в открытое состояние в том случае, когда МП становится более положительным относительно исходного уровня, т.е. при деполяризации; другие каналы, например, f-каналы – когда МП становится более отрицательным, т.е. при гиперполяризации. Такие потенциал-зависимые каналы описаны в электровозбудимых клетках, например, мышечных и нервных. Потенциал-независимые каналы, которые преобладают в «электроневозбудимых» клетках, например, клетки крови, печени, соединительной ткани, эндотелиальные и др., не активируются МП, т.е. не переходят в открытое состояние при изменении МП. Они открываются в результате воздействия нейромедиаторов, гормонов, цитокинов, вторичных мессенджеров и других агентов. Отношение доли ионных каналов одного типа, которая открыта в данный момент времени, ко всему их количеству называется «вероятностью нахождения этих каналов в открытом состоянии» (P_0). Чем больше значение P_0, тем больше величина «проводимости» для данного тока (ток на единицу движущей силы) и меньше сопротивление мембраны [7].

Концентрационные и электрические градиенты через мембрану имеют противоположное направление. В состоянии равновесия эти градиенты уравновешивают друг друга. В этих условиях суммарный поток ионов в клетку и из клетки равен нулю. Величина МП, при которой устанавливается подобное равнове-

сие, получила наименование «равновесный потенциал». Каждый вид ионов имеет свой равновесный потенциал (Е): E_K – равновесный потенциал для K^+, E_{Ca} – для Ca^{2+} и т.д. Движущая сила для переноса через мембрану данного вида иона задается разницей между текущими значениями МП (E_M) и E_K, E_{Na}, E_{Ca}. Ток направлен внутрь клетки, если его движущая сила отрицательная, ($E_M - E_K < 0$), и наружу – если его движущая сила положительная ($E_M - E_K > 0$).

Таким образом, каждый ионный ток через мембрану меняет свое направление на противоположное (реверсирует) при величине МП отличного в ту или другую сторону от мембранного «потенциала реверсии» (ПР) для данного тока. При ПР ток через мембрану равен нулю; ПР для тока, который переносится одним видом катионов, равен равновесному потенциалу для этого иона. Если ток переносится двумя разными катионами, его ПР будет расположен между равновесными потенциалами для каждого типа катиона.

В клетках млекопитающих равновесный потенциал ионов K^+ отрицателен (~ -95 мВ). Движущая сила для ионов K^+, например, при E_M, который равен -70 мВ, составляет $E_M - E_K = [-70 мВ - (-95 мВ)] = +25$ мВ, т.е. K^+ ток направлен наружу, что и делает внутреннюю сторону мембраны более электроотрицательной (реполяризованной). Na^+ и Ca^{2+} ионы имеют положительные равновесные потенциалы (> +70 мВ), следовательно, переход каналов, проницаемых для каждого из этих ионов, в открытое состояние приводит к возникновению тока, переносимого ионами Na^+ или Ca^{2+} внутрь клеток, что сопровождается деполяризацией плазматической мембраны.

ПД в одиночных изолированных КМЦ, локализованных в разных отделах сердца, характеризуется разной формой, длительностью, скоростью и наличием различных фаз в изменениях разности потенциалов на сарколемме. Столь большое разнообразие регистрируемых параметров отражает активность разных типов ионных каналов и протекающих по этим каналам различных ионных токов, которые активируются при формировании ПД [8].

КМЦ, специализирующиеся на сократительной активности, имеют, так называемый потенциал покоя (ПП), который представляет разность электрических потенциалов через плазматическую мембрану в состоянии покоя. ПП возникает в результате высокой проницаемости мембран этих клеток для K^+. ПП имеет отрицательное значение –80 мВ, которое поддерживается большим K^+ током (I_K) из клеток. В связи с этим сопротивление мембраны в этот момент времени низкое, что способствует созданию условий, при которых МП остается неизменным во времени. Действительно, ПП клеток миокарда не меняется до тех пор, пока этих клеток не достигнет волна деполяризации, запускаемая в клетках СУ, в которых ПД возникает спонтанно и периодически, а затем распространяются по всему сердцу. При регистрации электрической активности пейсмекерных клеток СУ выявлен ряд отличительных признаков:

- в пейсмекерных клетках отсутствует фаза ПП, вместо которой наблюдается фаза медленной ДД
- фаза ДД совпадает по времени с диастолой сердца
- эта фаза наблюдается при диастолических значениях МП

Сопротивление плазматической мембраны этих клеток в фазу ДД в ~ 30 раз более высокое по сравнению с КМЦ [8]. В результате этого возникает электрическая нестабильность МП, когда небольшой ток приводит к существенным изменениям разности электрических потенциалов, в соответствии с законом Ома:

(небольшой ток) • (большое сопротивление) = большое изменение МП.

В основе сократительной активности сердца лежит сопряжение между электрическими процессами, протекающими в плазматической мембране, и сократительными элементами цитоплазмы КМЦ. В результате деполяризации сарколеммы происходит активация потенциал регулируемых Ca^{2+} каналов L-типа (VOC Ca^{2+} каналы L-типа), что приводит к поступлению относительно небольшого количества ионов Ca^{2+} из внеклеточной среды в цитоплазму клеток. Эти ионы Ca^{2+} выполняют роль триггера, запускающего массовый выход ионов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума. Именно ионы Ca^{2+}, освободившиеся из данного внутриклеточного хранилища, участвуют в акте мышечного сокращения [9].

Подводя итог, можно заключить, что электрический цикл сердца сводится по существу к последовательным изменениям проводимости мембраны для определенных видов ионов. В свою очередь, перевод различных типов ионных каналов в открытое или закрытое состояния регулируется величиной и полярностью МП в данный момент времени.

Пейсмекерная активность сердца и f-каналы

В основе самопроизвольного сокращения КМЦ, расположенных в СУ, лежит спонтанное возникновение с определенной частотой ПД, распространение которых по всему сердцу задает ритм сердечных сокращений. Частота возникновения ПД зависит от скорости развития фазы ДД, т.е. от тангенса угла наклона начального этапа этой фазы, и от того, когда МП достигнет определенного значения, с которого начнется новый ПД. Полагают, что за возникновение фазы ДД ответственен ток, протекающий по f-каналам – I_f ток [1,2,6,8,11,12]. Высоко специализированные f-каналы (funny channels – странные, необычные каналы) получили свое название благодаря особым свойствам [1,10,11].

Основные характеристики I_f тока, протекающего по f-каналам в пейсмекерных клетках СУ, представлены на рисунке 1.

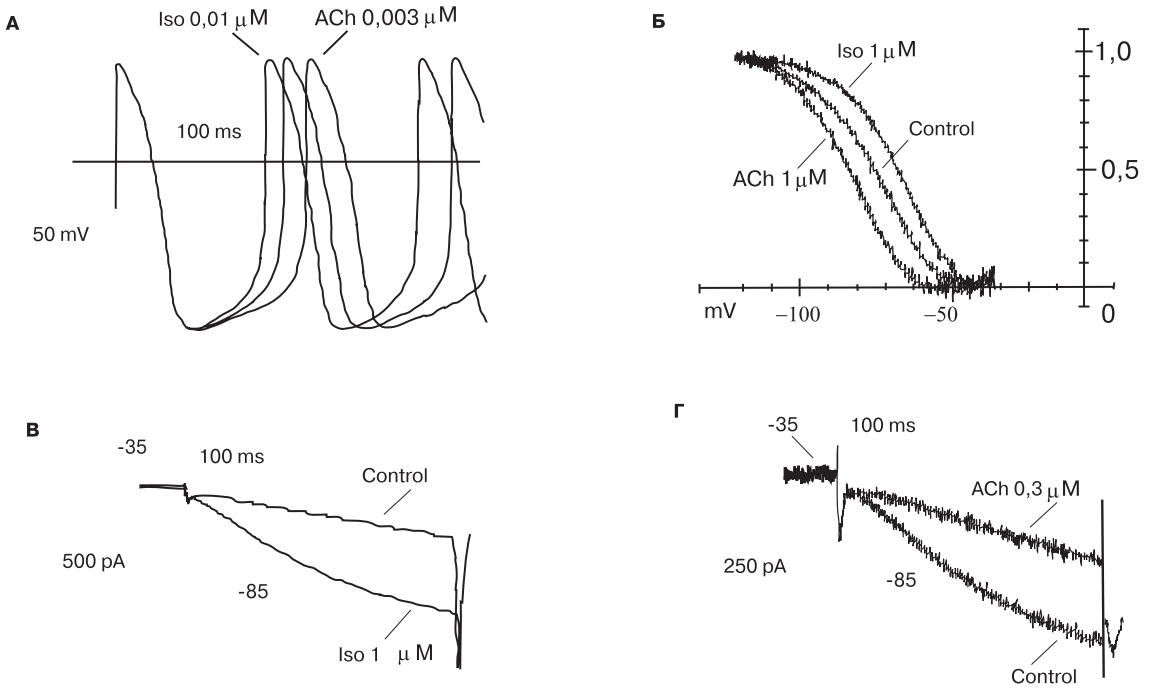


Рис. 2 (А,Б,В,Г) Регуляция электрической активности клеток СУ под влиянием нейромедиаторов ВНС связана с I_f-током [10].

А. 0,01 мкМ изопреналина (Iso) ускоряет, а 0,003 мкМ ацетилхолина (Ach) тормозит спонтанную электрическую активность изолированной пейсмекерной клетки СУ в результате изменения скорости ДД. Следует отметить, что амплитуда, вид и длительность ПД под влиянием нейромедиаторов не изменяются.

Б. Влияние 1 мкМ изопреналина (Iso) и 1 мкМ ацетилхолина (Ach) на кривую активации I_f-тока, определенную по изменению скорости тока при фиксированных значениях потенциалов на плазматической мембране. Iso смещает кривую в область более положительных значений МП, а Ach - в область более отрицательных значений МП.

В. Изопреналин (1 мкМ) увеличивает скорость и амплитуду I_f-тока при МП, равным -85 мВ.

Г. Ацетилхолин (0,3 мкМ) уменьшает скорость и амплитуду I_f-тока при -85 мВ. Изменения, описанные на рис. 2Б, 2В и 2Г, ответственны за изменение скорости и длительности ДД, которые представлены на рис. 2А.

Установлено, что:

• f-каналы переходят в открытое состояние при гиперполяризации плазматической мембраны, когда значения МП становятся меньше пороговой величины для этих каналов, т.е. при -45 мВ и более электроотрицательных потенциалах (рисунки 1 А и Б);

• в специально созданных лабораторных условиях переход всех f-каналов в открытое состояние происходит при МП, равном ~ -100 мВ (рисунок 1В);

• I_f ток направлен внутрь клеток (рисунок 1 Б) и переносится ионами Na^+ и K^+ (рисунок 1 Г);

• благодаря участию двух видов катионов в I_f токе, его ПР находится между -10 и -20 мВ (рисунок 1 Г);

• I_f ток характеризуется медленной активацией и кинетикой – при МП -85 мВ константа времени активации канала составляет ~ 500 мсек;

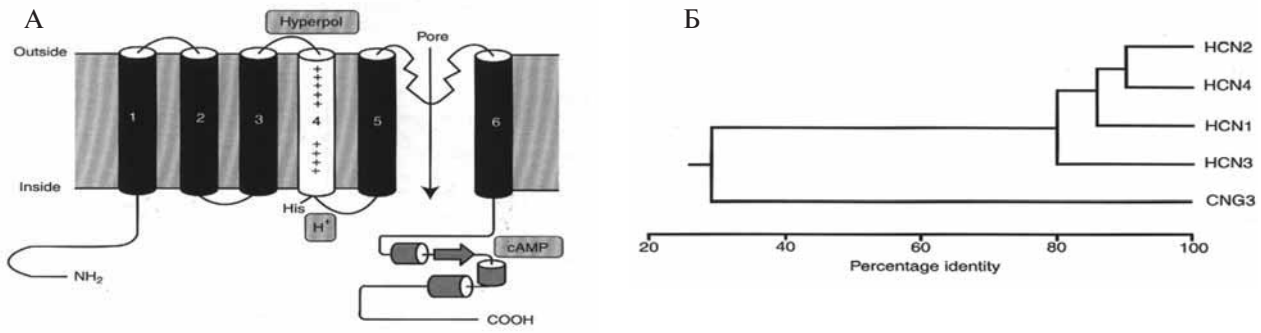
• I_f ток имеет очень маленькую амплитуду (рисунок 1 Б);

• I_f ток регулируется изменением внутриклеточной концентрации циклического аденозин-3',5'- монофосфата (цАМФ), который напрямую связывается с белками f-канала [1,2,6,8,10,11].

Следует отметить, что I_f ток выступает в качестве ЭФ маркера клеток сердца, обладающих автоматизмом. Действительно, I_f ток был обнаружен во всех спонтанно сокращающихся клетках сердца млекопитающих, начиная от СУ и кончая клетками атриовентрикулярного узла, пучка Гиса и волокон Пуркинье [8]. Однако, f-каналы экспрессируются, в основном, в СУ, на периферии которого их плотность особенно высока. В плазматических мембранах f-каналы локализуются в высоко специализированных липидных доменах (lipid rafts), отличающихся по своему составу и свойствам от остального липидного бислоя. В этих доменах происходит регуляция активности f-каналов цАМФ и другими химическими соединениями [13].

Регуляция I_f тока и частоты сердечных сокращений (ЧСС) медиаторами автономной нервной системы

При изучении механизма действия нейромедиаторов вегетативной нервной системы (ВНС) на ЧСС были получены результаты, свидетельствующие о ключевой роли I_f тока в регуляции этого процесса. Адреналин и его аналоги увеличивают I_f ток и соответственно ЧСС [1,2] (рисунок 2). Это обусловлено увеличением вероятности нахождения f-каналов в открытом состоянии, что отражается в смещении кривой зависимости величины I_f тока от приложенного потенциала в область более положительных значений МП (рисунок 2 В). Другими словами, при концентрации изопреналина 1 мкмоль/л зависимость доли открытых f-каналов от МП смещается ~ на 13 мВ вправо



Примечание: (а) Мономерный белок f-канала состоит из шести трансмембранных доменов (S1-S6). Нативный канал, по-видимому, представляет собой тетрамерный ансамбль, который может включать гетеромерную смесь различных изоформ HCN-белков. В состав S4 домена входят положительно заряженные аминокислоты, формирующие сенсорный датчик МП; при деполяризации этот домен способен смещаться относительно плоскости мембраны наружу. Пептидная петля между S5-S6 доменами участвует в образовании поры f-канала. Недалеко от внутриклеточного С-конца молекулы находится домен, связывающий циклические нуклеотиды, который при связывании с цАМФ активирует канал. Гистидин (His321) на S4 домене реагирует на изменение внутриклеточного pHi и при ацидозе ингибирует переход f -канала в открытое состояние [8]; (b) показана идентичность различных изоформ HCN-белков в %. Для сравнения приведена топология 3-изоформы белка канала, регулируемого циклическими нуклеотидами (CNG3).

Рис. 3. Схема структуры белка f-канала (HCN канал)[6].

(рисунок 2 Б). Подобное смещение при диастолических значениях МП сопровождается увеличением I_f тока (рисунок 2 В). В результате процесс ДД ускоряется и порог, с которого начинается ПД, достигается быстрее, что приводит к увеличению ЧСС (рисунок 2 А). Таков механизм положительного хронотропного действия симпатических стимулов [1,2,6,10].

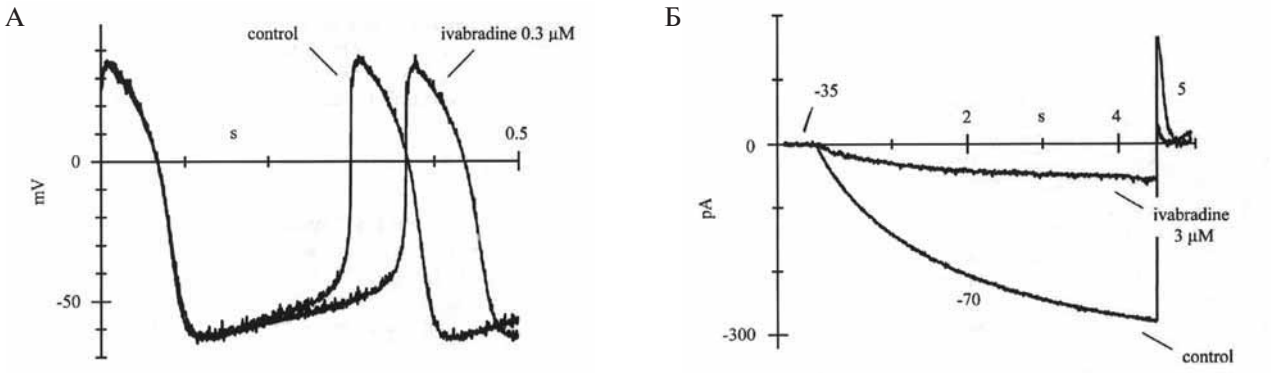
Изменение ЧСС при активации парасимпатической системы связано с влиянием ацетилхолина на величину I_f тока, которое прямо противоположно эффекту адреналина (рисунок 2). Этот нейромедиатор снижает величину I_f тока (рисунок 2 Г), кривая активации f-каналов смещается влево, т.е. в область более электроотрицательных значений МП (рисунок 2 Б). Таким образом, при действии ацетилхолина падает скорость ДД и тормозится ЧСС (рисунок 2 А) [10].

Изучение молекулярных механизмов, ответственных за действие адреналина и ацетилхолина, позволило установить связь описанных выше эффектов нейромедиаторов с системой цАМФ. В результате взаимодействия адреналина с β-адренорецепторами, экспрессированными на поверхности пейсмекерных клеток, происходит активация аденилатциклазы и увеличение внутриклеточной концентрации цАМФ, который непосредственно связывается с белком f-канала и увеличивает I_f ток. Напротив, ацетилхолин в низких концентрациях (от 3 до 30 нМ), снижает активность аденилатциклазы, уменьшает внутриклеточную концентрацию цАМФ, что приводит к падению величины I_f тока и торможению ЧСС. В концентрациях в 30-40 раз более высоких ацетилхолин действует по принципиально другому механизму, активируя K^+ каналы, по которым течет наружу направленный калиевый реполяризующий ток ($I_{K,Ach}$).

Позже были выявлены аминокислотные последовательности в белках, формирующих f-каналы, ответственные за прямое связывание цАМФ с белком канала (рисунок 3) [14-16]. Это принципиально отличает регуляцию активности f-каналов от регуляции других видов ионных каналов, например кальциевых. В классических случаях цАМФ регулирует активность ионных каналов вследствие их фосфорилирования цАМФ-зависимой протеин киназой.

Молекулярная структура f-каналов

Молекулярной основой f-каналов является семейство белков, известных под названием белков HCN (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated) каналов, т.е. каналов активируемых гиперполяризацией и регулируемых циклическими нуклеотидами. Эти белки были клонированы [14-17]. Идентифицировано четыре изоформы HCN1-4 белков [15]. Однако роль и вклад каждой изоформы HCN белков в гетеротетрамерную структуру f-каналов и генерацию I_f тока в клетках СУ человека долго оставались неизвестными. В клетках разных отделов сердца человека была обнаружена экспрессия двух изоформ белков: hHCN4 и hHCN2. В 2007г с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (RT-PCR) было установлено, что в клетках СУ изоформа hHCN4 преобладает над изоформами hHCN2 и hHCN1 и, по-видимому, вносит основной вклад в формирование f-каналов [12] и регуляцию ЧСС. Подтверждением этому может служить описание случаев синусовой брадикардии у некоторых родственников большой итальянской семьи, которые имели мутацию гена hHCN4 в клетках СУ [19]. Следует отметить, что HCN4 является также доминантной изоформой, экспрессированной в СУ у кроликов [18], мышей [20] и собак [21]. Оказалось, что эмбрионы мышей, у которых нет HCN4 каналов, нежизнеспособны и погибают в десятидневном возрасте. До гибели у этих эмбрионов отмечали снижение величины I_f тока в пейсмекерных клетках в среднем на 85%, а также резкое замедление ЧСС [22]. В то же время, у мышей, нокаутированных по HCN2, проявлялась только синусовая аритмия, которая не сопровождалась бра-



Примечание: А - по оси абсцисс (время в сек); по ординате - МП (в мВ). Б - по оси абсцисс (время в сек); по ординате - I_f ток (в пкА).

Рис. 4 Влияние ивабрадина (0,3 мкМ) на скорость и длительность ДД (А), а также на I_f ток (3 мкМ) в одиночной пейсмекерной клетке СУ кролика (Б) [32].

дикардией или существенными изменениями в регуляции ЧСС со стороны ВНС [23]. Таким образом, HCN4 изоформа белка f-каналов, по-видимому, играет важнейшую роль в генерации пейсмекерной активности сердца в клетках СУ.

Фармакологическая регуляция I_f тока как эффективный терапевтический подход для лечения стенокардии

Снижение ЧСС является одним из основных направлений лечения стенокардии напряжения, т.к. уменьшение потребности сердца в кислороде обеспечивает снижение или предупреждение ишемии миокарда. В идеале лекарственный препарат, тормозящий ЧСС, не должен влиять на другие функции сердца, например, такие как сократимость сердца или проводимость. Однако, несмотря на то, что механизмы хронотропного и инотропного действий анатомически и функционально в сердце разделены, избирательное снижение ЧСС без отрицательного инотропного эффекта с помощью применяемых в настоящее время лекарственных препаратов: β-адреноблокаторы (β-АБ), недигидропиридиновые антагонисты кальция (АК) невозможно. Это обусловлено неспособностью указанных препаратов селективно воздействовать на механизмы, контролирующие ЧСС. Подобное противоречие было преодолено, когда удалось создать ивабрадин – химическое соединение, которое избирательно влияет на I_f ток [27,28].

По своей структуре ивабрадин (S16257, Прокоралан, Кораксан®, Лаборатории Сервье, Франция) является производным бензазепина – (3-(3-{[((7S)-3,4-диметоксибицикло[4,2,0]окта-1,3,5-триен-7-ил)метиламино}пропил)-1,3,4,5-тетрагидро-7,8-диметокси-2Н-бензазепин-2-один, гидрохлорид) [26].

В экспериментальных и клинических исследованиях показано, что ивабрадин специфически тормозит только I_f ток и, тем самым, уменьшает ЧСС в покое и при физической нагрузке. Отрицательный хронотропный эффект ивабрадина наблюдается в отсутствие инотропного или дромотропного эффектов [24]. Важно, что в фармакологических дозах ивабрадин не влиял на интервал QT [25]. Важным следствием подобных экспериментов было не только выяснение механизма действия ивабрадина, но и получение ответов на два принципиальных вопроса – какую роль в запуске и регуляции ДД играет I_f ток, а также какова связь между I_f током и ЧСС. Антиангинальная и антиишемическая эффективность ивабрадина была продемонстрирована у пациентов со стабильной стенокардией [29,30].

Механизм действия ивабрадина на f-каналы

На различных экспериментальных моделях было показано, что ивабрадин ингибирует I_f ток концентрационно зависимым образом. Это удлиняет фазу ДД и, как следствие, время достижения порога, с которого возникает новый ПД (рисунок 4 А, Б). Соответственно, чем медленнее происходит ДД, тем реже возникают ПД, тем меньше становится ЧСС [27,31,32]. Таким образом, прямым ЭФ подавления активности f-каналов при действии ивабрадина является уменьшение частоты возникновения ПД в пейсмекерных клетках СУ, что приводит к снижению ЧСС (рисунок 4 А).

Установлено, что концентрация ивабрадина, вызывающая 50% ингибирующий эффект (IC_{50}) нативного I_f тока в изолированных пейсмекерных клетках СУ кроликов, равна 2,8 мкМ [26] и 1,5 мкМ [32]. На овариальных клетках китайского хомячка (CHO клетки), в которые был перенесен (трансфецирован) ген hHCN4 белка человека, значение IC_{50} было существенно меньше – 0,54 мкМ [12], что может быть обусловлено большей чувствительностью этого белка человека к ивабрадину по сравнению с белками нативных f-каналов лабораторных животных.

Более детальное изучение ингибиторного эффекта ивабрадина показало, что с каждым f-каналом, взаимодействует одна молекула ивабрадина. Коэффициент Хилла, отражающий степень кооперативности взаимодействия исследуемого агента с каналом, составил 0,87 [12], что близко к значениям этого показателя для f-каналов в клетках СУ кроликов – 0,96 [26] и 0,8 [32].

Установлено, что ивабрадин влияет на f-каналы с внутренней, цитоплазматической стороны мембраны [11,32]. Таким образом, для снижения I_f тока (торможения транспорта ионов Na^+ и K^+ по каналу), ивабра-

дин должен сначала из цитоплазмы попасть внутрь f-канала, а затем достигнуть и специфически связаться с участком связывания на белке канала. Очевидно, что такой ингибиторный эффект может наблюдаться лишь в том случае, когда f-каналы находятся в открытом состоянии, т.е. при значениях МП более электроотрицательных, чем -40 мВ. Однако отрицательные значения МП и поток ионов Na^+ и K^+ по открытому f-каналу снаружи внутрь клетки не позволяют положительно заряженному ивабрадину достигнуть участка связывания, который расположен на белке в глубине канала. Экспериментально было показано, что обратимое связывание ивабрадина с этим участком происходит только после достижения МП значений, превышающих ПР, т.е. в тех условиях, когда I_f ток меняет свое направление и катионы K^+ начинают выходить из цитоплазмы клеток наружу (рисунок 5).

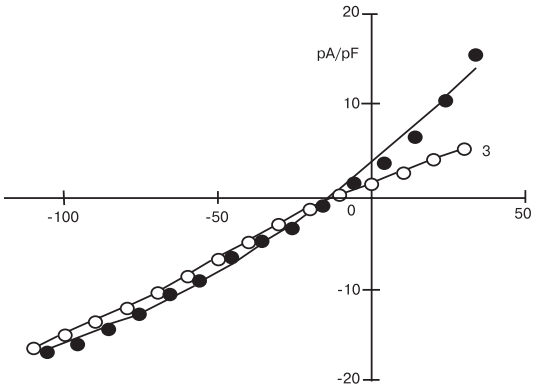
Из этих данных вытекает два важных следствия, определяющих эффективность ингибиторного эффекта ивабрадина:

• Подавляющий эффект ивабрадина зависит от направления тока, протекающего по f-каналам.

• Действие ивабрадина зависит от времени нахождения f-каналов в открытом состоянии, а этот показатель тем выше, чем чаще сокращается сердце.

Время выхода ингибиторного эффекта ивабрадина на стационарный уровень связано с его конечной концентрацией. Для получения стационарного снижения ЧСС при низких концентрациях ивабрадина (0,1 мкМ) на образцах СУ кроликов и морских свинок требовалось от 1 до 3 часов, на изолированном правом предсердии крыс (0,1–0,6 мкМ) для достижения максимального подавляющего эффекта ивабрадина необходимо 3 часа [34]. При использовании микромолярных концентраций ивабрадина такой же эффект наблюдался в пределах 20 минут.

Следует отметить, что время, требуемое для получения стационарного подавляющего эффекта ивабрадина на многоклеточных препаратах, было существенно более длительным в сравнении со временем, необходимым для подавления тока через hHCN4 каналы в CHO клетках. Эта разница может быть частично обусловлена тем, что при 5-секундной ступенчатой гиперполяризации CHO клеток наблюдается большая продолжительность нахождения f-каналов в открытом состоянии. Этого не происходит в пейсмекерных клетках в физиологических условиях, когда при более короткой продолжительности диастолы и при меньших гиперполяризующих значениях МП активируется лишь небольшая часть f-каналов. Однако когда для активации f-каналов использовали более длительную ступенчатую гиперполяризацию, например, МП скачком изменяли от -30 мВ до -100 мВ, и поддерживали это значение потенциала в течение 20 секунд, стационарный ингибиторный эффект ивабрадина на I_f ток развивался значительно медленнее. На основании этих результатов был сделан вывод о том, что для



Примечание: по оси абсцисс - приложенная разность потенциалов в мВ; по оси ординат - приведенное значение тока (пкА) с учетом емкости мембраны (пкФ) (пкА/пкФ).
• - контроль; о - ивабрадин (3 мкМ).

Рис. 5. Влияние ивабрадина на вольт-амперную характеристику I_f- тока, измеренного на отдельной пейсмекерной клетке, выделенной из СУ кролика [10].

выраженного подавляющего эффекта ивабрадина требуются быстрая смена состояния активации f-канала на инактивацию и обратно. При этом, чем выше была частота циклов активации/инактивации, тем эффект подавления был более выражен [32].

Доказательства того, что эффект ивабрадина зависит от частоты активации/инактивации f-каналов, были получены и в ряде других экспериментальных исследований. На фоне многократных циклов активации/инактивации f-каналов, вызываемых с помощью скачкообразного изменения потенциала на мембране, добавление ивабрадина приводит к медленному постепенному подавлению нативного I_f тока, которое через некоторое время достигает стационарного уровня [26,32]. Подобная кинетика развития эффекта ивабрадина может быть следствием либо его зависимости только от ЧСС, либо обусловлена временем, которое требуется для достижения связывающего участка, расположенного внутри f-канала. В первом случае единственным лимитирующим параметром является доступность открытых f-каналов; во втором случае присоединяется компонент, зависимый от времени. Чтобы ответить на эти вопросы проводили эксперименты с аналогичными ЭФ протоколами, которые отличались только двумя разными частотами активации каналов. При этом были получены две кинетики ингибиторного эффекта, которые зависели только от частоты ступенчатого изменения напряжения на мембране, а, следовательно, от доступности открытых каналов и не зависели от времени экспозиции [12]. Таким образом, для стационарного подавления ивабрадином активности f-каналов, сформированных из hHCN4 белков, необходимым условием является многократный переход этих каналов из открытого в закрытое состояние. При концентрации ивабрадина 0,3 мкМ это условие выполнялось примерно через 12 минут.

В ряде работ сравнили эффекты ивабрадина и ионов Cs^+, которые немедленно блокируют f-каналы, действуя снаружи клеток [2]. Известно, что ингибиторный эффект Cs^+ не зависит от величины отрицательного потенциала и частоты циклов активации [12]. Cs^+ в концентрации 2 мМ вызывал почти полное подавление тока по hHCN4 каналам (90%) при первой же гиперполяризации. В этих же опытах ивабрадин (3 мкМ) вызывал эквивалентное ингибирование hHCN4 каналов после 60 циклов активации/инактивации f-каналов. Это еще раз доказывает, что эффект ивабрадина развивается во времени и зависит от частоты активации f-каналов.

Cs^+ также индуцировал очень быстрое (через 5-10 мин) снижение спонтанного сокращения препаратов изолированного СУ и правого предсердия. Для получения аналогичного эффекта с ивабрадином требовалось 90-180 мин. Совокупность этих результатов позволяет предположить, что медленная кинетика подавляющего действия ивабрадина может быть связана с тем, что механизм его блокирующего эффекта зависит от ЧСС (use-dependent block), и в основе подобного действия лежит высокое сродство ивабрадина к открытым f-каналам [11,32].

В связи с этим интересно сравнение эффектов ивабрадина на препаратах СУ разных видов животных. Известно, что сердце крысы сокращается с частотой ~ 300 раз/мин., морской свинки – 250, а кролика – 200 раз/мин. ЧСС свиньи ближе всего к ЧСС человека и составляет 90 уд/мин. Ивабрадин в концентрации 3 мкМ, которая оказывала максимальное снижение частоты спонтанно сокращающихся препаратов СУ, вызывал стабильное снижение пейсмекерной активности у морских свинок более выраженное, чем у кроликов, и оно было наименее выражено у свиней. Очевидно, что вклад I_f тока в пейсмекерную активность сердец более мелких животных с большой ЧСС существенно больше по сравнению с крупными животными с меньшей ЧСС. Ивабрадин снижал частоту спонтанного возникновения ПД СУ свиньи на ~ 15%. Подобный эффект подавления наблюдается и у людей при использовании терапевтических доз ивабрадина [12].

Таким образом, терапевтическая эффективность ивабрадина связана, с одной стороны, с движущей силой, влияющей на поток катионов по f-каналам, а с другой – с частотой открывания/закрывания f-каналов, которая тем больше, чем чаще сокращается сердце.

Влияние ивабрадина на другие виды ионных каналов

В ряде работ было изучено влияние ивабрадина на другие ионные токи через мембраны пейсмекерных клеток, прежде всего I_K, $I_{Ca,L}$ и $I_{Ca,T}$. Известно, что в формировании фазы быстрой деполяризации ПД пейсмекерных клеток участвуют два типа ионных токов, которые переносятся Ca^{2+} по Т- и L-потенциал регулируемым кальциевым каналам. Ивабрадин в концентрациях ≥ 10 мкМ, которые во много раз превосходят средние концентрации, блокирующие I_f ток, не влиял на Т-тип кальциевых каналов [33], однако при самых высоких концентрациях ивабрадина наблюдалось слабое подавление (~ 18%) активности каналов L-типа. Такое, относительно слабое влияние на L-тип Ca^{2+} каналов позволило предположить, что ивабрадин в концентрациях, подавляющих активность f-каналов, не оказывает инотропного действия. Позже это предположение было подтверждено экспериментально на пейсмекерных клетках разных видов лабораторных животных [8]. Ивабрадин не влиял также на активность K^+ каналов, ответственных за фазу быстрой реполяризации ПД, а также в концентрациях существенно превышающих терапевтические, не изменял амплитуду и длительность ПД [33,35].

Таким образом, ЭФ опыты подтвердили факт, что ивабрадин является селективным ингибитором пейсмекерного I_f тока, и не изменяет существенным образом другие виды токов в миоцитах СУ [11].

Заключение

Анализ литературных данных позволяет сделать ряд важных выводов. Прежде всего, следует отметить ведущую роль, которую играет I_f ток в регуляции пейсмекерной активности сердца. Благодаря этому селективный ингибитор I_f тока – лекарственный препарат ивабрадин (Кораксан®) обладает уникальной способностью избирательно снижать ЧСС, не оказывая побочных эффектов, которые наблюдаются при использовании других лекарственных средств – АК и β-АБ, влияющих на различные типы ионных каналов.

Снижение ЧСС обеспечивает положительный терапевтический эффект при стабильной стенокардии, остром коронарном синдроме и сердечной недостаточности (СН). При урежении пульса уменьшается расход АТФ на мышечное сокращение и, как следствие, падает потребление кислорода. При низких значениях ЧСС возрастает кровоснабжение ишемизированных КМЦ по коронарным артериям, что обусловлено увеличением периода диастолической перфузии. Проведенные клинические исследования плацебо, контролируемые и сравнительные с классическими антиангинальными средствами позволили зарегистрировать препарат Кораксан® в качестве антиангинального средства для лечения пациентов со стабильной стенокардией, имеющих синусовый ритм.

По мнению специалистов, создание Кораксана®, избирательно снижающего ЧСС, выяснение механизма его действия (селективное подавление активности f-каналов клеток СУ), а также определение молекулярной структуры белков, формирующих f-каналы (HCN- белки) – все это является наиболее важным достижением последних 10 лет в области лекарственных средств, влияющих на сердечно-сосудистую систему.

Следует отметить, что I_f ток играет ведущую роль не только в контроле над ЧСС, связанной с пейсмекерной активностью клеток СУ. Этот ток, по-видимому, имеет существенно более широкое значение при ряде заболеваний сердечно-сосудистой системы. Установлено, что f-каналы экспрессируются также в клетках миокарда при гипертрофии и СН. Показано, что величина I_f тока значительно возрастает при этих состояниях по сравнению с контрольными здоровыми КМЦ. Увеличение I_f тока тесно связано с ростом содержания мРНК белков, формирующих f-каналы (HCN-белков). По мнению ряда авторов, рост количества f-каналов при СН может лежать в основе возникновения аритмий, потенциально ответственных за риск внезапной сердечной смерти. В связи с этим в настоящее время проводятся исследования, посвященные изучению действия препарата Кораксан® на f-каналы в КМЦ миокарда при гипертрофии и СН.

Литература

1. Brown HF, DiFrancesco D, Nooble SJ. How does adrenaline accelerate the heart? Nature 1979; 280: 235-6.
2. DiFrancesco D. Sinoatrial If current: a target for specific heart rate reduction. Medicographia 2002; 24(3): 218-24.
3. Irisawa H, Brown HF, Giles W. Cardiac pacemaking in sinoatrial node. Physiol Rev 1993; 73: 197-227.
4. Zhang H, Holden AV, Kodama I, et al. Mathematical models of action potentials in the periphery and center of the rabbit sinoatrial node. Am J Physiol 2000; 279: H397-421.
5. Lipsius SL, Husser J, Blatter LA. Intracellular Ca^{2+} release sparks atrial pacemaker activity. New Physiol Sci 2001; 16: 101-6.
6. DiFrancesco D. If current: state of the art. In "Selective & Specific If Inhibition in Cardiovascular Disease" Eds. By Singh B.N., Vanhoutte P.M., 2003, pp. 3-10, Lippincott Williams & Wilkins.
7. Zaza A, Rocchetti M. Regulation of the sinoatrial pacemaker: selective If inhibition by ivabradine// In: Fox K, Ferrari R. (Eds) Heart Rate Management in Stable Angina. Taylor& Francis Group, London and New York 2005; 51-67.
8. Shattock MJ, Curtis MJ. The role of If in the regulation of heart rate. Medicographia 2006; 28(3): 224-31.
9. Lakatta EG, Houser SR. Myocyte dysfunction in Heart Failure. Science & Medicine 1999: July/August: 8-17.
10. DiFrancesco D. If inhibition: a novel mechanism of action. Eur Heart J 2003; 5 (Suppl G): G19-25.
11. DiFrancesco D. Funny channels in control of cardiac rhythm and mode of action of selective blockers. Pharmacol Res 2006; 53: 399-406.
12. Thollon C, Bedut S, Villeneuve N, Coge F. Use-dependent inhibition of hHCN4 by ivabradine and relationship with reduction in pacemaker activity. Br J Pharmacol 2007; 150: 37-46.
13. Barbuti A, Gravante B, Riolfo M, et al. Localization of pacemaker channels in lipid rafts regulates channel kinetics. Circ Res 2004; 94: 1325-31.
14. Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, et al. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. Nature 1998; 393: 587-91.
15. Ludwig A, Zong X, Hofmann F, Biel M. Stucture and function of cardiac pacemaker channels. Cell Physiol Biochem 1999; 9: 179-86.
16. Ishii TM, Takano M, Xie LH, et al. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channek in rabbit heart sinoatrial node. J Biol Chem 1999; 274: 12835-9.
17. Baruscotti M, DiFrancesco D. Pacemeker channels. Ann NY Acad Sci 2004; 1015: 111-21.
18. Shi W, Wymore R, Yu H, et al. Distribution and prevalence of HCN mRNA expression in cardic tissues. Circ Res 1999; 85: e1-6.
19. Milanesi R, Baruscotti M, Gnecchi-Ruscone T, DiFrancesco M. Familial sinus bradicardia associated with a mutated cardiac pacemaker channel. N Engl J Med 2006; 354(2): 151-7.
20. Moosmang S, Steiber J, Zong X, et al. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. Eur J Biochem 2001; 268: 1646-52.
21. Zicha S, Fernandez-Velasco M, Lonardo G, et al. Sinus node dysfunction and hyperpolarization-activated (HCN) channel subunit remodeling in canine heart failure model. Cardiovasc Res 2005; 66: 472-81.
22. Stieber J, Herrmann S, Fiel S, et al. The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embrionic heart. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 15235-40.
23. Ludwig A, Budde T, Stieber J, et al. Absence epilepsy and sinus dysrthythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. EMBO J 2003; 22: 216-24.
24. Colin P, Ghaleh B, Hittinger L, et al. Differential effects of heart rate reduction and beta-blockade on left ventricular relaxation during exercise. Am J Physiol 2002; 282: H672-9.
25. Vilaine JP, Bidouard J-P, Lesage L, et al. Anti-ischemic effects of ivabradine, a selective heart rate-reducing agent, in exercise-induced myocardial ischemia in pigs. J Cardiovasc Pharmacol 2003; 42: 688-96.
26. Bois P, Bescond J, Renaudon B, Lenfant J. Mode of action of bradycardic agent, S-16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells. Br J Pharmacol 1996; 118: 1051-7.
27. Vilaine JP. The discovery of the selective If current inhibitor ivabradine. A new therapeutic approach to ischemic heart disease. Pharmacol Res 2006; 53: 424-34.
28. Fox K. Selective and specific If inhibition: new perspectives fore the treatment of stable angina. Expert Opin Pharmacother 2006; 7(9): 1211-20.
29. Borer JS. Drug insight: If inhibitors as specific heart-rate-reducing agents. Nature clinical practice Cardiovasc med 2004; 1(2): 103-9.
30. Mugelli A. The role of the pacemaker current If in cardiovascular pharmacology. Pharmacol Res 2006; 53: 397-8.
31. Sulfi S, Timmis AD. Ivabradine – the first selective sinus node If channel inhibitor in the treatment of stable angina. Int J Clin Pract 2006; 60(2): 222-8.
32. Bucchi A, Baruscotti M, DiFrancesco D. Current-dependent block of rabbit sino-atrial node If channels by ivabradine. J Gen Physiol 2002; 120: 1-13.
33. Mangoni ME, Marger L, Nargeof J. If current inhibition: cellular basis and physiology In Camm J., Tendera M. (Eds); Heart Rate Slowing by If Current Inhibition. Adv Cardiol Basel Karger 2006; 43: 17-30.
34. Thollon C, Cambarrat C, Vian J, et al. Electrophysiological effects of S-16257, a novel sino-atrial node modulator, on rabbit and guinea-pig cardic preparations; comparison with UL-FS 49. Br J Pharmacol 1994; 112: 37-42.
35. Ragueneau I, Laveille C, Jochemsen R, et al. Pharmacodynamic modeling of the effects of ivabradine, a direct sinus node inhibitor, on heart rate in healthy volunteers. Clin Pharmacol Ther 1998; 64: 192-203.

Поступила 22/10-2007