

УДК 576.08:612.17

АНАЛИЗ МЕДЛЕННОЙ ИНАКТИВАЦИИ КАНАЛОВ $\text{Na}_v1.5$ В РАЗВИТИИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ СЕРДЦА

© 2024 г. А. К. Зайцева^{1, 2, *}, К. И. Перепелина^{1, 3}, А. А. Костарева¹

¹ Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины» Национального медицинского исследовательского центра им. В. А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, 197341, Россия

² Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223, Россия

³ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

*E-mail: zaytseva_ak@almazovcentre.ru

Поступила в редакцию 14.02.2023 г.

После доработки 27.06.2023 г.

Принята к публикации 24.08.2023 г

Потенциал-зависимые натриевые каналы сердца $\text{Na}_v1.5$ ответственны за инициацию и распространение потенциала действия в кардиомиоцитах. Дисфункция $\text{Na}_v1.5$ может быть обусловлена как патогенными вариантами в самом гене *SCN5A*, кодирующем $\text{Na}_v1.5$, так и генетическими вариантами в генах других белков, регулирующих его активность и транспорт. Смена различных фаз потенциала действия определяется строгой временной организацией активации и инактивации различных ионных каналов. На переходы между функциональными состояниями канала, в том числе на переход в состояние медленной инактивации, могут влиять разнообразие факторы и взаимодействующие с каналом белки. Хотя процесс медленной инактивации канала известен несколько десятилетий, его роль в механизме развития наследственной патологии сердца остается неясной. В нашей работе мы с помощью метода локальной фиксации потенциала (patch clamp) в отведении от целой клетки (whole-cell) исследовали изменения процесса медленной инактивации $\text{Na}_v1.5$ под влиянием различных мутаций в структурных генах (*DSP-H1684R*, *LMNA-R249Q*, *FLNC-R1267Q*, *FLNC-V2264M*), ассоциированных с генетически обусловленной патологией миокарда, приводящей к дисфункции кардиомиоцитов. Мы использовали модель кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (КМ-иПСК) и продемонстрировали усиление медленной инактивации каналов на модели КМ-иПСК, полученных от пациентов с фенотипом кардиомиопатии, совмещенной с желудочковыми аритмиями. Таким образом, представленная работа вносит вклад в понимание роли процесса медленной инактивации $\text{Na}_v1.5$ в механизме развития патологии сердца.

Ключевые слова: DSP, FLNC, LMNA, канал $\text{Na}_v1.5$, гейтинг, медленная инактивация, наследственная аритмия

Принятые сокращения: иПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; КМ-иПСК — кардиомиоциты, дифференцированные из иПСК; $\text{Na}_v1.5$ — потенциал-зависимый натриевый канал сердца.

DOI: 10.31857/S0041377124010052, **EDN:** IEDWYA

Порообразующая альфа-субъединица натриевого канала сердца $\text{Na}_v1.5$ (кодируемая геном *SCN5A*) — это сложный трансмембранный белок, обеспечивающий быстрый вход ионов натрия в клетку в ходе фазы 0 потенциала действия кардиомиоцитов (Catterall, 1992). Он представляет собой псевдогетеротетрамер и состоит из цитоплазматического N-конца, четырех трансмембранных доменов (I–IV), соединенных между собой внутриклеточными петлями, и цитоплазматического C-конца. Каждый из гомологичных доменов I–IV состоит из шести сегментов (S1–S6), из которых S5 и S6 образуют пору канала, а сегмент S4 содержит несколько положительно заряженных

аминокислотных остатков и выполняет функцию сенсора напряжения (Sato et al., 1998).

Функционально активные каналы $\text{Na}_v1.5$ локализованы в двух основных пулах плазматической мембраны кардиомиоцитов: в области вставочных дисков и в латеральной мембране (Shy et al., 2013). Макромолекулярные участники комплексов $\text{Na}_v1.5$ в этих пулах различны, активность натриевых каналов находится под контролем различных белков-партнеров.

Нарушения активности ионных каналов могут быть как первичными, т.е. возникающими в результате аминокислотной замены в структуре $\text{Na}_v1.5$, либо вторичными, ассоциированными

с генетическими вариантами в генах, регулирующих экспрессию, транспорт или биофизические свойства каналов. Генетические варианты в гене *SCN5A* были идентифицированы у пациентов с различными формами наследственных аритмий: синдром удлиненного интервала QT, синдром Бругада, прогрессирующее замедление проводимости сердца, дилатационная кардиомиопатия и другие (Amin et al., 2010). Кроме того, дисфункция натриевых каналов миокарда может быть следствием генетических вариантов в других генах, кодирующих белки, которые входят в состав макромолекулярных комплексов $Na_v1.5$ в области вставочных дисков и латеральной мембраны или регулируют экспрессию *SCN5A*, транспорт $Na_v1.5$ на плазматическую мембрану и его интернализацию.

Так, дисфункция натриевых каналов была показана при мутациях в генах *LMNA*, *PKP2* и *DSP*, ассоциированных с генетически обусловленными формами кардиомиопатий (Gusev et al., 2020; Khudiakov et al., 2020; Perepelina et al., 2022). Таким образом, термин “натриевые каналопатии” может объединять гетерогенную группу заболеваний, в которую входят как аритмогенные синдромы без структурных изменений миокарда (синдром LQT, синдром Бругада, прогрессирующее замедление проводимости сердца, идиопатическая атриовентрикулярная блокада), так и структурная патология сердца, например различные формы кардиомиопатий.

Прогрессирующее замедление проводимости, также известное как болезнь Лева–Ленегра, — редкое наследственное заболевание, ассоциированное с генами *SCN5A*, *DSP* и рядом других, которое характеризуется медленно и неуклонно прогрессирующим дегенеративным фиброзом волокон пучка Гиса (Amin et al., 2010).

Мышечная дистрофия Эмери–Дрейфуса — это редкое наследственное заболевание, чаще всего ассоциированное с генами *LMNA*, *EMD* и *FHL1* и характеризующееся дистрофическими изменениями в скелетной и сердечной мускулатуре, сопровождающееся развитием внутримиеокардиальных блокад (Emery, Dreifuss, 1966).

Ген *FLNC* также был изначально ассоциирован с нейромышечной патологией, но позже был описан в связи с развитием дилатационной, аритмогенной и рестриктивной кардиомиопатиями.

Ранее нами на модели КМ-иПСК было описано изменение функциональных характеристик натриевого тока у пациента с вариантом R249Q в гене *LMNA* (Perepelina et al., 2022), однако ста-

ционарная медленная инактивация потенциал-зависимых натриевых каналов не была исследована.

Воротный механизм (гейтинг) потенциал-зависимых натриевых каналов описывается с помощью совокупности процессов, которые являются отражением конформационных переходов Na_v -каналов между различными состояниями: закрытым, открытым, состояниями быстрой и медленной инактивации. Из активированного состояния канал может переходить в различные инактивированные состояния.

К настоящему времени наиболее хорошо изучено состояние быстрой инактивации, которая инициируется за счет работы сегмента IVS4, передающего сигнал на IFM-мотив во внутриклеточном линкере III–IV (Capes et al., 2013). Физиологическая роль IFM-мотива в процессе быстрой инактивации также подтверждена с помощью различных структурных исследований (Rohl et al., 1999; Yan et al., 2017). Механизм перехода $Na_v1.5$ в состояние медленной инактивации, напротив, остается слабо изученным.

Исследования биофизических характеристик $Na_v1.5$, как правило, проводят на гетерологических системах экспрессии — клеточных линиях (HEK293, CHO) или ооцитах *Xenopus laevis*, трансфицированных векторной конструкцией, которая содержит ген *SCN5A* с исследуемым генетическим вариантом. Подобные системы временной сверхэкспрессии *SCN5A* позволяют изучать эффект отдельных аминокислотных замен на функциональную активность канала (Sendfeld et al., 2019).

Основным недостатком этих моделей является их неспособность воспроизводить сложную физиологию кардиомиоцитов, поскольку они не обладают структурно-морфологическими особенностями кардиомиоцитов и экспрессируют отличный набор генов, кодирующих ионные каналы. Кроме того, разнятся полученные результаты, зависящие от используемой экспрессионной системы.

Открытие репрограммирования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) и их последующая дифференцировка в кардиомиоциты (КМ-иПСК) дали новые возможности для моделирования сердечно-сосудистых заболеваний. В КМ-иПСК присутствует большинство кардио-специфичных ионных каналов и вспомогательных белков, и в настоящее время эта модель демонстрирует наиболее выраженное сходство с КМ человека (Karakikes et al., 2015; Kodama et al., 2019). Поскольку КМ-иПСК могут быть получены непосредственно от пациента, они сохраняют

его генетический фон, включая потенциальные модификаторы, влияющие на фенотип (Nijak et al., 2021).

КМ-иПСК зарекомендовали себя как эффективная модель для исследования роли изменения биофизических характеристик различных ионных каналов в развитии наследственной патологии сердца (Craeto, Di Pasquale, 2018; Steele-Stallard et al., 2018; El-Battrawy et al., 2019; Giacomelli et al., 2020; Khudiakov et al., 2020; Kamga et al., 2021; Shah et al., 2021; Zhu et al., 2021). Однако большинство работ фокусируется на регистрации изменения плотности тока и не описывает изменение других электрофизиологических параметров каналов. Таким образом, ранее не был исследован процесс медленной инактивации потенциал-зависимых натриевых каналов на модели КМ-иПСК и его роль в развитии наследственной патологии сердца.

Цель нашей работы заключалась в характеристике изменения медленной инактивации потенциал-зависимых натриевых каналов на модели КМ-иПСК, полученных от пациентов с наследственными заболеваниями сердца и аритмогенными синдромами, ассоциированными с генетическими вариантами в генах *DSP*, *LMNA* и *FLNC*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Получение линий иПСК и их дифференцировка. Линии иПСК были созданы и охарактеризованы, как описано ранее (Khudiakov et al., 2017; Rodina et al., 2021). Позднее иПСК были адаптированы к условиям культивирования без кормления на основе планшетов, покрытых реагентом Geltrex (Corning) и среды E8 (Thermo Scientific). иПСК пассировали с реагентом ReleSR (Stemcell Technologies). Ингибитор рок-киназы Y27632 (Tocris) добавляли в среду на 24 ч после посева.

Были получены и проанализированы экспериментальные данные для двух специфичных для каждого пациента линий иПСК. В качестве контроля для каждого пациента использовали две линии иПСК, полученные от здоровых доноров того же пола. Все линии иПСК были зарегистрированы в базе данных hPSCreg (<https://hpscereg.eu/>).

Дифференцировку иПСК в кардиомиоциты выполняли с использованием протокола модуляции сигнального пути Wnt/ β -катенин с помощью малых молекул (Burrige et al., 2014). Активные кардиомиоциты через 14 суток дифференцировки селектировали с помощью лактата в течение 3–5 суток, как описано ранее (Tohyama et al.,

2013). После метаболической очистки кардиомиоциты размножали в среде CMs (RPMI 1640, содержащей глутамакс, добавку B27, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, США)).

Кардиомиоциты, полученные от пациентов с генетическими вариантами *DSP*-H1684R и *LMNA*-R249Q, и от условно здоровых доноров (донор 1 и донор 2 соответственно) дифференцировали в течение 25–30 суток и использовали для электрофизиологических экспериментов. Для экспериментов на КМ-иПСК, полученных от пациентов с генетическими вариантами в гене *FLNC* (*FLNC*-R1267Q и *FLNC*-V2264M) была необходима более высокая степень зрелости кардиомиоцитов, поэтому регистрацию параметров натриевых токов проводили на 45-е сутки дифференцировки.

КМ-иПСК, полученные от здорового донора (донор 3), были дифференцированы аналогично клеткам пациентов. Наличие филамина-С в используемой модели верифицировали с помощью методов иммуноцитохимии. Для электрофизиологических измерений кардиомиоциты подвергали как ферментативной, так и механической диссоциации с помощью реагента TrypLE Select (Thermo Fisher Scientific), промывали средой CMs и пересевали на покровные стекла за 24–36 ч до эксперимента.

Регистрация натриевых токов (I_{Na}). Процесс медленной инактивации каналов $Na_v1.5$ изучали с помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации целой клетки (whole-cell). Стеклообразные микроэлектроды изготавливали из боросиликатного стекла с помощью пуллера (P-1000, Sutter Instrument). Сопротивление электродов составляло 1.5–2.5 МОм. Последовательное сопротивление компенсировали на 75–80%.

Сбор данных осуществляли с использованием усилителя Axopatch 200B и программного обеспечения Clampfit версии 10.3 (Molecular devices, США). Токи регистрировали на частоте 20 кГц и подвергали низкочастотной фильтрации на частоте 5 кГц с использованием аналого-цифрового интерфейса (система сбора данных Digidata 1440A, Molecular devices, США).

Все измерения проводили при комнатной температуре. Внеклеточный раствор для регистрации I_{Na} содержал (мМ): 140 NaCl, 1 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 10 HEPES, 10 глюкозы (pH 7.4, CsOH). Внутриклеточный раствор содержал (мМ): 130 CsCl, 10 NaCl, 10 EGTA, 10 HEPES (pH 7.3, CsOH).

Измерения проводили при поддерживаемом потенциале -100 мВ.

Репрезентативные записи натриевых токов были получены с использованием протокола с прямоугольным импульсом, варьирующим от -80 до 60 мВ в течение 40 мс при частоте 1 Гц с шагом 5 мВ.

Для исследования кинетики развития медленной инактивации канала был выбран протокол стационарной медленной инактивации, в котором первый импульс длился 10 с и варьировал по потенциалу от -80 до 20 мВ с последующей 20 -миллисекундной гиперполяризацией (-100 мВ) и тестирующим импульсом -20 мВ продолжительностью 20 мс.

Ранее было показано, что использование гиперполяризации в течение 20 мс является достаточным для восстановления каналов из состояния медленной инактивации (Itoh et al., 2005; Zaytseva et al., 2022). Сравнение проводили по доли медленно инактивированных каналов при различных потенциалах, как было описано.

Статистическая обработка. Использовали программное обеспечение Graphpad Prism. С целью проверки нормальности распределения значений нормированного тока на разных потенциалах использовался тест Колмогорова–Смирнова. Ввиду того, что распределение внутри групп не соответствует нормальному, в качестве статистического теста использовался критерий Манна–Уитни.

Данные представлены как среднее арифметическое и его стандартная ошибка. Достоверно различающимися считались группы при $p < 0.05$. Для проведения множественных сравнений результаты попарного теста Манна–Уитни корректировали с помощью метода Бенджамина–Хохберга, как было описано ранее (Khudiakov et al., 2020).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В клетках всех представленных линий КМ-иПСК, полученных от пациентов и здоровых доноров, регистрировали типичный натриевый ток (рис. 1).

Ранее нами был описан новый генетический вариант H1684R в гене десмоплакина (*DSP*), ассоциированный с прогрессирующим замедлением проводимости и желудочковыми нарушениями сердечного ритма (Gusev et al., 2020). Было показано, что вариант DSP-H1684R ассоциирован с изменением плотности различных токов, однако процесс инактивации I_{Na} не был детально изучен.

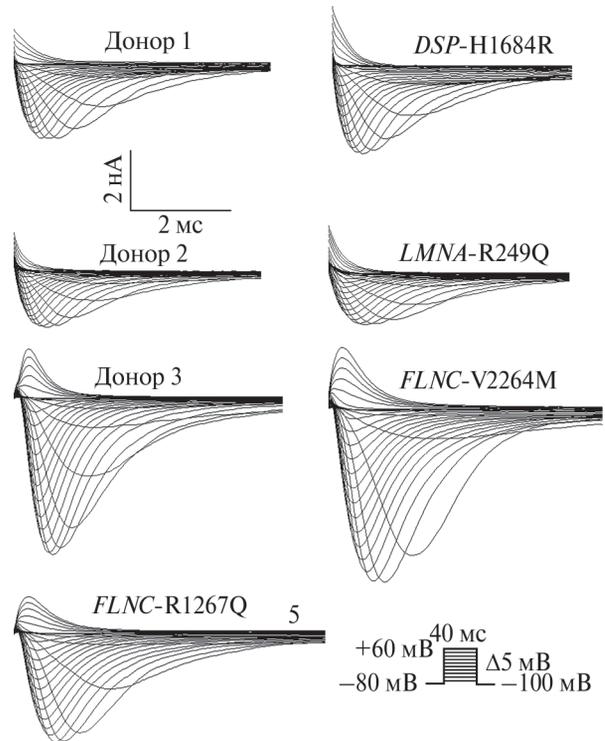


Рис. 1. Репрезентативные записи натриевых токов, зарегистрированные в клетках модели КМ-иПСК, полученных от пациентов с наследственной патологией сердца и здоровых доноров (доноры 1, 2, 3). Все представленные линии генерировали I_{Na} типичной морфологии.

В данной работе мы анализировали влияние этого генетического варианта на стационарную медленную инактивацию $Na_v1.5$. Мы показали усиление медленной инактивации в кардиомиоцитах, полученных из клеток пациента с прогрессирующим замедлением проводимости, относительно значений, полученных у здорового донора (донор 1, рис. 2).

Кроме того, ранее нами был идентифицирован генетический вариант R249Q в гене *LMNA* у пациента с дистрофией Эмери–Дрейфуса, сопровождавшейся пароксизмальной фибрилляцией предсердий и атриовентрикулярной блокадой без признаков желудочковых аритмий, была получена и охарактеризована линия иПСК FAMRCi007-A (Perrepelina et al., 2020).

Генетический вариант R249Q ранее был описан как патогенный, ассоциированный с сердечно-сосудистой дисфункцией (Raffaele Di Barletta et al., 2000). Ранее мы показали, что *LMNA*-R249Q приводит к снижению активности $Na_v1.5$ и изменению экспрессии различных генов, кодирующих белки, регулирующие активность данного канала (Perrepelina et al., 2022). В настоящей работе

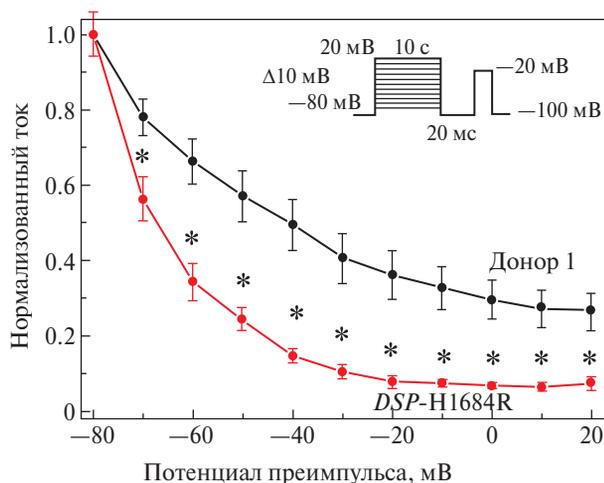


Рис. 2. Усиление стационарной медленной инактивации на модели КМ-иПСК пациента с прогрессирующим нарушением сердечной проводимости и выраженными желудочковыми нарушениями ритма (DSP-H1684R, нижняя кривая, $n=5$) по сравнению с данными, полученными на кардиомиоцитах от здорового донора (верхняя кривая, $n=9$). * — различия достоверны при $p < 0.05$ (критерий Манна–Уитни). Здесь и на рис. 3, 4 показаны средние значения и их стандартные ошибки.

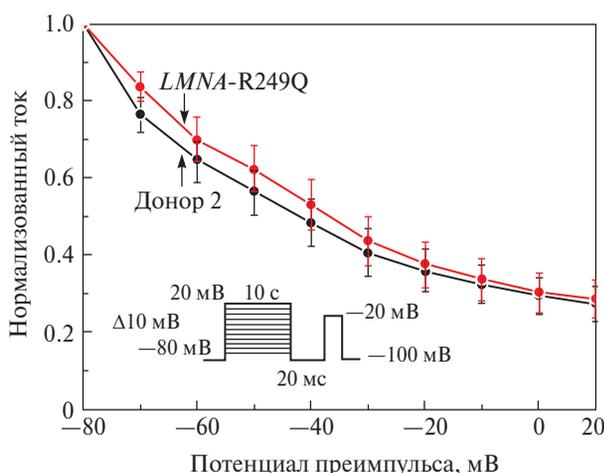


Рис. 3. Медленная инактивация $Na_v1.5$ в КМ-иПСК, полученных от пациентов с дистрофией Эмери–Дрейфуса (мутация *LMNA-R249Q*, верхняя кривая, $n=9$), и в клетках, полученных от здорового донора (нижняя кривая, $n=12$). Не выявлено изменений кинетики стационарной медленной инактивации при потенциалах от -80 до 20 мВ (критерий Манна–Уитни).

мы проанализировали влияние *LMNA-R249Q* на процесс медленной инактивации и показали, что медленная инактивация $Na_v1.5$ не изменялась в КМ-иПСК пациента с дистрофией Эмери–Дрейфуса на фоне *LMNA-R249Q* относительно значений, полученных для здорового донора (донор 2, рис. 3). Таким образом, процесс медленной инактивации каналов $Na_v1.5$ не вносит в разви-

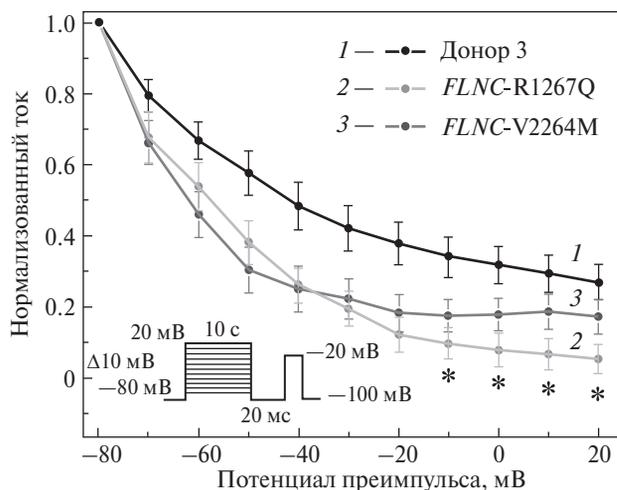


Рис. 4. Кинетика стационарной медленной инактивации $Na_v1.5$ в кардиомиоцитах пациента с мутацией R1267Q в гене *FLNC*, мутацией V2264M в гене *FLNC* и в клетках здорового донора. Мутация R1267Q, ассоциированная со смешанным фенотипом (аритмогенной кардиомиопатией с выраженными желудочковыми аритмиями) значительно изменяла долю медленно инактивированных каналов ($n=6$) по сравнению с характеристиками тока, зарегистрированными в клетках здорового донора ($n=12$) при потенциалах от -10 до 20 мВ. Мутация V2264M в гене *FLNC*, ассоциированная со смешанным фенотипом (рестриктивной кардиомиопатией, атриовентрикулярной блокадой и желудочковой тахикардией), не изменяла долю медленно инактивированных каналов ($n=7$) относительно клеток здорового донора. * — отличия значений нормированного тока относительно здоровых доноров достоверны при $p < 0.05$ после коррекции (критерий Манна–Уитни с последующей коррекцией на множественные сравнения с помощью метода Бенжамин–Хохберга).

тие сердечно-сосудистого фенотипа, обусловленного генетическим вариантом *LMNA-R249Q*.

Исследование роли медленной инактивации каналов в развитии фенотипов кардиомиопатий проводили на моделях иПСК, несущих варианты R1267Q и V2264M в гене *FLNC*. Генетический вариант R1267Q, локализованный в 11-м иммуноглобулино-подобном домене, был обнаружен у пациента дилатационной формой кардиомиопатии и желудочковыми нарушениями ритма. Нами показано усиление медленной инактивации потенциал-зависимых натриевых каналов в КМ-иПСК, полученных от пациента с генетическим вариантом R1267Q относительно значений здорового донора (рис. 4, донор 3). Таким образом, этот вариант может оказывать влияние на процесс медленной инактивации $Na_v1.5$ и тем самым вносить вклад в развитие аритмогенного фенотипа, в частности желудочковых нарушений ритма.

Вариант V2264M в гене *FLNC*, идентифицированный у пациента с рестриктивной кардиомиопатией и врожденным пороком сердца (Muravyev et al., 2022), локализован в 20-м иммуноглобулиноподобном домене. Медленная инактивация $Na_v1.5$ не изменялась в кардиомиоцитах, полученных от пациентов с этим генетическим вариантом, по сравнению со значениями для контрольных линий, полученных от здорового донора (см. рис. 4, донор 3).

Исходя из полученных данных, можно сделать выводы о том, что нарушение процесса медленной инактивации натриевых каналов не ассоциировано с развитием рестриктивной кардиомиопатии в данной экспериментальной модели, а нарушение процесса медленной инактивации может зависеть от локализации аминокислотной замены в филламин-С.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ключевыми характеристиками функциональной активности потенциал-зависимых натриевых каналов являются особенности его воротного механизма (гейтинга). Для эукариотических организмов характерно два основных механизма инактивации потенциал-зависимых натриевых каналов.

Быстрая инактивация развивается в течение 1–5 мс (Hodgkin, Huxley, 1952a, 1952b, 1952c), в то время как для перехода в состояние медленной инактивации необходима длительная деполяризация длительностью от десятых долей секунды до десятков секунд (Adelman, Palti, 1969; Palti, Adelman, 1969; Rudy, 1975, 1981). Аминокислотные остатки в селективном фильтре и окружающие сегменты S5 и S6 участвуют в конформационных изменениях, сопровождающих медленную инактивацию (Balsler et al., 1996; Bénitah et al., 1996, 1997; Vilin, Ruben, 2001). Таким образом, медленную инактивацию часто рассматривают как результат конформационного изменения структуры поры потенциал-зависимых натриевых каналов (Payandeh et al., 2012; Zhang et al., 2012).

В норме только 40% каналов $Na_v1.5$ переходят в состояние медленной инактивации, в отличие от 80% потенциал-зависимых натриевых каналов $Na_v1.4$ в скелетной мускулатуре. Предполагается, что такая особенность $Na_v1.5$ является адаптацией к постоянным деполяризующим импульсам, возникающим в миокарде (Richmond et al., 1998). Таким образом, усиление процесса медленной инактивации потенциал-зависимых натриевых

каналов, зарегистрированное в КМ-иПСК пациентов с желудочковыми нарушениями ритма, потенциально может влиять на адаптивные свойства натриевых каналов и способствовать возникновению аритмогенных очагов.

Изменения медленной инактивации $Na_v1.5$ описаны для некоторых генетических вариантов в гене *SCN5A*, идентифицированных у пациентов с различными наследственными формами желудочковых аритмий. Например, для мутаций N406S (IS6) (Itoh et al., 2007), G752R (IIS2) (Hoogendijk et al., 2010) и S1710L (IVS5-S6) (Akai et al., 2000), ассоциированных с синдромом Бругада, также сопровождаемым желудочковыми тахикардиями, характерно замедление активации в сочетании с усиленной медленной инактивацией. В то время как при мутации G298S (IS5-S6) наблюдается снижение плотности тока и усиление медленной инактивации в отсутствие изменений других биофизических характеристик (Wang et al., 2002).

Усиление как быстрой, так и медленной инактивации каналов было продемонстрировано для мутации N1541D (IVS1) (Dharmawan et al., 2019). Встречаются и более сложные варианты сочетания изменений медленной инактивации и других биофизических характеристик $Na_v1.5$. Так, генетический вариант Y739D (IIS1-S2), ассоциированный с синдромом Бругада, приводит к снижению плотности тока, усилению быстрой и медленной инактивации и замедлению активации каналов (Zaytseva et al., 2022), в то время как генетический вариант A1294G (IIS3-S4), ассоциированный с развитием смешанной клинической картины, приводит к ускорению активации, ускорению быстрой и медленной инактивации и замедлению восстановления инактивированного состояния каналов (Zaytseva et al., 2019). Таким образом, в настоящее время есть свидетельства усиления медленной инактивации при желудочковых нарушениях ритма.

Следует отметить, что большинство работ, посвященных изучению влияния генетических вариантов, ассоциированных с наследственными аритмиями, на процесс медленной инактивации $Na_v1.5$, выполнено на моделях гетерологической системы экспрессии (Зайцева и др., 2018). Несмотря на очевидные преимущества, данная модель не позволяет оценить влияние генетического фона пациента и неудобна для исследования влияния генетических вариантов, идентифицированных в генах, кодирующих белки, участвующие в регуляции каналов $Na_v1.5$.

В настоящее время наиболее актуальные подходы к сердечно-сосудистым исследованиям основаны на использовании кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (КМ-иПСК). Изучение активности ионных каналов на модели КМ-иПСК позволяют оценить биофизические свойства натриевых каналов в их нативном тканеспецифическом окружении с учетом генетического фона пациента.

КМ-иПСК активно используются для изучения ассоциированных с кардиомиопатиями изменений активности ионных каналов (Craeto, Di Pasquale, 2018; Steele-Stallard et al., 2018; Giacomelli et al., 2020; Shah et al., 2021). Однако в этих исследованиях авторы, как правило, ограничиваются изменениями плотности тока и не пытаются рассмотреть более детальные механизмы активности натриевых каналов. Так, на модели КМ-иПСК было показано уменьшение плотности тока в клетках пациентов с аритмогенной кардиомиопатией (Khudiakov et al., 2020), с дилатационной кардиомиопатией и прогрессирующим нарушением сердечной проводимости (Kamga et al., 2021) и в клетках пациентов с синдромом Бругада (El-Battrawy et al., 2019; Zhu et al., 2021), а также замедление активации при миотонической дистрофии 1 типа (Poulin et al., 2021).

Актуальность данной работы во многом определяется тем, что в настоящее время большая часть данных, полученных на модели КМ-иПСК, фокусируется на описании изменений плотности натриевого тока и уровня экспрессии *SCN5A*, в то время как изучение других электрофизиологических характеристик натриевых каналов остается вне фокуса подавляющего числа исследований.

Мы продемонстрировали, что у пациентов с генетически обусловленными кардиомиопатиями, сопровождающимися желудочковыми аритмиями, ассоциированными с генетическими вариантами в генах *DSP* и *FLNC*, наблюдается усиление стационарной медленной инактивации. Это соотносится с данными литературы об изменениях медленной инактивации, обусловленных генетическими вариантами в гене *SCN5A*, ассоциированных с развитием желудочковых нарушений ритма. Например, при мутации T512I в гене *SCN5A* обнаружено изменение кинетики активации и инактивации и усиление медленной инактивации $Na_v1.5$ (Yang et al., 2002), а генетический вариант G1712S сопровождался спектром биофизических изменений, в том числе нарушением медленной инактивации $Na_v1.5$ (Sanner et al., 2021).

Таким образом, пока информации о роли процесса медленной инактивации $Na_v1.5$ в развитии наследственных кардиомиопатий и аритмий недостаточно. Мы показали, что процесс медленной инактивации потенциал-зависимых натриевых каналов сердца может быть усилен в клетках пациентов с желудочковыми нарушениями ритма, вызванными генетическими вариантами в различных генах, регулирующих активность каналов $Na_v1.5$ (*FLNC* и *DSP*).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 20-34-90142).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова и проводилось согласно надлежущей клинической практике и этическим стандартам Хельсинкской декларации. Все респонденты подписали информированное согласие на проведение необходимых методов обследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии потенциально-го конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Зайцева А.К., Карпушев А.В., Жоров Б.С. и Костарева А.А. 2019. Биофизические механизмы натриевых каналов в миокарде: синдром удлиненного интервала QT. Российский физиол. ж. им. И.М. Сеченова. Т. 105. № 1. С. 3. (Zaytseva A.K., Karpushev A.V., Zhorov B.S., Kostareva A.A. 2019. Biophysical mechanisms of sodium channelopathies in myocardium: long QT syndrome and Brugada syndrome. Russian J. Physiol. V. 105. № 1. P. 3.)
- Adelman W.J., Jr., Palti Y. 1969. The effects of external potassium and long duration voltage conditioning on the amplitude of sodium currents in the giant axon of the squid, *Loligo pealei*. J. Gen. Physiol. V. 54. P. 589. <https://doi.org/10.1085/jgp.54.5.589>
- Akai J., Makita N., Sakurada H., Shirai N., Ueda K., Kitabatake A., Nakazawa K., Kimura A., Hiraoka M. 2000. A novel SCN5A mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation without typical ECG findings of Brugada syndrome. FEBS Lett. V. 479. P. 29.

- Amin A.S., Asghari-Roodsari A, Tan H.L. 2010. Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Arch.* V. 460. P. 223. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0761-0>
- Balser J.R., Nuss H.B., Chiamvimonvat N., Pérez-García M.T., Marban E., Tomaselli G.F. 1996. External pore residue mediates slow inactivation in mu 1 rat skeletal muscle sodium channels. *J. Physiol.* V. 494. P. 431.
- Bénitah J.P., Ranjan R., Yamagishi T., Janecki M., Tomaselli G.F., Marban E. 1997. Molecular motions within the pore of voltage-dependent sodium channels. *Biophys. J.* V. 73. P. 603.
- Bénitah J.P., Tomaselli G.F. and Marban E. 1996. Adjacent pore-lining residues within sodium channels identified by paired cysteine mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 93. P. 7392.
- Burridge P.W., Matsa E., Shukla P., Lin Z.C., Churko J.M., Ebert A.D., Lan F., Diecke S., Huber B., Mordwinkin N.M., Plews J.R., Abilez O.J., Cui B., Gold J.D., Wu J.C. 2014. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat. Methods.* V. 11. P. 855. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2999>
- Capes D.L., Goldschen-Ohm M.P., Arcisio-Miranda M., Bezanilla F. and Chanda B. 2013. Domain IV voltage-sensor movement is both sufficient and rate limiting for fast inactivation in sodium channels. *J. Gen. Physiol.* V. 142. P. 101.
- Crasto S., Di Pasquale E. 2018. Induced Pluripotent Stem Cells to Study Mechanisms of Laminopathies: Focus on Epigenetics. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 6. P. 172. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00172>
- Dharmawan T., Nakajima T., Iizuka T., Tamura S., Matsui H., Kaneko Y., Kurabayashi M. 2019. Enhanced closed-state inactivation of mutant cardiac sodium channels (SCN5A N1541D and R1632C) through different mechanisms. *J. Mol. Cell Cardiol.* V. 130. P. 88. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.03.023>
- El-Battrawy I., Müller J., Zhao Z., Cyganek L., Zhong R., Zhang F., Kleinsorge M., Lan H., Li X., Xu Q., Huang M., Liao Z., Moscu-Gregor A., Albers S., Dinkel H., et al. 2019. Studying Brugada Syndrome with an SCN1B variants in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 7. P. 261. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00261>
- Emery A.E., Dreifuss F.E. 1966. Unusual type of benign x-linked muscular dystrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* V. 29. P. 338. <https://doi.org/10.1136/jnnp.29.4.338>
- Giacomelli E., Meraviglia V., Camprostrini G., Cochrane A., Cao X., van Helden R.W.J., Krotenberg Garcia A., Mircea M., Kostidis S., Davis R.P., van Meer B.J., Jost C.R., Koster A.J., Mei H., Míguez D.G., et al. 2020. Human-iPSC-derived cardiac stromal cells enhance maturation in 3D cardiac microtissues and reveal non-cardiomyocyte contributions to heart disease. *Cell Stem Cell.* V. 26. P. 862. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.05.004>
- Gusev K., Khudiakov A., Zaytseva A., Perepelina K., Makeenok S., Kaznacheyeva E. and Kostareva A. 2020. Impact of the DSP-H1684R genetic variant on ion channels activity in ipsc-derived cardiomyocytes. *Cell Physiol. Biochem.* V. 54. P. 696. <https://doi.org/10.33594/000000249>
- Hodgkin A.L., Huxley A.F. 1952a. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* V. 116. P. 449. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004717>
- Hodgkin A.L., and Huxley A.F. 1952b. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* V. 116. P. 497.
- Hodgkin A.L., Huxley A.F. 1952c. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* V. 117. P. 500. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>
- Hoogendijk M.G., Potse M., Linnenbank A.C., Verkerk A.O., den Ruijter H.M., van Amersfoort S.C., Klaver E.C., Beekman L., Bezzina C.R., Postema P.G., Tan H.L., Reimer A.G., van der Wal A.C., Ten Harkel A.D., Dalinghaus M., et al. 2010. Mechanism of right precordial ST-segment elevation in structural heart disease: excitation failure by current-to-load mismatch. *Heart Rhythm.* V. 7. P. 238. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2009.10.007>
- Itoh H., Shimizu M., Takata S., Mabuchi H. and Imoto K. 2005. A novel missense mutation in the *SCN5A* gene associated with Brugada syndrome bidirectionally affecting blocking actions of antiarrhythmic drugs. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* V. 16. P. 486.
- Itoh H., Tsuji K., Sakaguchi T., Nagaoka I., Oka Y., Nakazawa Y., Yao T., Jo H., Ashihara T., Ito M., Horie M., Imoto K. 2007. A paradoxical effect of lidocaine for the N406S mutation of *SCN5A* associated with Brugada syndrome. *Int. J. Cardiol.* V. 121. P. 239. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2007.02.007>
- Kamga M.V.K., Reppel M., Hescheler J., Nguemo F. 2021. Modeling genetic cardiac channelopathies using induced pluripotent stem cells — *status quo* from an electrophysiological perspective. *Biochem. Pharmacol.* V. 192. P. 114746. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114746>
- Karakikes I., Ameen M., Termglinchan V., Wu J.C. 2015. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: insights into molecular, cellular, and functional phenotypes. *Circ. Res.* V. 117. P. 80. <https://doi.org/10.1161/circresaha.117.305365>
- Khudiakov A., Kostina D., Zlotina A., Yany N., Sergushichev A., Pervunina T., Tomilin A., Kostareva A., Malashicheva A. 2017. Generation of iPSC line from patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy carrying mutations in *PKP2* gene. *Stem Cell Res.* V. 24. P. 85. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.08.014>
- Khudiakov A., Zaytseva A., Perepelina K., Smolina N., Pervunina T., Vasichkina E., Karpushev A., Tomilin A., Malashicheva A., Kostareva A. 2020. Sodium current abnormalities and deregulation of Wnt/ β -catenin signaling in iPSC-derived cardiomyocytes generated from patient with arrhythmogenic cardiomyopathy harboring compound genetic variants in plakophilin 2 gene. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* V. 1866. P. 165915. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165915>
- Kodama M., Furutani K., Kimura R., Ando T., Sakamoto K., Nagamori S., Ashihara T., Kurachi Y., Sekino Y., Furukawa T., Kanda Y., Kurokawa J. 2019. Systematic

- expression analysis of genes related to generation of action potentials in human iPSC cell-derived cardiomyocytes. *J. Pharmacol. Sci.* V. 140. P. 325. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2019.06.006>
- Nijak A., Saenen J., Labro A.J., Schepers D., Loeys B.L., Alaerts M.* 2021. iPSC-cardiomyocyte models of brugada syndrome-achievements, challenges and future perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 2825. <https://doi.org/10.3390/ijms22062825>
- Muravyev A., Vershinina T., Tesner P., Sjoberg G., Fomicheva Y., Čajbiková N.N., Kozyreva A., Zhuk S., Mamaeva E., Tarnovskaya S., Jornholt J., Sokolnikova P., Pervunina T., Vasichkina E., Sejersen T., et al.* 2022. Rare clinical phenotype of filaminopathy presenting as restrictive cardiomyopathy and myopathy in childhood. *Orphanet J. Rare Dis.* V. 17. P. 358. <https://doi.org/10.1186/s13023-022-02477-5>
- Palti Y., Adelman W.J., Jr.* 1969. Measurement of axonal membrane conductances and capacity by means of a varying potential control voltage clamp. *J. Membr. Biol.* V. 1. P. 431. <https://doi.org/10.1007/bf01869791>
- Payandeh J., Gamal El-Din T.M., Scheuer T., Zheng N. and Catterall W.A.* 2012. Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature.* V. 486. P. 135.
- Perepelina K., Kostina A., Klauzen P., Khudiakov A., Rabino M., Crasto S., Zlotina A., Fomicheva Y., Sergushichev A., Oganessian M., Dmitriev A., Kostareva A., Di Pasquale E., Malashicheva A.* 2020. Generation of two iPSC lines (FAMRCi007-A and FAMRCi007-B) from patient with Emery-Dreifuss muscular dystrophy and heart rhythm abnormalities carrying genetic variant LMNA p.Arg249Gln. *Stem Cell Res.* V. 47. P. 101895. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101895>
- Perepelina K., Zaytseva A., Khudiakov A., Neganova I., Vasichkina E., Malashicheva A. and Kostareva A.* 2022. LMNA mutation leads to cardiac sodium channel dysfunction in the Emery-Dreifuss muscular dystrophy patient. *Front. Cardiovasc. Med.* V. 9. P. 932956. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.932956>
- Poulin H., Mercier A., Djemai M., Pouliot V., Deschenes I., Boujtir M., Puymirat J., Chahine M.* 2021. iPSC-derived cardiomyocytes from patients with myotonic dystrophy type 1 have abnormal ion channel functions and slower conduction velocities. *Sci Rep.* V. 11. P. 2500. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82007-8>
- Raffaele Di Barletta M., Ricci E., Galluzzi G., Tonali P., Mora M., Morandi L., Romorini A., Voit T., Orstavik K.H., Merlini L., Trevisan C., Biancalana V., Housmanowa-Petrusewicz I., Bione S., Ricotti R., et al.* 2000. Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* V. 66. P. 1407. <https://doi.org/10.1086/302869>
- Richmond J.E., Featherstone D.E., Hartmann H.A., Ruben P.C.* 1998. Slow inactivation in
- with familial progressive cardiac conduction disorder carrying genetic variant FLNC p.Val2264Met. *Stem Cell Res.* V. 59. P. 102640. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102640>
- Rohl C.A., Boeckman F.A., Baker C., Scheuer T., Catterall W.A., Klevit R.E.* 1999. Solution structure of the sodium channel inactivation gate. *Biochemistry.* V. 38. P. 855. <https://doi.org/10.1021/bi9823380>
- Rudy B.* 1975. Proceedings: slow recovery of the inactivation of sodium conductance in *Myxicola* giant axons. *J. Physiol.* V. 249. P. 22.
- Rudy B.* 1981. Inactivation in *Myxicola* giant axons responsible for slow and accumulative adaptation phenomena. *J. Physiol.* V. 312. P. 531.
- Sanner K., Mueller-Leisse J., Zormpas C., Duncker D., Leffler A. and Veltmann C.* 2021. A Novel SCN5A Variant causes temperature-sensitive loss of function in a family with symptomatic Brugada syndrome, cardiac conduction disease, and sick sinus syndrome. *Cardiol.* V. 146. P. 754. <https://doi.org/10.1159/000518210>
- Sato C., Sato M., Iwasaki A., Doi T. and Engel A.* 1998. The sodium channel has four domains surrounding a central pore. *J. Struct. Biol.* V. 121. P. 314.
- Sendfeld F., Selga E., Scornik F.S., Pérez G.J., Mills N.L., Brugada R.* 2019. Experimental models of Brugada syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* V. 20. P. 2123. <https://doi.org/10.3390/ijms20092123>
- Shah P.P., Lv W., Rhoades J.H., Poleshko A., Abbey D., Caporizzo M.A., Linares-Saldana R., Heffler J.G., Sayed N., Thomas D., Wang Q., Stanton L.J., Bedi K., Morley M.P., Cappola T.P., et al.* 2021. Pathogenic LMNA variants disrupt cardiac lamina-chromatin interactions and de-repress alternative fate genes. *Cell Stem Cell.* V. 28. P. 938. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.12.016>
- Shy D., Gillet L., Abriel H.* 2013. Cardiac sodium channel NaV1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: the multiple pool model. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1833. P. 886. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.10.026>
- Steele-Stallard H.B., Pinton L., Sarcar S., Ozdemir T., Maffioletti S.M., Zammit P.S., Tedesco F.S.* 2018. Modeling Skeletal muscle laminopathies using human induced pluripotent stem cells carrying pathogenic LMNA mutations. *Front. Physiol.* V. 9. P. 1332. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01332>
- Tohyama S., Hattori F., Sano M., Hishiki T., Nagahata Y., Matsuura T., Hashimoto H., Suzuki T., Yamashita H., Satoh Y., Egashira T., Seki T., Muraoka N., Yamakawa H., Ohgino Y., et al.* 2013. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell.* V. 12. P. 127. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.09.013>
- Vilin Y.Y., Ruben P.C.* 2001. Slow inactivation in voltage-gated sodium channels: molecular substrates and contributions to channelopathies. *Cell Biochem. Biophys.* V. 35. P. 171. <https://doi.org/10.1385/cbb:35:2:171>
- Wang D.W., Viswanathan P.C., Balsler J.R., George A.L., Jr. and Benson D.W.* 2002. Clinical, genetic, and biophysical characterization of SCN5A mutations associated with

- atrioventricular conduction block. *Circulation*. V. 105. P. 341.
- Yan Z., Zhou Q., Wang L., Wu J., Zhao Y., Huang G., Peng W., Shen H., Lei J. and Yan N. 2017. Structure of the Na(v)1.4-β1 Complex from Electric Eel. *Cell*. V. 170. P. 470.
- Yang P., Kanki H., Drolet B., Yang T., Wei J., Viswanathan P.C., Hohnloser S.H., Shimizu W., Schwartz P.J., Stanton M., Murray K.T., Norris K., George A.L., Jr., Roden D.M. 2002. Allelic variants in long-QT disease genes in patients with drug-associated torsades de pointes. *Circulation*. V. 105. P. 1943. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000014448.19052.4c>
- Zaytseva A.K., Karpushev A.V., Kiselev A.M., Mikhaylov E.N., Lebedev D.S., Zhorov B.S., Kostareva A.A. 2019. Characterization of a novel SCN5A genetic variant A1294G associated with mixed clinical phenotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 516. P. 777.
- Zaytseva A.K., Kiselev A.M., Boitsov A.S., Fomicheva Y.V., Pavlov G.S., Zhorov B.S., Kostareva A.A. 2022. Characterization of the novel heterozygous SCN5A genetic variant Y739D associated with Brugada syndrome. *Biochem. Biophys. Rep.* V. 30. P. 101249. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101249>
- Zhang X., Ren W., DeCaen P., Yan C., Tao X., Tang L., Wang J., Hasegawa K., Kumasaka T., He J., Wang J., Clapham D.E., Yan N. 2012. Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel. *Nature*. V. 486. P. 130.
- Zhu Y., Wang L., Cui C., Qin H., Chen H., Chen S., Lin Y., Cheng H., Jiang X., Chen M. 2021. Pathogenesis and drug response of iPSC-derived cardiomyocytes from two Brugada syndrome patients with different Na (v)1.5-subunit mutations. *J. Biomed. Res.* V. 35. P. 395. <https://doi.org/10.7555/jbr.35.20210045>

ANALYSIS OF THE ROLE OF NAV1.5 SLOW INACTIVATION IN THE DEVELOPMENT OF INHERITED CARDIAC PATHOLOGY

K. Zaytseva^{a, b, *}, K. I. Perepelina^{a, c}, A. A. Kostareva^a

^a World-Class Research Centre for personalized medicine, Almazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, 197341, Russia

^b Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg 194223, Russia

^c Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, 194064, Russia

* E-mail: zaytseva_ak@almazovcentre.ru

Voltage-gated cardiac sodium channels Na_v1.5 are responsible for the initiation and propagation of action potentials in cardiomyocytes. Dysfunction of Na_v1.5 can be caused both by pathogenic variants in the *SCN5A* gene itself, which encodes Na_v1.5, and by genetic variants in the genes of other proteins, regulating channel activity and trafficking. The change of different phases of the action potential is determined by the strict temporal organization of activation and inactivation of various ion channels. Transitions between channel functional states (for example, to slow inactivated state) can be influenced by various factors and proteins interacting with the channel. Despite the fact that the process of slow inactivation of the channel has been known for several decades, its role in the mechanism of development of hereditary heart pathology remains unclear. In this work, using the patch clamp method in whole-cell leads, we studied changes in the process of slow Nav1.5 inactivation under the influence of various mutations in structural genes (*DSP*-H1684R, *LMNA*-R249Q, *FLNC*-R1267Q, *FLNC*-V2264M) associated with a genetically determined myocardial pathology leading to dysfunction of cardiomyocytes. The study used a model of cardiomyocytes differentiated from induced pluripotent stem cells (CM-iPSCs). We have demonstrated an increase in slow inactivation in the model of CM-iPSCs obtained from patients with a phenotype of cardiomyopathy combined with ventricular arrhythmias. Thus, this work contributes to understanding the role of the slow inactivation process in the mechanism of the development of heart pathology.

Keywords: *DSP*, *FLNC*, gating, inherited arrhythmia, *LMNA*, Na_v1.5, slow inactivation