

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕДСЕРДНОГО НАТРИЙУРЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА КАРДИОМИОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ОТДАЛЕННОГО ПОСТРЕПЕРФУЗИОННОГО ПЕРИОДА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

УДК 57.086:612.018.591.8:61–089.5
Поступила 16.10.2013 г.



М.Л. Бугрова, к.б.н., доцент, зав. отделом электронной микроскопии ЦНИЛ НИИ ПФМ;
Д.А. Абросимов, аспирант кафедры гистологии с цитологией и эмбриологией;
Е.И. Яковлева, к.б.н., старший научный сотрудник отдела электронной микроскопии ЦНИЛ НИИ ПФМ;
О.С. Баскина, к.б.н., научный сотрудник отдела морфологии ЦНИЛ НИИ ПФМ;
И.Л. Ермолин, д.б.н., профессор, зав. кафедрой гистологии с цитологией и эмбриологией

Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603000, пл. Минина и Пожарского, 10/1

Цель исследования — оценить интенсивность накопления и выброса предсердного натрийуретического пептида (ПНП) крыс в условиях отдаленного постреперфузионного периода после 10-минутной остановки кровообращения с применением количественного анализа гранул секреторных кардиомиоцитов, морфологических и физиологических методов.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 19 нелинейных крысах-самцах массой 220–250 г. Тотальную ишемию (10 мин) моделировали пережатием сердечно-сосудистого пучка по В.Г. Корпачеву. Интенсивность процессов накопления и выброса ПНП оценивали количественным анализом иммуномеченых гранул предсердных миоцитов в трансмиссионном электронном микроскопе. На светооптическом уровне анализировали тканевые перестройки в миокарде. Физиологическое состояние животных в постреперфузионном периоде оценивали по параметрам variability сердечного ритма и уровню артериального давления.

Результаты. В отдаленном постреперфузионном периоде установлено усиление процессов образования и выведения ПНП в предсердных миоцитах крыс. Увеличение выброса ПНП происходит на фоне синтетической и пролиферативной активности фибробластов и оказывает кардиопротекторный эффект, способствующий снижению степени развития кардиосклероза. Выделяемый ПНП участвует в восстановлении сердечного ритма в условиях повышенного артериального давления.

Заключение. Количественный анализ иммуномеченых гранул с комплексом морфологических и физиологических методов свидетельствует об усилении к 60-м суткам постреперфузионного периода процессов образования и выведения предсердного натрийуретического пептида в предсердных кардиомиоцитах крыс.

Ключевые слова: предсердный натрийуретический пептид; ПНП; отдаленный постреперфузионный период.

English

The Study on Atrial Natriuretic Peptide of Cardiomyocytes in a Remote Post-Reperfusion Period in Experiment

M.L. Bugrova, PhD, Associate Professor, Head of Electron Microscopy Unit, Central Scientific Research Laboratory of Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine;

D.A. Abrosimov, Postgraduate, the Department of Histology with Cytology and Embryology;

E.I. Yakovleva, PhD, Senior Research Worker, Electron Microscopy Unit, Central Scientific Research Laboratory of Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine;

O.S. Baskina, PhD, Research Worker, the Morphology Department, Central Scientific Research Laboratory of Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine;

I.L. Ermolin, D.Bio.Sc., Professor, Head of the Department of Histology with Cytology and Embryology

Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603000

Для контактов: Бугрова Марина Леонидовна, тел. раб. (831)465-41-92, тел. моб. +7 903-849-12-38; e-mail: marysmir@mail.ru

The aim of the investigation was to assess the intensity of rat atrial natriuretic peptide (ANP) accumulation and release in a remote post-reperfusion period after a 10-minute circulatory arrest using quantitative analysis of secretory cardiomyocyte granules, morphological and physiological methods.

Materials and Methods. The experiments were carried out on 19 non-linear male rats weighting 220–250 g. Total ischemia (10 min) was simulated by cardiovascular bundle compression according to V.G. Korpachev. The intensity of ANP accumulation and release processes was assessed by quantitative analysis of immunolabeled atrial myocyte granules in transmission electron microscope. We studied tissue rearrangement in myocardium at light-optical level. Physiological condition of animal was assessed in post-reperfusion period by heart rate variability and arterial pressure level.

Results. Rat atrial myocytes in a remote post-reperfusion period were found to have intensified ANP accumulation and release processes. An increased release proceeds against the background of synthetic and proliferative activity of fibroblasts and has a cardioprotective effect promoting the decrease of cardiosclerosis development. Released ANP participates in cardiac rhythm recovery under elevated blood pressure.

Conclusion. Quantitative analysis of immunolabeled granules together with a complex of morphological and physiological methods indicates the intensification of atrial natriuretic peptide accumulation and release in rat atrial cardiomyocytes by the 60th day of post-reperfusion period.

Key words: atrial natriuretic peptide; ANP; remote post-reperfusion period.

Предсердный натрийуретический пептид (ПНП) — наиболее активный из многочисленной группы натрийуретических пептидов, участвующих в регуляции водно-солевого баланса и гемодинамики посредством снижения артериального давления (АД) и являющихся антагонистами ренин-ангиотензин-альдостероновой системы [1]. ПНП был впервые обнаружен в гранулах кардиомиоцитов (КМЦ) предсердий De Bold с коллегами в 1981 г., а впоследствии найден и в тучных клетках, в респираторном эпителии легких, гладких миоцитах легочных вен, нейронах гипоталамуса [2]. При связывании ПНП с рецепторами А или В на клеточных мембранах органов-мишеней мембраносвязанная гуанилатциклаза превращает гуанозинтрифосфат в циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ), который далее активирует протеинкиназы или фосфодиэстеразы и реализует физиологические эффекты ПНП. Снижение АД происходит за счет воздействия на почки путем увеличения диуреза, натрийуреза и ингибирования синтеза/секреции ренина, а также альдостерона в надпочечниках [1]. ПНП способствует снижению объема жидкости в кровотоке за счет увеличения проницаемости эндотелия сосудов и вазодилатации [3]. Помимо вышеперечисленных эффектов ПНП участвует в липидном обмене и воспалительных реакциях. Концентрация ПНП в крови значительно повышена при сердечной дисфункции и артериальной гипертензии, однако причинно-следственные отношения остаются неясными из-за недостатка данных о ПНП в норме и в условиях патологии [4]. На сегодняшний день нет точных, чувствительных и специфических способов определения содержания ПНП вследствие его метаболических, структурных и физиологических особенностей, поэтому метод электронной микроскопии с применением иммуноцитохимии может служить полезным инструментом для изучения ПНП. Оценку интенсивности синтеза, накопления и выведения ПНП можно провести с помощью количественного анализа разных типов гранул секреторных КМЦ, меченных антителами к данному пептиду [5–7]. Этот метод — достаточно чувствительный и информативный и в совокупности с контролем уровня АД и сердечного ритма позволяет объяснить происходящие в организме экспериментальных животных процессы.

Цель исследования — оценить интенсивность накопления и выброса предсердного натрийуретического пептида крыс в условиях отдаленного постреперфузионного периода после 10-минутной остановки кровообращения с применением количественного анализа гранул секреторных кардиомиоцитов, морфологических и физиологических методов.

Материалы и методы. Исследования проведены в соответствии с правилами лабораторной практики на 19 нелинейных крысах-самцах массой 220–250 г. При выполнении экспериментов неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.). Тотальную ишемию по В.Г. Корпачеву моделировали 10-минутным пережатием сердечно-сосудистого пучка [8].

Электронно-микроскопический анализ образцов ткани правого предсердия и левого желудочка интактных и экспериментальных животных (через 60 сут постреперфузионного периода — ПРП) проводили по стандартной методике [9]. Иммуноцитохимические реакции для выявления локализации ПНП осуществляли на ультратонких срезах с помощью поликлональных антител Rabbit anti-Atrial Natriuretic Factor (1-28) (rat) (Peninsula Laboratories, LLC, Bachem, США) и антител Protein-A/Gold (15 nm) (EM Grade, Electron Microscopy Sciences, США). Срезы контрастировали уранилацетатом, цитратом свинца и анализировали в электронном микроскопе Morgagni 268D (FEI, США). По одной из используемых классификаций выделили два типа гранул: А-тип — «зрелые, запасающие» и В-тип — «растворяющиеся» [5–7]. А- и В-гранулы с пептидом в предсердных КМЦ считали по методике в полях зрения (38×38 мкм) [7].

Исследование ткани левого желудочка на светоптическом уровне проводили у интактных крыс и через 60 сут ПРП. Образцы фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и заливали в парафин [9]. Приготовленные на микротоме SM 2000R (Leica, Австрия) срезы 5–7 мкм окрашивали по Ван-Гизону (для выявления коллагеновых волокон); изучали с помощью светового микроскопа Eclips 80i (Nikon, Япония) и программы NIS-Elements BR 4.00.02. При увеличении

40 определяли процентное соотношение КМЦ и коллагеновых волокон в полях зрения (2560×1920 мкм). Результаты оценивали с помощью критерия Манна–Уитни.

Регистрировали исходные ЭКГ крыс и через 60 сут ПРП с помощью прибора «Полиспектр-12» («Нейрософт», Россия). Применяли анализ вариабельности сердечного ритма (ВСР), используя следующие показатели: средний кардиоинтервал (R–Rcp), стандартное отклонение R–R-интервалов (SDNN), коэффициент вариации (CV); показатели спектрального анализа в нормализованных единицах (н.е.): общая мощность спектра (TP), мощности низкочастотных (LF и VLF) и высокочастотных диапазонов (HF). Оценку нелинейных параметров ВСР проводили методом построения на фазовой плоскости графика приращения R–R-интервалов (хаос-граммы). Хаос-грамма программным способом разбивалась на показатели N2, N3, N4-6, которые отражали количество волн с определенным чис-

лом точек (2, 3, 4–6 соответственно) [7, 10]. АД измеряли через каротидную артерию инвазивным методом с помощью датчика давления MPX5050DP (Motorola, США). Полученный сигнал анализировали в программном комплексе PowerGraph V.2.0. Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 10.0 с применением критериев Фридмана и Вилкоксона ($p < 0,05$).

Результаты. На 60-е сутки ПРП количественный анализ гранул с ПНП-иммунореактивной меткой миоцитов правого предсердия крыс показал увеличение гранул А-типа на 60%, В-типа на 41%, общего количества гранул — на 53% по сравнению с показателями интактных животных (рис. 1).

Светооптическое изучение миокарда левого желудочка выявило выраженный интерстициальный отек и умеренную гипертрофию КМЦ (рис. 2, 3). Морфометрический анализ показал статистически значимое увеличение площади, занимаемой зрелыми

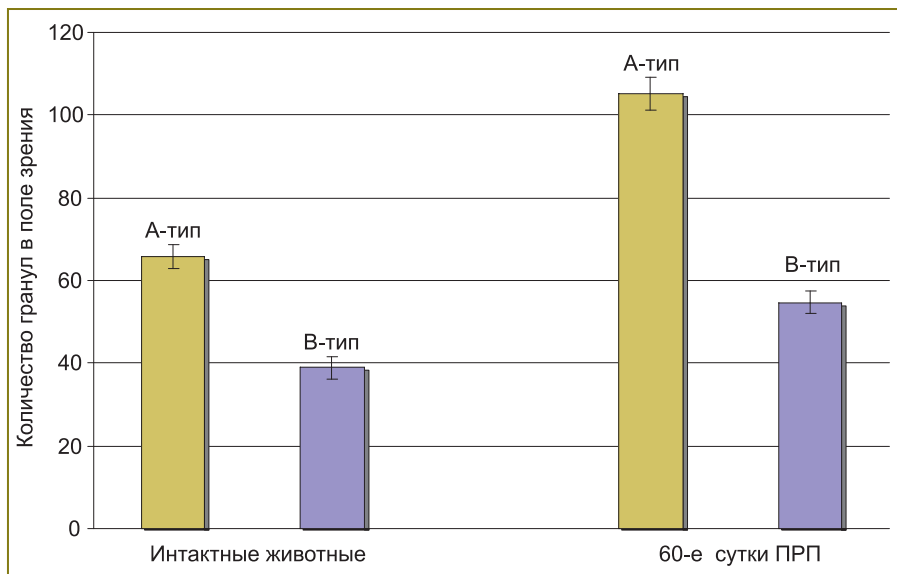


Рис. 1. Количественное распределение гранул с ПНП через 60 сут постреперфузионного периода (по тесту Манна–Уитни)

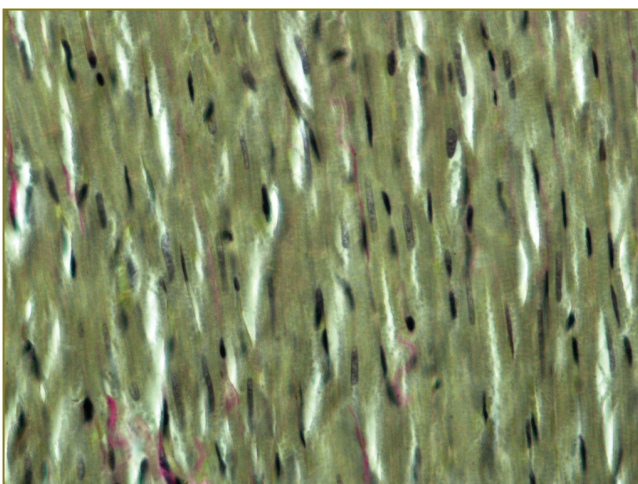


Рис. 2. Структура миокарда левого желудочка интактной крысы. Ок. ×10, об. ×40; окраска по Ван-Гизону

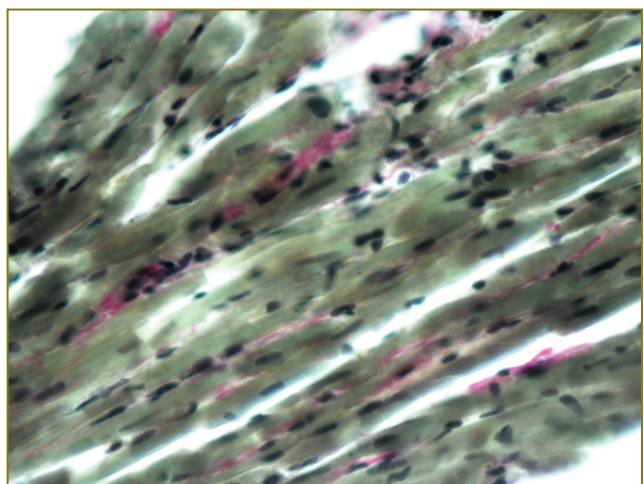


Рис. 3. Структура миокарда левого желудочка крысы через 60 сут постреперфузионного периода. Ок. ×10, об. ×40; окраска по Ван-Гизону

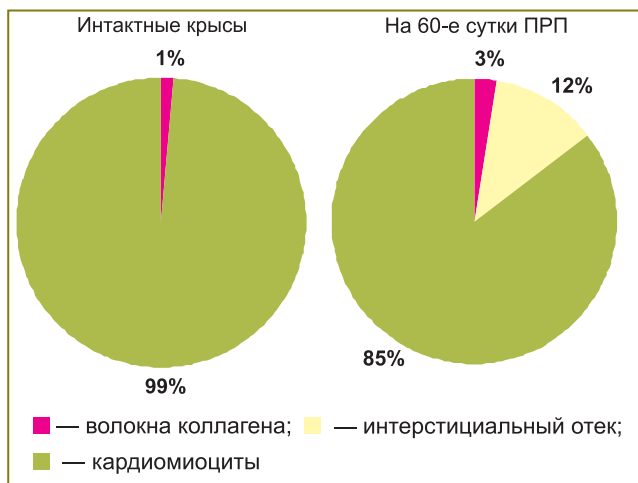


Рис. 4. Изменение соотношения тканевых компонентов в миокарде левого желудочка в отдаленном постреперфузионном периоде

коллагеновыми волокнами, — на 3% по сравнению с интактными животными. Неокрашенная площадь — с аморфным веществом соединительной ткани — составила 12% от общей площади миокарда. Площадь КМЦ уменьшалась на 14% от интактного показателя (рис. 4).

При субмикроскопическом исследовании миокарда правого предсердия и левого желудочка через 60 сут ПРП обнаружены мозаичные изменения КМЦ: часть клеток имела ядра с выраженными инвагинациями кариолеммы и агрегацией хроматина. В других клетках ядра были с ровными контурами, определялись ядрышки, хроматин был равномерно распределен в кариоплазме. Митохондрии КМЦ в основном имели конденсированную форму; часть органелл были с просветлением матрикса и дезориентацией крист. Обнаружено образование вакуолей. Миофибриллы в большинстве КМЦ четко определялись. В единичных клетках наблюдались зоны с расслоением миофибрилл. Выявлено значительное расширение саркоплазматического ретикулума в большинстве КМЦ. Встречались вторичные лизосомы (рис. 5). В миокарде правого предсердия и левого желудочка обнаружены КМЦ в состоянии апоптотической дегенерации (рис. 6). В интерстициальном пространстве выявлено разрастание соединительной ткани, в аморфном матриксе которой определялся зрелый коллаген и фибробласты (см. рис. 6).

К 60-м суткам ПРП показатели ВСП статистически значимо не отличались от показателей интактных животных, кроме параметра N3, который увеличился на 53% по сравнению с исходным уровнем (см. таблицу).

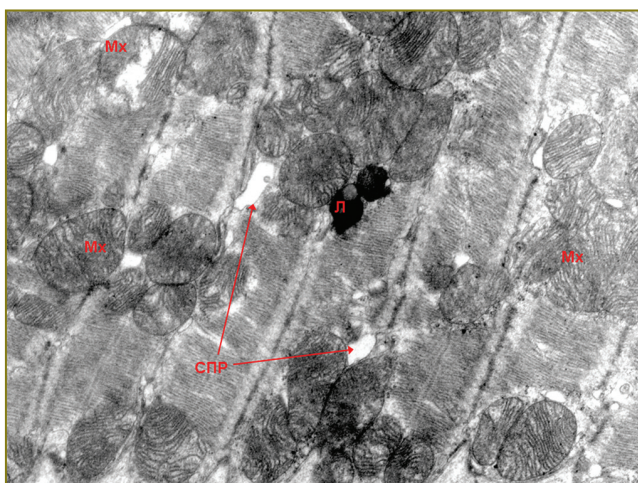


Рис. 5. Ультраструктура кардиомиоцита левого желудочка крысы через 60 сут постреперфузионного периода: Мх — митохондрии; Л — вторичные лизосомы; СПР — расширенный саркоплазматический ретикулум. $\times 8900$

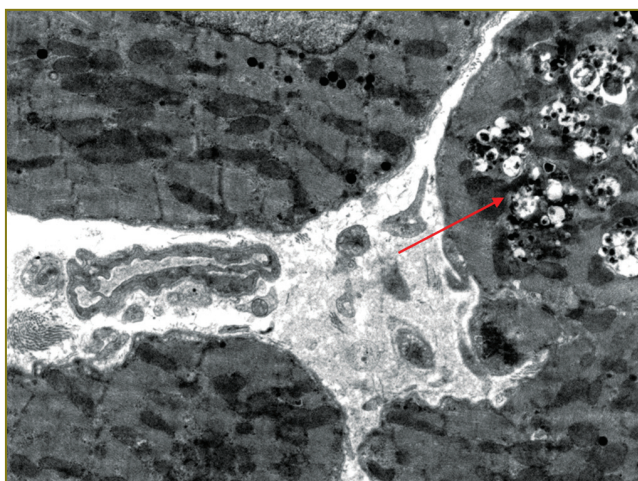


Рис. 6. Ультраструктура миокарда правого предсердия крысы через 60 сут постреперфузионного периода; стрелкой показан кардиомиоцит в состоянии апоптотической дегенерации. $\times 4400$

Показатели вариабельности сердечного ритма у крыс в отдаленном постреперфузионном периоде (M±m)

Показатели	Исходные	Через 60 сут ПРП
R-Rcp, мс	157,24±7,21	151,4±9,68
CV, %	3,24±0,34	3,54±0,75
SDNN, мс	5,16±1,25	5,29±1,08
HF, н.е.	4,32±0,46	4,46±0,55
LF, н.е.	3,86±1,16	3,9±1,11
VLF, н.е.	5,47±1,32	5,76±1,07
TP, н.е.	6,15±1,13	6,17±1,07
N2	11,40±2,74	11,2±2,75
N3	19,40±4,67	29,7±4,27*
N4-6	46,20±5,72	41,5±3,43

* — различия значений статистически значимы относительно исходных, $p < 0,05$

В этот период в группе экспериментальных животных уровень АД был статистически значимо выше (на 23% по сравнению с исходным значением — $133,60 \pm 3,34$ против $108,32 \pm 2,54$ мм рт. ст.

Обсуждение. Метод деления гранул с ПНП на определенные типы и подсчет их в электронном микроскопе информативен и чувствителен, что актуально из-за недостатка в настоящее время точных и специфических методов изучения сердечных натрийуретических пептидов [11]. Впервые нами была изучена интенсивность процессов накопления и выброса ПНП в условиях отдаленного ПРП на целостном организме с применением комплекса методов: количественного анализа меченых гранул секреторных КМЦ, морфологических и физиологических методов оценки состояния животных. Исследователи не пришли к единому ответу на вопрос, является ли увеличение числа секреторных гранул в предсердных КМЦ отражением высокой эндокринной активности КМЦ или, наоборот, замедленного выделения гранул [4, 11]. В наших исследованиях повышенное количество А- и В-типов гранул к 60-м суткам ПРП свидетельствовало об интенсивном синтезе, накоплении и выбросе ПНП в этот период, так как одновременно был выявлен высокий уровень АД, являвшийся стимулирующим фактором для образования и выведения пептида. Из литературных источников известно, что в условиях гипертензии в плазме крови всегда наблюдается повышенный уровень ПНП [1, 12]. Исследователи в экспериментах на клеточных культурах, на изолированных образцах ткани миокарда показали взаимосвязь повышенного уровня ПНП с активностью фибробластов, при этом пептид оказывал ингибирующее действие на синтетическую и пролиферативную функцию клеток [13]. Таким образом, обнаруженные в данном исследовании фибробласты в активной форме, увеличение коллагеновых волокон и аморфного вещества в интерстициальном пространстве косвенно подтверждали наше предположение об активном синтезе и выбросе ПНП в отдаленном ПРП. По мнению авторов [14], исследовавших изменения в миокарде после ишемии/реперфузии, увеличение содержания компонентов соединительной ткани происходит вследствие гибели

КМЦ и за счет повышенного синтеза экстрацеллюлярного матрикса в раннем ПРП. Подобные структурные и функциональные перестройки со временем становятся причиной миокардиального ремоделирования [15]. Сходная морфологическая картина наблюдалась при кардиосклерозе у больных с хронической сердечной недостаточностью и сахарным диабетом 2-го типа [16, 17]. В данном случае ПНП мог оказывать кардиопротекторное действие, установленное исследователями в клинической практике и в эксперименте [18–20]. Расширенные элементы саркоплазматического ретикулула могли явиться предпосылками активации гранулообразования. Проведенные нами аналогичные исследования [7] в раннем ПРП выявили увеличение процессов образования и выброса ПНП при одновременном расширении саркоплазматического ретикулула в КМЦ, что объяснялось стимуляцией синтеза ПНП через рецепторы, ассоциированные с G-белками (Go и Gq), активирующие Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы SK4, которые расположены на саркоплазматическом ретикулуле в парануклеарной зоне [1]. Примененные при этом анализ ВСР и измерение АД позволили сделать следующие выводы: в первые минуты ПРП кратковременное повышение АД и активация симпатoadреналовой, гипоталамико-надпочечниковой и ренин-ангиотензиновой систем не влияли на синтез и секрецию ПНП в миоцитах правого предсердия. На 60-й минуте ПРП в условиях функционирования сердца на интракардиальном уровне высокая интенсивность процессов синтеза, накопления и секреции ПНП в предсердных миоцитах была связана со стимулирующим воздействием гипоксических и ишемических факторов в этот период [7].

Через 60 сут ПРП происходит восстановление исходной структуры ритма по показателям ВСР, кроме показателя N3, отражающего тоническое влияние вагуса. В исследованиях авторов [21] выявлено положительное влияние ПНП на ритмогенез, которое осуществляется двумя способами. Первый механизм — опосредованный, через автономную нервную систему, путем ингибирования симпатической и стимуляции парасимпатической активности. Вторым, прямой, способ — через направленную регуляцию специфических сердечных ионных каналов, ослабляющих входящий кальциевый ток. По-видимому, ПНП, активно выбрасываемый КМЦ правого предсердия, являлся компонентом сложной цепи реакций, способствующих восстановлению сердечной деятельности в условиях отдаленного ПРП.

Таким образом, исследование ПНП в раннем и отдаленном ПРП на уровне целостного организма с применением комплекса сложных методик (иммуноцитохимии гранул КМЦ, ВСР и других методов) позволило внести вклад в понимание функционирования группы натрийуретических пептидов в условиях сердечно-сосудистой патологии, что, несомненно, имеет научную и практическую значимость.

Заключение. Количественный анализ меченых гранул с комплексом морфологических и физиологических методов свидетельствует об усилении к 60-м суткам постреперфузионного периода процессов об-

разования и выведения предсердного натрийуретического пептида в предсердных кардиомиоцитах крыс.

Финансирование исследования. Работа выполнена в рамках ведомственной НИР Минздрава России 2012–2016 гг. «Механизмы регуляции физиологических функций при экспериментальных состояниях организма».

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература

1. de Bold A.J. Thirty years of research on atrial natriuretic factor: historical background and emerging concepts. *Can J Pharmacol* 2011; 89: 527–531.
2. Мартынова М.Г., Накацаева Е.В., Емельянова М.И., Моисеева О.М., Ерохина И.Л. Иммулокализация предсердного натрийуретического пептида в тучных клетках перикарда крысы и человека. *Цитология* 2008; 3: 237–242.
3. Kuhn M. Endothelial actions of atrial and B-type natriuretic peptides. *Br J Pharmacol* 2012 Jan 5. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01827.x. [Epub ahead of print].
4. Максимов В.Ф., Коростышевская И.М., Маркель А.Л., Филюшина Е.Е., Якобсон Г.С. Натрийуретические пептиды сердца и артериальная гипертензия: экспериментальное исследование. *Вестник РАМН* 2013; 1: 4–9.
5. Mifune H., Honda J., Takamori S., Sugiyama S., Yagami K., Suzuki S. A-type natriuretic peptide level in hypertensive transgenic mice. *Exp Anim* 2004 Jan; 53(1): 11–9.
6. Рахчеева М.В., Бугрова М.Л. Изменение соотношения гранул А- и В-типов, содержащих предсердный и мозговой натрийуретические пептиды, в предсердных миоцитах крыс в условиях вазоренальной гипертензии. *Цитология* 2010; 8: 629–33.
7. Бугрова М.Л., Яковлева Е.И., Абросимов Д.А. Взаимосвязь интенсивности синтеза, накопления и секреции предсердного натрийуретического пептида кардиомиоцитов с уровнем регуляции сердечного ритма у крыс в условиях раннего постреперфузионного периода. *Соврем технол мед* 2012; 3: 26–30.
8. Корпачев В.Г., Лысенков С.П., Телль Л.З. Моделирование клинической смерти и постреанимационной болезни у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия* 1982; 3: 78–80.
9. Микроскопическая техника. Под ред. Саркисова Д.С., Перова Ю.Л. М: Медицина; 1996; 544 с.
10. Гаврилушкин А.П., Киселев С.В., Медведев А.П., Шелепнев А.В., Маслюк А.П. Геометрический анализ нелинейных хаотических колебаний в оценке variability ритма сердца. Н. Новгород; 2001.
11. Коростышевская И.М., Максимов В.Ф., Курганов С.А. Возможности ультраструктурной оценки секреторной активности предсердных кардиомиоцитов. *Цитология* 2013; 8: 539–547.
12. Голухова Е.З., Алиева А.М. Клиническое значение определения натрийуретических пептидов у больных с хронической сердечной недостаточностью. *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия* 2007; 1: 45–51.
13. Maki T., Horio T., Yoshihara F., Suga S., Takeo S., Matsuo H., Kangawa K. Effect of neutral endopeptidase inhibitor on endogenous atrial natriuretic peptide as a paracrine factor in cultured cardiac fibroblasts. *British Journal of Pharmacology* 2000; 131(6): 1204–1210.
14. Полякова И.А., Шорникова М.В., Саморукова И.В., Ченцов Ю.С. Ультраструктура хондриома кардиомиоцитов крыс при клинической смерти и в постреанимационном периоде. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 1999; 1: 95–100.
15. Соколова Р.И., Жданов В.С. Гибернация и станнинг как проявление ишемической дисфункции миокарда. *Архив патологии* 2002; 1: 50–54.
16. Цыпленкова В.Г. Дифференцировка, «гибернация» и апоптоз кардиомиоцитов — возможные факторы прогрессирования диабетической кардиомиопатии. *Архив патологии* 2009; 4: 30–33.
17. Митьковская Н.П., Нижникова О.Г., Статкевич Т.В., Патеюк И.В., Балыш Е.М., Пинчук А.Ф. Патогенетические аспекты постинфарктного ремоделирования миокарда. *Медицинский журнал* 2013; 1: 12–18.
18. Гуревич М.А., Мравян С.Р., Веселова Т.Е. Значение системы предсердных натрийуретических пептидов при сердечной недостаточности и артериальной гипертензии. *Кардиология* 2003; 9: 81–85.
19. Бугримова М.А., Савина Н.М., Ваниева О.С., Сидоренко Б.А. Мозговой натрийуретический пептид как маркер и фактор прогноза при хронической сердечной недостаточности. *Кардиология* 2006; 1: 51–57.
20. Fujii Y., Ishino K., Tomii T., Kanamitsu H., Fujita Y., Mitsui H., Sano S. Atrial natriuretic peptide improves left ventricular function after myocardial global ischemia-reperfusion in hypoxic hearts. *Artif Organs* 2011 Nov 1. doi: 10.1111/j.1525-1594.2011.01358.x. [Epub ahead of print].
21. Perrin M.J., Gollob M.H. The role of atrial natriuretic peptide in modulating cardiac electrophysiology. *Heart rhythm* 2012; 4: 610–615.