

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ ПЕЙСМЕКЕРНЫХ ТОКОВ НА СЕРДЦЕ КРЫС
ПРИ ФОРМИРОВАНИИ АДРЕНЕРГИЧЕСКОЙ ИННЕРВАЦИИ

© 2019 г. А. М. Купцова¹, Н. И. Зиятдинова¹, Т. Л. Зефилов^{1, *}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*E-mail: zefirovl@mail.ru

Поступила в редакцию 01.07.2019 г.

После доработки 03.08.2019 г.

Принята к публикации 03.08.2019 г.

Токи, активируемые гиперполяризацией (I_f), участвуют в генерации спонтанной электрической активности в сердце. I_f модулируются уровнем цАМФ, симпатическим и парасимпатическим отделами вегетативной нервной системы. Развитие иннервации является важным фактором формирования оркестра ионных токов в кардиомиоцитах. Возраст 6 недель у крыс представляет особый интерес, поскольку в данном возрасте наблюдается минимальная частота сердечных сокращений (ЧСС) и завершается развитие адренергической иннервации сердца. Целью настоящего исследования явилось исследование роли I_f тока в регуляции работы миокарда на одном из этапов развития адренергической иннервации сердца. Анализ полученных результатов выявил, что введение блокатора I_f ZD7288 в концентрациях 10^{-9} – 10^{-5} М крысам данного возраста в экспериментах на изолированном по Лангендорфу сердце приводило к снижению ЧСС. ZD7288 в концентрациях 10^{-8} – 10^{-5} М снижал давление, развиваемое левым желудочком и коронарный поток изолированного сердца 6-недельных крыс. Перфузия изолированного сердца блокатором I_f в концентрации 10^{-9} М увеличивала давление, развиваемое левым желудочком, и не влияла на коронарный поток. При исследовании электрической активности предсердных кардиомиоцитов ZD7288 (10^{-7} – 10^{-5} М) увеличивал длительность реполяризации на длительности потенциала действия на уровнях 50% (дпд50%) и 90% (дпд90%), уменьшал частоту генерации потенциала действия. Полученные результаты показали, что блокада I_f влияет на ЧСС, силу сердечных сокращений и на кровоснабжение изолированного сердца 6-недельных крыс. По-видимому, сердце, находящееся на этапе завершения формирования адренергической иннервации, имеет более высокую плотность данных токов, чем сердце взрослых крыс, что проявляется в более выраженной ответной реакции на блокаду I_f . Изменение силы сокращения сердца может происходить вследствие изменения длительности фазы реполяризации рабочих кардиомиоцитов.

Ключевые слова: HCN-канал, изолированное сердце, частота сердечных сокращений, коронарный поток, потенциал действия, длительность фазы реполяризации

DOI: 10.1134/S0869813919100042

Циклические нуклеотид-зависимые активируемые гиперполяризацией каналы (HCN-каналы) были секвенированы в конце 1990-х годов [1] и вызвали интерес у широкого круга исследователей – от кардиологов, нейробиологов, биофизиков, фармакологов до специалистов в области молекулярной биологии. 2000-е годы характеризовались экспоненциальным ростом исследований, направленных на уточ-

нение онтогенетических и филогенетических особенностей этого уникального семейства каналов [2–4]. HCN являются ионными каналами, неселективно проводящими ионы Na^+ и K^+ , блокируются миллимолярными концентрациями внеклеточного Cs^+ и модулируются циклическими нуклеотидами (главным образом цАМФ). HCN-каналы участвуют в генерации спонтанной электрической активности в сердце и регуляции синаптической передачи в мозге [5, 6]. Данные каналы обеспечивают входящий ток, активируемый при гиперполяризации (I_f) или “funny” ток [7]. HCN-каналы были обнаружены также в некоторых периферических тканях, где их функции продолжают изучаться [8].

Семейство HCN состоит из четырех изоформ (HCN1–4) [9]. Первые три (HCN1–3) были сначала идентифицированы в мозге мыши [1]. HCN4 были выявлены при проведении скрининга кДНК в тканях сердца человека, при этом наблюдалась более заметная выраженность HCN4 в ткани сердца человека, чем в тканях мозга [6]. В сердце млекопитающих обнаружены все четыре изоформы HCN1–4 каналов, которые по-разному выражены в отделах сердца [9]. HCN-каналы обнаружены в нервной системе, проводящей системе сердца, а также в рабочем миокарде. При изучении экспрессии HCN-каналов в проводящей системе сердца показано, что у большинства исследуемых животных, а также у человека, в большей степени распространены HCN4 и HCN2-каналы, в меньшем количестве HCN1 [10]. HCN3-каналы в синоатриальном узле отсутствуют [11].

Показано влияние блокады HCN-каналов на сердечную деятельность *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* в онтогенезе. Показано участие I_f в регуляции сердечного ритма у крыс [12, 13], блокада I_f оказывает влияние на потенциал действия [14] и силу сокращения миокарда предсердий и желудочков крыс в онтогенезе [15]. В сердцах эмбрионов и новорожденных животных было обнаружено значительное количество HCN-каналов в миоцитах желудочков [16, 17], уровень экспрессии этих каналов снижается с созреванием организма, а также при патофизиологических состояниях, таких как гипертрофия [10] или фибрилляция предсердий [18]. Поскольку рабочие кардиомиоциты не способны генерировать спонтанную электрическую активность, возможно, I_f участвуют в формировании потенциала действия рабочих кардиомиоцитов а, следовательно, и в регуляции сократимости сердца. Показаны функциональные различия I_f в развивающемся сердце крыс [12, 13, 19].

I_f модулируются уровнем цАМФ, симпатическим и парасимпатическим отделами вегетативной нервной системы [20, 21]. Развитие иннервации является существенным регулятором ионных токов кардиомиоцитов, развития вегетативной реакции сердца [3, 4, 22]. В течение 1-й недели после рождения в сердце крыс отсутствуют, а к 3-й неделе появляются первые признаки симпатической иннервации. Имеются данные о том, что в малом количестве и с низкой активностью симпатические волокна в сердце крыс выявляются и у новорожденных животных [23], в том числе содержащие фермент синтеза катехоламинов – тирозингидроксилазу, а также нейропептид Y [24, 25]. Увеличение плотности симпатических волокон и формирование их функциональной активности завершается к 6-й недели жизни. Возраст 6 недель у крыс представляет особый интерес, поскольку на данном этапе развития организма наблюдаются значительные изменения в работе сердца. Показано, что в данном возрасте наблюдается минимальная ЧСС, завершается развитие симпатической иннервации сердца и регуляция сердечно-сосудистой системы приобретает черты зрелого организма [16, 22, 26].

Несмотря на то, что одной из основных причин сердечно-сосудистой недостаточности является повышенная активность симпато-адреналовой системы, по-прежнему отсутствуют детальные исследования регуляторных взаимодействий в сердце в процессе онтогенеза. Поэтому, целью настоящего исследования явилось

изучение роли I_f в регуляции работы миокарда на одном из этапов развития симпатической иннервации сердца.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Препараты, растворы, химические агенты. Исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями локального биоэтического комитета Казанского федерального университета. Исследования проведены на препаратах сердца белых беспородных 6-недельных крыс. В данном возрасте завершается формирование симпатической иннервации сердца [18]. Результаты анализировали в сравнении с экспериментальными данными, полученными на 20-недельных крысах, имеющих сформированную иннервацию сердца.

В исследовании на изолированном по Лангендорфу сердце крыс использовали раствор Кребса–Хензеляйте для теплокровных животных следующего состава (ммоль/л): NaCl 118.0, KCl 4.7, NaHCO₃ 25.0, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, глюкоза 5.5. В экспериментах по изучению параметров электрической активности препарата правого предсердия крыс использовали раствор Тироде (ммоль/л): NaCl 129, KCl 4, NaHCO₃ 20, MgSO₄ 0.5, CaCl₂ 1.2, NaH₂PO₄ 20.9, глюкоза 5. Растворы насыщались карбогеном (95% O₂, 5% CO₂), pH растворов поддерживался на уровне 7.3–7.4, при температуре 37°C. В экспериментах использовали блокатор I_f – ZD7288 в концентрациях 10⁻⁹–10⁻⁵ М. Все используемые вещества произведены фирмами Sigma и Tocris (США).

Изолированное по Лангендорфу сердце. Крыс обоих полов массой 80–100 грамм анестезировали 25%-ным раствором уретана (800 мг/кг массы) и вскрывали грудную клетку. Сердце изолировали и промывали ледяным рабочим раствором Кребса–Хензеляйте (2°C). Изолированное сердце фиксировали за аорту на канюле и подавали оксигенированный рабочий раствор на установке Лангендорфа (ADInstruments, Австралия) при температуре 37°C. Осуществлялась гравитационная ретроградная перфузия под постоянным гидростатическим давлением 60–65 мм рт. ст. Для измерения давления в полость левого желудочка через отверстие, сделанное за левым ушком, помещали латексный баллончик, заполненный дистиллированной водой. Изменения давления внутри левого желудочка регистрировались с помощью датчика давления ML T844 (ADInstruments). По кривой подсчитывали ЧСС (уд/мин), давление, развиваемое левым желудочком (ДРЛЖ, мм рт. ст.) и коронарный поток (КП, мл/мин). Запись регистрировали на установке PowerLab 8/35 (ADInstruments) при помощи программы LabChartPro (ADInstruments).

Внутриклеточная регистрация электрической активности в рабочем миокарде. Наркотизированным уретаном животным вскрывали грудную клетку, сердца быстро извлекали и помещали в чашку Петри с рабочим раствором. Сердца препарировали и приготавливали препарат с ушком правого предсердия. Затем препарат помещали в камеру, куда подавался термостатируемый раствор Тироде. Электрическую активность рабочих кардиомиоцитов предсердий изучали с использованием стандартного метода внутриклеточного отведения. Мембранный потенциал (МП) и потенциал действия (ПД) регистрировали с использованием стеклянного микроэлектрода (диаметр кончика < 1 мкм, сопротивление 40–80 МΩ), заполненного 3М раствором KCl, помещенным в специальный холдер и закрепленным на микроманипуляторе. Сигналы регистрировали с помощью усилителя (Model 1600, AM Systems, США), затем анализировали параметры ПД. Обработка включала определение величины МП и амплитудно-временных параметров ПД: длительность фазы нарастания, длительность фазы реполяризации ПД на уровне 20, 50, и 90% (дпд20%, дпд50%, дпд90%), частота генерации потенциалов действия.

Статистика. Статистический анализ полученных результатов на изолированном по Лангендорфу сердце производился с помощью программы LabChartPro (версия v8). Полученные записи электрической активности миокарда анализировали в программе "Elpf 3.0". Количественные результаты исследования представлены в форме среднего значения (M) \pm стандартная ошибка (m), n – число независимых экспериментов. В сериях экспериментов на изолированном по Лангендорфу сердце в каждой концентрации $n = 7$. В опытах с внутриклеточной регистрацией электрической активности в рабочем миокарде в каждой концентрации $n = 7$. Достоверность статистических различий оценивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением апостериорных тестов (t -тест) для связанных групп и внесением поправок на множественность сравнений, а также использовали парный и непарный t -критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Перфузия изолированного сердца 6-недельных крыс блокатором токов, активируемых гиперполяризацией ZD7288 в концентрации 10^{-9} М увеличивала ДРЛЖ с 34 ± 6 до 41 ± 8 мм рт. ст. ($p < 0.01$) на 10-й минуте эксперимента. К заключительной минуте опыта ДРЛЖ увеличилось до 47 ± 9 мм рт. ст. ($p < 0.01$). Увеличение давления, развиваемого левым желудочком, от исходного составило 37% (рис. 1А, Б). Блокада I_f с помощью ZD7288 в изучаемой концентрации снижала ЧСС с 183 ± 33 до 157 ± 34 уд/мин ($p < 0.05$) к 14-й мин. Максимальное снижение ЧСС на 18% наблюдалось на 19-й мин эксперимента, ЧСС уменьшалась до 151 ± 36 уд/мин ($p < 0.05$, рис. 2). Добавление ZD7288 (10^{-9} М) в перфузирующий раствор не изменяло КП изолированного сердца 6-недельных крыс (рис. 3).

При добавлении блокатора I_f ZD7288 в концентрации 10^{-8} М на 10-й мин эксперимента наблюдали максимальное (на 20%) уменьшение силы сокращения левого желудочка с 41 ± 5 до 31 ± 5 мм рт. ст. ($p < 0.05$, рис. 1А). К концу наблюдения давление, развиваемое левым желудочком, составило 33 ± 5 мм рт. ст. ($p < 0.05$, рис. 1). Через 5 мин после введения блокатора I_f наблюдалась брадикардия, ЧСС понижалась с 193 ± 11 до 161 ± 14 уд/мин ($p < 0.05$). Максимальное снижение ЧСС (на 18%) до 158 ± 12 уд/мин ($p < 0.05$) наблюдали на 17-й мин эксперимента (рис. 2). Коронарный поток при перфузии ZD7288 уменьшался с 7.8 ± 1.1 до 7 ± 0.8 мл/мин к 20-й мин. Изменение составило 10% от исходного значения (рис. 3).

Добавление ZD7288 в концентрации 10^{-7} М уменьшало ДРЛЖ с 50 ± 6 до 41 ± 5.2 мм рт. ст. ($p < 0.01$) к 5-й мин эксперимента. Далее, на 10-й мин эксперимента, блокада I_f приводила к максимальному (на 23%) уменьшению ДРЛЖ до 39 ± 6 мм рт. ст. ($p < 0.01$, рис. 1А). Перфузия блокатором I_f уменьшала ЧСС с 186 ± 7 до 135 ± 14 уд/мин ($p < 0.05$) на 15-й мин, до 133 ± 12 уд/мин ($p < 0.01$) на 20-й мин наблюдения (рис. 2), т.е. на 28%. КП при добавлении блокатора I_f уменьшался с 7.6 ± 0.8 до 6.8 ± 0.7 мл/мин ($p < 0.01$) к 10-й мин эксперимента. На заключительной, 20-й мин наблюдения, КП составил 6.7 ± 0.6 мл/мин ($p < 0.01$, рис. 3). Уменьшение КП составило 11% от исходных значений.

Добавление в раствор ZD7288 в концентрации 10^{-6} М постепенно уменьшало ДРЛЖ на 38%: с 56 ± 10 до 38 ± 7 мм рт. ст. ($p < 0.05$) на 10-й мин и до 35 ± 5 мм рт. ст. на 20-й мин эксперимента ($p < 0.05$, рис. 1А). ЧСС изолированного сердца после добавления блокатора в перфузируемый раствор уменьшалась с 143 ± 15 до 91 ± 15 уд/мин ($p < 0.01$) к 10-й мин. На 19-й мин эксперимента наибольшее урежение ЧСС составило 43% (58 ± 18 уд/мин, $p < 0.01$, рис. 2). Блокада I_f приводила к плавному уменьшению КП на 16% с 6.9 ± 0.6 до 5.8 ± 0.6 мл/мин к последней минуте наблюдения ($p < 0.001$, рис. 3).

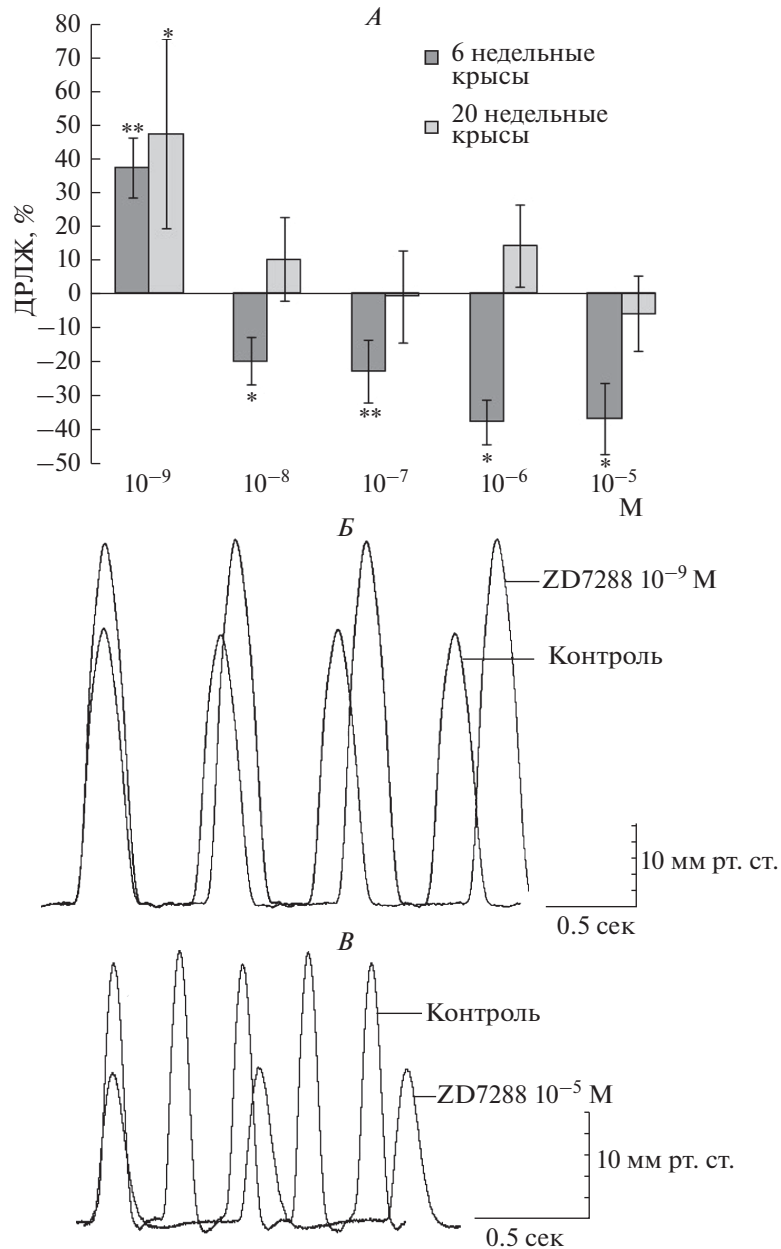


Рис. 1. А. Дозозависимое влияние блокады I_f на давление, развиваемое левым желудочком, у 6- и 20-недельных крыс. Ось ординат – изменения давления, развиваемого левым желудочком (ДРЛЖ, в %), ось абсцисс – концентрация блокатора ZD7288 (М). Различия по сравнению с контролем: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Б и В. Примеры записей, показывающие влияние ZD 7288 в концентрации 10^{-9} М (Б) и 10^{-5} М (В) на давление, развиваемое левым желудочком и частоту сердечных сокращений (ЧСС) изолированного по Лангендорфу сердца 6-недельных крыс.

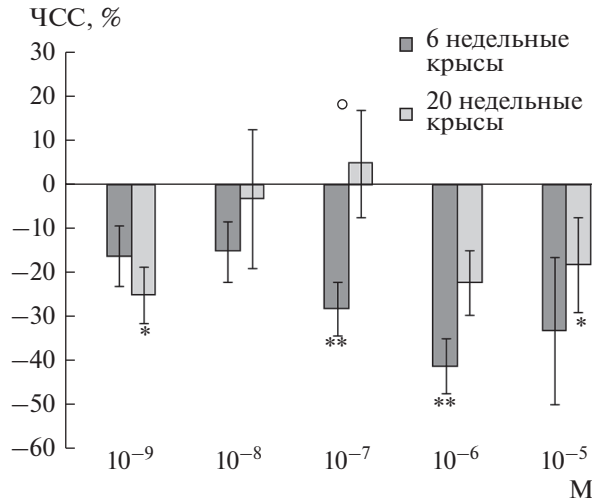


Рис. 2. Дозозависимое влияние ZD7288 на ЧСС 6- и 20-недельных крыс. Ось ординат – изменения ЧСС (в %), ось абсцисс – концентрация блокатора ZD7288 (в М). Различие с контролем: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

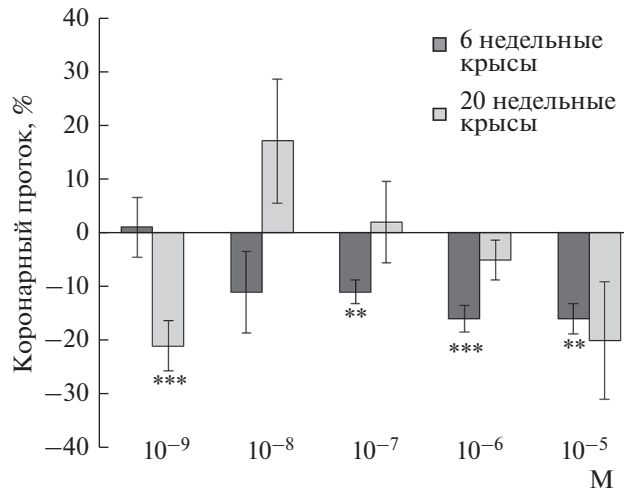


Рис. 3. Дозозависимое влияние ZD7288 на коронарный поток 6- и 20-недельных крыс. Ось ординат – изменения коронарного потока (КП, в %), ось абсцисс – концентрация блокатора ZD7288 (в М). Различие с контролем: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Блокатор ZD7288 в концентрации 10^{-5} М уменьшал ДРЛЖ на 37% с 37 ± 9 до 25 ± 6 мм рт. ст. ($p < 0.05$, рис. 1А, В). Также наблюдали урежение ЧСС на 33% с 170 ± 28 до 112 ± 36 уд/мин к 18-й мин эксперимента ($p < 0.05$, рис. 2), снижение КП на 16% с 6.5 ± 0.3 до 5.5 ± 0.2 мл/мин ($p < 0.01$, рис. 3).

Следующая серия экспериментов была направлена на выявление влияния блокады I_f на параметры электрической активности рабочего миокарда 6-недельных

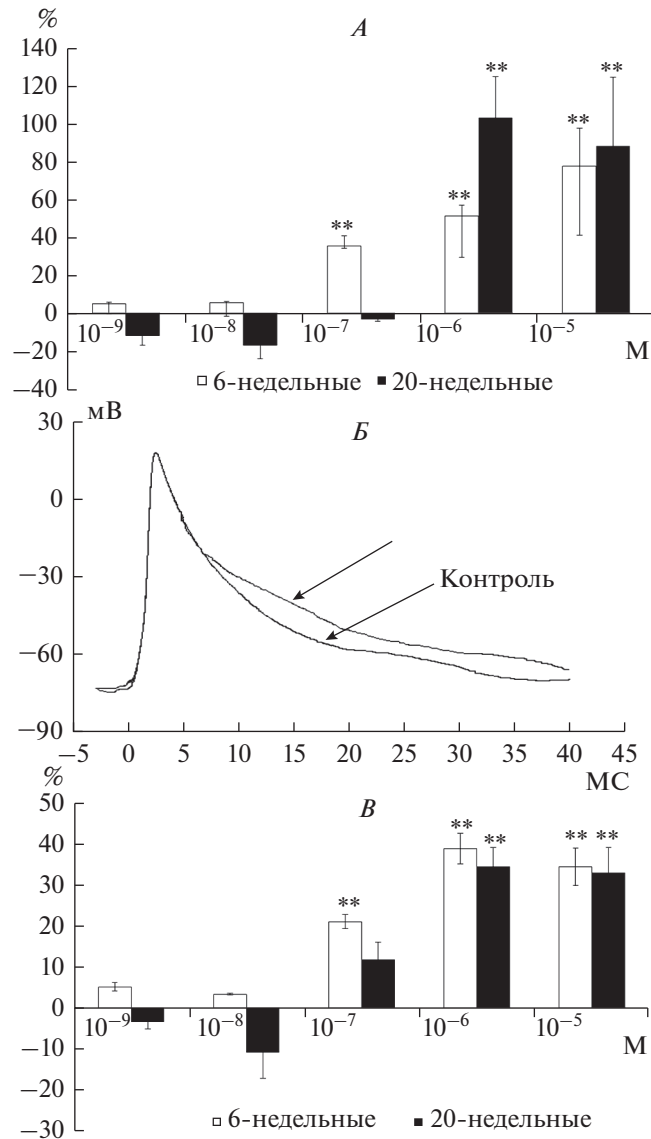


Рис. 4. А. Дозозависимое влияние ZD7288 на дпд50% в предсердном миокарде 6- и 20-недельных крыс. Ось ординат – максимальное изменение потенциалов действия (ПД), вызванное ZD7288 (в %), от значений длительности в контроле. Различие с контролем: ** $p < 0.01$.

Б. Примеры записей ПД в препарате правого предсердия крысы в контроле и после применения ZD7288 10^{-5} М.

В. Дозозависимое влияние ZD7288 на дпд90% в предсердном миокарде 6- и 20-недельных крыс. Ось ординат – максимальное изменение дпд90%, вызванное ZD7288 (в %). Различие с контролем: ** $p < 0.01$.

крыс. При добавлении ZD7288 в концентрации 10^{-9} и 10^{-8} М не наблюдалось каких-либо изменений МП и амплитудно-временных параметров ПД предсердных кардиомиоцитов крыс (рис. 4А). Перфузия предсердных кардиомиоцитов крыс ZD7288 в концентрациях 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} М не вызывала достоверных изменений

значений дпд20%, овершута, амплитуды потенциала действия и мембранного потенциала (рис. 4А).

При добавлении ZD7288 в концентрации 10^{-7} М значение дпд50% увеличивалось с 13.9 ± 1.5 до 18.7 ± 2.9 мс ($p < 0.01$), дпд90% с 24.4 ± 1.6 до 29.6 ± 2.4 мс ($p < 0.01$, рис. 4А). Значение общей длины цикла ПД увеличивалось с 176 ± 15 до 188 ± 17 мс ($p < 0.01$). Значение параметра частоты генерации ПД имело тенденцию к снижению с 343 ± 31 до 322 ± 30 ед/мин.

ZD7288 в концентрации 10^{-6} М увеличивал значения параметров ПД дпд50% с 14.0 ± 1.3 до 21.3 ± 2.4 мс ($p < 0.01$), дпд90% с 23.1 ± 1.9 до 32.1 ± 3.1 мс ($p < 0.01$, рис. 4А). Исходное значение общей длины цикла ПД составляло 172 ± 12 мс. К 7-й мин эксперимента наблюдалось максимальное увеличение значения общей длины цикла ПД до 185 ± 18 мс ($p < 0.01$). Максимальное снижение значения частоты генерации ПД наблюдали на 20-й мин эксперимента с 351 ± 24 до 326 ± 29 ед/мин ($p < 0.01$).

При добавлении блокатора I_f в концентрации 10^{-5} М на 15-й мин эксперимента значение дпд50% увеличивалось с 11 ± 3 до 19 ± 5 мс ($p < 0.01$), значение дпд90% с 25 ± 6 до 34 ± 7 мс ($p < 0.01$, рис. 4А, Б). Значение параметра общей длины цикла ПД увеличивалось с 190 ± 19 мс до 206 ± 19 мс ($p < 0.01$). Значение частоты генерации ПД снижалось с 319 ± 32 до 281 ± 36 ед/мин ($p \leq 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для проводящей системы сердца особая роль HCN-каналов была отмечена давно. В синусно-предсердном узле, HCN-каналы способствуют медленной диастолической деполяризации и генерации спонтанной импульсации [27]. I_f обеспечивают генерацию спонтанной активности, и участвуют в учащении работы сердца при симпатических воздействиях. Экспериментально было показано, что I_f является важным эффектором вегетативной регуляции работы сердца. Исследования на изолированных клетках показали, что адренергическая и холинергическая модуляция электрической активности одиночной клетки увеличивает либо уменьшает I_f во время диастолы [20]. Гормоны и медиаторы, повышающие уровень цАМФ, облегчают активацию I_f , во-первых, сдвигая значения порога его активации к более положительным значениям, а во-вторых, ускоряя кинетику открытия канала [28]. Таким образом, регуляция интенсивности I_f путем изменения концентрации цАМФ позволяет осуществлять нейрогуморальный контроль динамики мембранного потенциала. Многие современные исследователи связывают возрастные изменения деятельности сердца человека и животных именно с перестройкой мембранных структур в клетках сердца. Известно, что в организме млекопитающих и человека с возрастом происходит изменение активности симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы. Показано, что парасимпатическая иннервация формируется к моменту рождения. Симпатическая иннервация у крыс формируется позже, с третьей по шестую неделю постнатального онтогенеза [22]. Именно поэтому, возраст 6 недель у крыс представляет интерес, поскольку на данном этапе развития организма наблюдаются значительные изменения в работе сердца. Показано, что в данном возрасте завершается развитие симпатической иннервации сердца [22]. Изучаемый возраст характеризуется минимальной ЧСС [26]. Таким образом, исследование роли I_f в регуляции функции сердца 6-недельных крыс представляет особый интерес при изучении регуляции сердечной деятельности на протяжении постнатального онтогенеза, поскольку данные токи определяют частоту сокращений сердца, в связи с чем они получили пейсмекерные токи. Их зависимость от активности симпатического отдела вегетативной нервной системы (ВНС) делает исследование регуляции сердца крыс в этом возрасте особенно актуальными.

Проведенные нами эксперименты на изолированном сердце выявили, что блокада I_f приводила к существенной брадикардии, что говорит о несомненной роли данных токов в регуляции хронотропии сердца 6-недельных крыс. У взрослых животных при блокаде I_f также наблюдалась брадикардия, но она была менее выраженной, чем у 6-недельных крыс (рис. 2), что, возможно, свидетельствует о более высокой плотности HCN каналов у животных, находящихся на этапе завершения формирования симпатической иннервации сердца [13].

Блокада I_f уменьшает коронарный проток 6-недельных животных. При воздействии ZD7288 у взрослых животных коронарный проток также уменьшался (рис. 3) [13]. Можно предположить, что HCN-каналы присутствуют и в гладкомышечных клетках сосудов, модулируют коронарное кровоснабжение на разных этапах постнатального онтогенеза [13].

HCN-каналы обнаружены в различных отделах сердца, в том числе и в рабочих кардиомиоцитах [29, 30]. Блокада I_f изолированного сердца 6-недельных крыс приводила к разнонаправленным изменениям инотропии – увеличению ДРЛЖ в минимальной концентрации блокатора (10^{-9} М), и уменьшению во всех остальных концентрациях. Такие же разнонаправленные изменения ДРЛЖ наблюдаются и в группе взрослых животных, с сформированной иннервацией сердца [13]. Однако следует отметить, что положительный инотропный эффект больше выражен у взрослых крыс, а достоверное снижение силы сокращения сердца было показано только у 6-недельных крыс (рис. 1А). Полученные результаты свидетельствуют об участии I_f в регуляции сократимости изолированного сердца 6-недельных крыс.

Функциональное значение I_f в рабочих кардиомиоцитах, которые обладают стабильным мембранным потенциалом покоя, не понятно. Поскольку рабочие кардиомиоциты не генерируют спонтанные ПД, роль в них I_f не совпадает с классической пейсмекерной функцией в клетках синоатриального узла. Возможно, I_f участвует в формировании ПД рабочих кардиомиоцитов [30].

Полученные нами результаты показали, что блокада I_f препаратом ZD7288 в концентрациях 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} М увеличивала длительность реполяризации на уровне дпд50%, дпд90% и общую длительность цикла, уменьшала частоту генерации ПД предсердных кардиомиоцитов 6-ти недельных крыс. Две минимальные концентрации ZD7288 (10^{-9} М, 10^{-8} М) не оказывали существенного влияния на длительность реполяризации. Следует отметить, что у взрослых животных длительность реполяризации на уровне дпд50%, дпд90% увеличивалась лишь при двух высоких концентрациях (10^{-6} М, 10^{-5} М) [31], что, возможно, свидетельствует о более высокой плотности I_f у 6-недельных крыс (рис. 4В).

Таким образом, полученные результаты показали, что блокада токов, активируемых гиперполяризацией влияет как на частоту, так и на силу сердечных сокращений, а также кровоснабжение изолированного по Лангендорфу сердца 6-недельных крыс. Однако сердце, находящееся на этапе завершения формирования адренергической иннервации, возможно имеет более высокую плотность данных токов, чем сердце взрослых крыс, что проявляется в более выраженной ответной реакции на блокаду I_f . Если механизмы, влияющие на ЧСС при блокаде I_f известны, то функциональная роль данных токов в регуляции сокращений сердца вызывает вопросы. В наших экспериментах показано, что изменение сократимости сердца может происходить, вероятно, вследствие изменения длительности фазы реполяризации рабочих кардиомиоцитов. Выявление детальных механизмов регуляции сократимости сердца при участии данных токов требует дальнейших исследований.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа подготовлена в соответствии с Российской государственной программой повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета, при поддержке РФФИ № 17-04-00071, РФФИ и Правительства Республики Татарстан № 18-44-160022.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Santoro B., Liu D.T., Yao H., Bartsch D., Kandel E.R. Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell*. 93: 717–729. 1998.
2. Christoffels V.M., Smits G.J., Kispert A., Moorman A.F.M. Development of the Pacemaker Tissues of the Heart. *Circ. Res.* 106(2): 240–254. 2010.
3. Qu, J., Cohen I.S., Robinson R.B. Sympathetic innervation alters activation of pacemaker current (I_f) in rat ventricles. *J. Physiol.* 526: 561–569. 2000.
4. Protas L., Barbuti A., Qu J., Rybin V.O., Palmiter R.D., Steinberg S.F. Neuropeptide Y is an essential in vivo developmental regulator of cardiac I_{Ca,L}. *Circ. Res.* 93: 972–979. 2003.
5. DiFrancesco D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu. Rev. Physiol.* 55: 455–472. 1993.
6. Sartiani L., Mannaioni G., Masi A., Romanelli M.N., Cerbai E. The Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels: from Biophysics to Pharmacology of a Unique Family of Ion Channels. *Pharmacol. Rev.* 69: 354–395. 2017.
7. DiFrancesco D. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ. Res.* 106(3): 434–446. 2010.
8. Romanelli M.N., Sartiani L., Masi A., Mannaioni G., Manetti D., Mugelli A., Cerbai E. HCN Channels Modulators: The Need for Selectivity. *Curr. Top. Med. Chem.* 16: 1764–1791. 2016.
9. Bucchi A., Barbuti A., DiFrancesco D., Baruscotti M. Funny Current and Cardiac rhythm: Insights from HCN Knockout and Transgenic Mouse Models. *Front. Physiol.* 2: 3–240. 2012.
10. Stillitano F., Lonardo G., Zicha S., Varro A., Cerbai E., Mugelli A., and Nattel S. Molecular basis of funny current (I_f) in normal and failing human heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 45: 289–299. 2008.
11. Herrmann S., Layh B., Ludwig A. Novel insights in to the distribution of cardiac HCN channels: An expression study in the mouse heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51: 997–1006. 2011.
12. Zefirov T.L., Ziyatdinova N.I., Zefirov A.L. Effects of blockade of hyperpolarization-activated ion currents (I_h) on autonomic control of the heart in rats: Age-related peculiarities. *Neurophysiology.* 35(6): 415–421. 2003.
13. Ziyatdinova N., Kuptsova A., Sungatullina M., Galieva A., Zefirov T. Comparative analysis of the influence of I_f blockade on newborn and adult rats Langendorf-isolated heart. *Eur. J. Clin. Inv.* 49: 144. 2019.
14. Zefirov T.L., Faskhutdinov L.I., Zefirov A.L., Ziyatdinova N.I. The influence of I_f inhibition on the myocardium electrical activity. *Eur. J. Clin. Inv.* 48(1): 139–140. 2018.
15. Zefirov T.L., Gibina A.E., Sergejeva A.M., Ziyatdinova N.I., Zefirov A.L. Age-Related Peculiarities of Contractile Activity of Rat Myocardium during Blockade of Hyperpolarization-Activated Currents. *Bull. Exp. Biol. Med.* 144(3): 273–275. 2007.
16. Robinson R.B., Yu H., Chang F., Cohen I.S. Developmental change in the voltage dependence of the pacemaker current, I_f, in rat ventricle cells. *Pflugers Arch.* 433(4): 533–535. 1997.
17. Yasui K., Liu W., Opthof T., Kada K., Lee J.K., Kamiya K. I(f) current and spontaneous activity in mouse embryonic ventricular myocytes. *Circ Res Mar.* 88(5): 536–542. 2001.
18. Chen Y.J., Chen S.A., Chen Y.C., Yeh H.I., Chan P., Chang M.S. *et al.* Effects of rapid atrial pacing on the arrhythmogenic activity of single cardiomyocytes from pulmonary veins: Implication in initiation of atrial fibrillation. *Circulation.* 104(23): 2849–2854. 2001.
19. Zefirov T.L., Svyatova N.V., Ziyatdinova N.I. A New Insight into Mechanisms of Age-Related Changes in Heart Rate. *Bull. Exp. Biol. Med.* 131: 518–522. 2001.
20. Bucchi A., Baruscotti M., Robinson R.B., DiFrancesco D. Modulation of rate by autonomic agonists in SAN cells involves changes in diastolic depolarization and the pacemaker current. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 43: 39–48. 2007.
21. Ziyatdinova N.I., Zefirov A.L., Sitdikov F.G., Zefirov T.L. Autonomic control of cardiac function involves modulation of hyperpolarization activated channels in vitro. *Russ. J. Physiol.* 89(2): 154–160. 2003.
22. Robinson R.B. Autonomic receptor–effector coupling during postnatal development. *Cardiovasc. Res.* 31: 68–76. 1996.
23. Taylor I.M. The development of innervation in the rat atrioventricular node. *Cell Tissue Res.* 178(1): 73–82. 1977.
24. Nyquist-Battie C., Cochran P.K., Sands S.A., Chronwall B.M. Development of neuropeptide Y and tyrosine hydroxylase immunoreactive innervation in postnatal rat heart. *Peptides.* 15: 1461–1469. 1994.
25. Masliukov P.M., Moiseev K., Emanuilov A.I., Anikina T.A., Zverev A.A., Nozdrachev A.D. Development of neuropeptide Y-mediated heart innervation in rats. *Neuropeptides.* 55: 47–54. 2016.
26. Zefirov T.L., Svyatova N.V., Ziyatdinova N.I. Regulation of Cardiac Function in Prepubertal Rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 129(6): 611–613. 2000.

27. Lakatta E.G., DiFrancesco D. What keeps us ticking: A funny current, a calcium clock, or both? *J. Mol. Cell Cardiol.* 47: 157–170. 2009.
28. DiFrancesco D., Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature.* 351: 145–147. 1991.
29. Cerbai E., Mugelli A. I_f in non-pacemaker cells: Role and pharmacological implications. *Pharmacol. Res.* 53: 416–423. 2006.
30. Fenske S., Mader R., Scharf A. et al. HCN3 contributes to the ventricular action potential waveform in the murine heart. *Circ. Res.* 109: 1015–1023. 2011.
31. Abramochkin D.V., Faskhutdinov L.I., Filatova T.S., Ziyatdinova N.I. Changes in electrical activity of working myocardium under condition of I_f current inhibition. *Bull. Exp. Biol. Med.* 158(5): 600–603. 2015.

The Effect of the Pacemaker Current Blockade on the Rat Heart during the Formation of the Adrenergic Innervation

A. M. Kuptsova^a, N. I. Ziyatdinova^a, T. L. Zefirov^{a, *}

^aKazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

*e-mail: zefirovtl@mail.ru

Hyperpolarization-activated currents (I_f) contribute to the generation of spontaneous electrical activity in the heart. I_f are modulated by the cAMP level, sympathetic, and parasympathetic parts of the autonomic nervous system. The innervation development is an important factor in the formation of the ionic current orchestra in the cardiomyocytes. The age of 6 weeks in rats poses a particular interest, because at that point the heart rate is at its slowest, and the adrenergic innervation completes its development. The aim of this study was to investigate the role of I_f current in the myocardial function regulation at one of the stages of sympathetic heart innervation development. The analysis of the results revealed that in the experiments on Langendorf-isolated heart the application of I_f blocker ZD7288 in 10^{-9} – 10^{-5} M concentrations to rats of this age led to a decrease in the heart rate. ZD7288 in 10^{-8} – 10^{-5} M concentrations reduced the left ventricular pressure and the coronary flow of the isolated heart in 6-week old rats. The perfusion of the isolated heart with I_f blocker in 10^{-9} M concentration increased the left ventricular pressure, but did not affect the coronary flow. In the studies of the atrial cardiomyocyte electrical activity, ZD7288 (10^{-7} – 10^{-5} M) increased the action potential duration at the 50% and 90% repolarization level, and reduced the action potential generation frequency. Together, these results show that the I_f blockade affects the heart rate, heart contraction force, and coronary flow of the isolated heart of 6-week old rats. Apparently, the heart at the stage of completion of the adrenergic innervation development has a higher density of these currents than in adult rats, which manifests in a more pronounced response to the I_f blockade. The changes in the heart contraction force can be attributed to the changes in the repolarization phase duration of the working cardiomyocytes.

Keywords: HCN channel, isolated heart, heart rate, coronary flow, action potential, duration of the action potential

ЦИТИРОВАТЬ:

Купцова А.М., Зиятдинова Н.И., Зефирова Т.Л. Влияние блокады пейсмекерных токов на сердце крыс при формировании адренергической иннервации. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 105(10): 1294–1304.

DOI: 10.1134/S0869813919100042

TO CITE THIS ARTICLE:

Kuptsova A.M., Ziyatdinova N.I., Zefirov T.L. The Effect of the Pacemaker Current Blockade on the Rat Heart during the Formation of the Adrenergic Innervation. *Russian Journal of Physiology.* 105(10): 1294–1304.

DOI: 10.1134/S0869813919100042