

УДК 617.12

ВЛИЯНИЕ HCN-КАНАЛОВ НА РАБОТУ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА ВЗРОСЛЫХ КРЫС

*А.М. Купцова, Н.И. Зиятдинова, Л.И. Фасхутдинов,
Р.Г. Биктемирова, Т.Л. Зефирова*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Аннотация

Токи, активируемые при гиперполяризации (If), привлекают исследователей, изучающих пейсмекерную активность клеток сердца. If является входящим, неселективным током, переносимым ионами Na^+ и K^+ , активируемый гиперполяризацией мембраны. Активность If зависит от концентрации цАМФ. В атипичных кардиомиоцитах If участвует в генерации спонтанной электрической активности и регулируют сердечный ритм. В рабочих кардиомиоцитах функциональное значение If до конца непонятно. Исследование направлено на выявление участия токов, активируемых при гиперполяризации на давление, развиваемое левым желудочком, частоту сердечных сокращений и коронарный проток изолированного сердца взрослых крыс. Выявлено, что блокатор If изменял хронотропию, инотропию и кровоснабжение изолированного сердца. Давление, развиваемое левым желудочком, увеличивалось при блокаде If в концентрации 10^{-9} М и уменьшалось при концентрации ZD7288, равной $3 \cdot 10^{-5}$ М. Блокатор ZD7288 приводил к брадикардии изолированного сердца в концентрациях 10^{-9} , 10^{-6} , $3 \cdot 10^{-5}$ М. Коронарный проток изолированного сердца уменьшался при блокаде If в концентрации 10^{-9} и $3 \cdot 10^{-5}$ М.

Ключевые слова: изолированное сердце; давление, развиваемое левым желудочком; частота сердечных сокращений; коронарный проток; токи, активируемые при гиперполяризации

Введение

Автоматия – важная функция сердца, необходимая для жизнедеятельности организма. Бесспорно, что механизмы, участвующие в спонтанной активности клеток сердца привлекают внимание исследователей много десятилетий. Пейсмекерная активность сердца связана с входящим током, активируемым при гиперполяризации (If – от англ. *funny*) [1]. Впервые If и ионные каналы, обеспечивающие данный ток, были описаны в клетках синусно-предсердного узла в начале 80-х годов XX в. [2, 3]. Токи активируются гиперполяризацией мембраны, являются входящими, неселективными катионными токами, переносимыми ионами Na^+ и K^+ [1]. Связывание с цАМФ приводит к ускорению активации If [2]. В связи с особенностями механизмов их активации, ионные каналы были названы циклическими нуклеотид-зависимыми каналами, активируемыми гиперполяризацией (*Hyperpolarization-activated cyclicnucleotide-gatedchannels*, или сокращенно HCN-каналы) [4–6]. Активация If приводит к деполяризации клеточной

мембраны, обеспечивая линейную фазу медленной диастолической деполяризации.

Структура и экспрессия HCN-каналов изучались у нескольких видов животных. У исследуемых животных было выявлено четыре типа HCN-каналов (HCN1–4) [2, 7, 8]. HCN-каналы широко распространены в центральной и периферической нервной системах [9, 10]. В центральной нервной системе (ЦНС) HCN1 высоко экспрессируются в неокортексе, гиппокампе, мозжечковой коре и спинном мозге. HCN2 почти повсеместно распространен в ЦНС, но больше всего наблюдается в таламических ядрах. Напротив, HCN4 распространены в ограниченных областях – обонятельной луковице и таламусе. HCN3-каналы расположены по всему мозгу в небольшом количестве [11].

В сердце млекопитающих также обнаружены все четыре изоформы HCN-каналов, которые по-разному выражены в отделах сердца [8]. Максимальное количество каналов располагается в области синоатриального узла и в отделах проводящей системы сердца. Имеются данные о том, что наличие различных изоформ HCN-каналов может варьироваться и у разных видов животных. HCN4 являются основной изоформой каналов в синоатриальном узле и других отделах проводящей системы сердца у людей, кроликов, мышей и собак [2]. На более низком уровне показано наличие изоформ HCN1 у кроликов и HCN2 у людей и мышей [12, 13]. HCN3-каналы в клетках синоатриального узла отсутствуют [14]. В современной литературе встречаются исследования о наличии HCN4-, HCN3- и HCN1-каналов в рабочих кардиомиоцитах [14, 15].

В периферической нервной системе представлены все четыре HCN-канала. Исследователями показана экспрессия HCN-каналов в почках, поджелудочной железе и мочевом пузыре [16]. Однако вне нервной и сердечной тканей физиологическая функция HCN-каналов не изучена.

В современной литературе имеется большое количество данных о физиологической роли HCN-каналов в нервных клетках [17]. В атипичных кардиомиоцитах HCN-каналы генерируют спонтанную электрическую активность [18]. Физиологическая роль HCN-каналов в рабочем миокарде по-прежнему остается предметом постоянного исследования. Показана экспрессия четырех подтипов HCN-каналов в кардиомиоцитах желудочков [19]. Поскольку рабочие кардиомиоциты обладают стабильным потенциалом покоя мембраны и не способны к спонтанной электрической активности, функциональное значение данных каналов остается неясным. Возможно, If участвуют в формировании потенциала действия (ПД) рабочих кардиомиоцитов, а следовательно, и в регуляции инотропной функции сердца.

Показано, что блокада If в экспериментах *in vivo* вызывает урежение частоты сердечных сокращений сердца взрослых крыс [20, 21]. В экспериментах *in vitro* блокада токов, активируемых гиперполяризацией препаратом ZD7288, увеличивает силу сокращения изолированных полосок миокарда правого предсердия и правого желудочка взрослых животных [22]. Зарегистрировано изменение электрической активности рабочих желудочковых кардиомиоцитов – удлинение ПД на уровне 50%-ной и 90%-ной реполяризации [23].

Цель настоящего исследования – изучение влияния токов, активируемых гиперполяризацией, на показатели работы изолированного по Лангендорфу сердца взрослых крыс.

1. Материалы и методы

Эксперименты *ex vivo* проводились на белых беспородных крысах 20-недельного возраста [24]. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, одобренными Локальным этическим комитетом Казанского федерального университета (приказ № 0.1.1.6706/101/14 от 12 июня 2014 г.).

Общее количество крыс 50, при исследовании различных концентраций блокатора эксперименты проводились на следующем количестве животных: 10^{-9} Моль – $n = 7$; 10^{-8} Моль – $n = 7$; 10^{-7} Моль – $n = 7$; 10^{-6} Моль – $n = 8$; $3 \cdot 10^{-6}$ Моль – $n = 7$; 10^{-5} Моль – $n = 7$; $3 \cdot 10^{-5}$ Моль – $n = 7$.

В качестве наркоза использовали 25%-ный раствор уретана, который вводился внутривентриально в дозе 800 мг/кг [25]. Наркотизированную крысу фиксировали на операционном столе и вскрывали грудную клетку. Сердце быстро извлекали и для полной остановки сократительной активности помещали в холодный раствор (0–2 °С) Кребса – Хензелейта (NaCl – 118.0 мМ, KCl – 4.7 мМ, NaHCO₃ – 25.0 мМ, MgSO₄ – 1.2 мМ, CaCl₂ – 2.5 мМ, KH₂PO₄ – 1.2 мМ, глюкоза – 5.5 мМ, pH 7.3–7.4). Затем изолированное сердце фиксировали за аорту на канюле и подавали оксигенированный (95% O₂, 5% CO₂) рабочий раствор на установке Лангендорфа (ADInstruments, Австралия) при температуре 37 °С. Осуществлялась гравитационная ретроградная перфузия под постоянным гидростатическим давлением 60–65 мм рт. ст. Для регистрации 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 MLT844 (ADInstruments, Австралия). По кривой подсчитывали частоту сердечных сокращений в уд./мин (ЧСС), давление, развиваемое левым желудочком в мм рт. ст. (ДРЛЖ), и коронарный проток в мл/мин (КП). Запись регистрировали на установке PowerLab 8/35 (ADInstruments, Австралия) при помощи программы LabChartPro (Австралия). В экспериментах использовали препарат ZD7288 (Sigma), блокирующий If, в концентрациях 10^{-9} – $3 \cdot 10^{-5}$ М. Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи *t*-критерия Стьюдента.

2. Результаты и их обсуждение

Введение блокатора If в перфузируемый раствор в концентрации 10^{-9} М приводило к плавному увеличению давления, развиваемого левым желудочком с 13.5 ± 3.5 до 19.9 ± 5.1 мм рт. ст. ($p < 0.05$), то есть оно увеличивалось на 47% (рис. 1). ЧСС изолированного сердца после добавления в рабочий раствор блокатора ZD7288 уменьшалась с 171.7 ± 21.9 до 128.2 ± 9.9 уд./мин ($p < 0.05$) (рис. 2). Урежение составило 25% от исходного значения. Коронарный проток изолированного сердца после введения блокатора уменьшался с 9.7 ± 0.12 до 7.9 ± 0.13 мл/мин ($p < 0.001$) (рис. 3). Максимальное увеличение КП составило 20%.

При добавлении в перфузируемый раствор блокатора ZD7288 в концентрации 10^{-8} М ДРЛЖ несколько возрастало с 22.7 ± 3.9 до 25.2 ± 3.8 мм рт. ст., изменение составило 11% от исходного значения. ЧСС при добавлении блокатора в данной концентрации не изменялось. Блокатор If (10^{-8} М) увеличивал коронарный

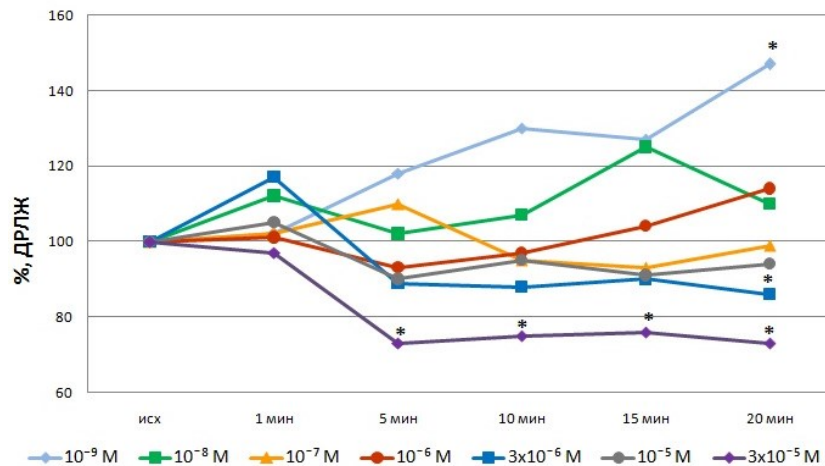


Рис. 1. Динамика изменения давления, развиваемого левым желудочком изолированного сердца взрослых крыс после блокады If. Ось ординат – давление развиваемое левым желудочком (ДРЛЖ, %), ось абсцисс – время записи эксперимента (минуты). Примечание: * – достоверность по сравнению с исходными значениями: $p < 0.05$

проток изолированного сердца с 7.25 ± 0.1 до 8.48 ± 0.17 мл/мин, изменение составило 17%. Добавление ZD7288 в концентрации 10^{-7} M не приводило к достоверным изменениям ДРЛЖ, ЧСС и КП.

Перфузия изолированного сердца блокатором ZD7288 в концентрации 10^{-6} M недостоверно увеличивала ДРЛЖ с 37.7 ± 17.0 до 42.8 ± 6.2 мм рт. ст., увеличение составило 13.7%. Максимальное уменьшение ЧСС наблюдали на 17-й минуте эксперимента с 152.8 ± 14.2 до 119 ± 17.2 уд./мин ($p < 0.05$), урежение составило 22% (рис. 2). При этом значения коронарного протока изолированного сердца практически не изменялись.

Давление, развиваемое левым желудочком, при добавлении в перфузируемый раствор блокатора If ZD7288 в концентрации $3 \cdot 10^{-6}$ M увеличивалось с 33.8 ± 6.1 до 39.7 ± 7.4 мм рт. ст. на 1-й минуте эксперимента, это увеличение составило 17.5%. К 20-й минуте наблюдения ДРЛЖ постепенно уменьшалось до 29.2 ± 7.2 мм рт. ст. ($p < 0.05$), это изменение составило 13.5% от исходного значения (рис. 2). Частота сердцебиений уменьшалась с 127.5 ± 17.3 до 121.5 ± 18.2 уд./мин к заключительной минуте эксперимента. Брадикардия составила 5%. Коронарный проток изолированного сердца при введении в рабочий раствор блокатора в данной концентрации незначительно уменьшался с 7.82 ± 0.16 до 7.62 ± 0.16 мл/мин.

При добавлении в рабочий раствор блокатора ZD7288 в концентрации 10^{-5} M ДРЛЖ уменьшалось с 36.7 ± 6.6 до 34.4 ± 5.9 мм рт. ст. Изменение составило 6%. На 20-й минуте эксперимента наблюдалось урежение ЧСС на 18%, с 142 ± 17.2 до 117.1 ± 15.4 уд./мин. Коронарный проток изолированного сердца уменьшался с 8.9 ± 0.11 до 7.2 ± 0.13 мл/мин, данное изменение составило 20%.

При добавлении максимальной концентрации $3 \cdot 10^{-5}$ M блокатора гиперполяризационных токов ДРЛЖ уменьшалось с 49.9 ± 8.9 до 36.7 ± 7.2 мм рт. ст. ($p < 0.05$), уменьшение составило 26% (рис. 1). Максимальное урежение частоты

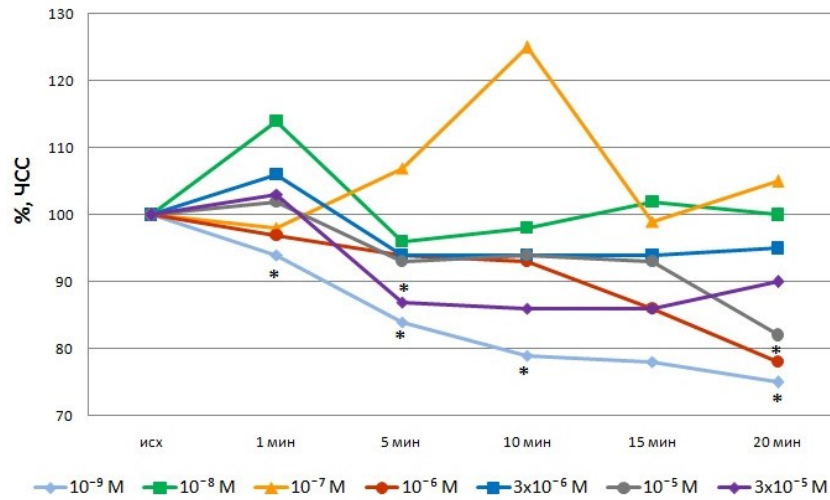


Рис. 2. Динамика изменения частоты сердечных сокращений изолированного сердца взрослых крыс после блокады If. Ось ординат – частота сердечных сокращений (ЧСС, %), ось абсцисс – время записи эксперимента (минуты). Примечание: * – достоверность по сравнению с исходными значениями: $p < 0.05$

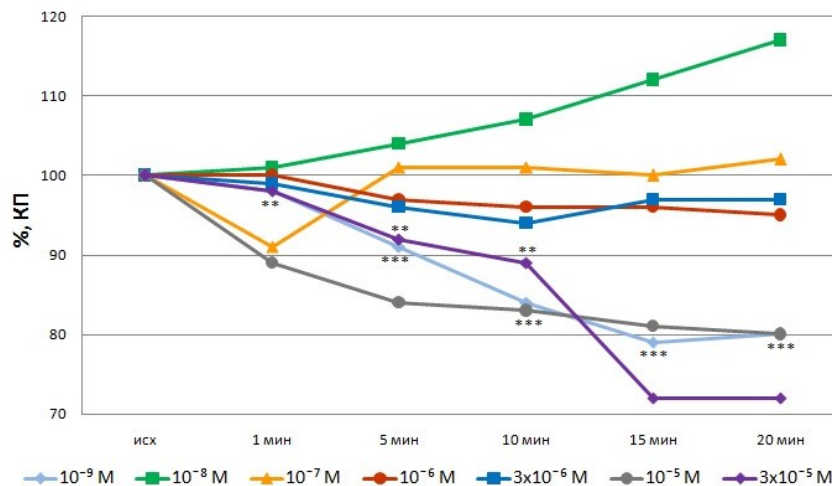


Рис. 3. Динамика изменения коронарного протока изолированного сердца взрослых крыс после блокады If. Ось ординат – коронарный проток (КП, %), ось абсцисс – время записи эксперимента (минуты). Примечание: ** – достоверность по сравнению с исходными значениями: $p < 0.01$; *** – достоверность по сравнению с исходными значениями: $p < 0.001$

сердечных сокращений наблюдали на 11-й минуте эксперимента с 157 ± 27.3 до 123.9 ± 25.5 уд./мин ($p < 0.01$), брадикардия составила 21% от исходного (рис. 2). Коронарный проток при добавлении в перфузируемый раствор блокатора If уменьшался с 9.48 ± 0.11 до 8.23 ± 0.83 мл/мин ($p < 0.01$) (рис. 3), которое составило 13%. Последующее уменьшение коронарного протока было недостоверным.

Заключение

Токи, активируемые гиперполяризацией, играют важную роль в автоматии и регуляции ритма сердца, так как участвуют в генерации потенциала действия в атипичных кардиомиоцитах и поддерживают ритм сердца. Наши исследования с блокадой *I_f* в экспериментах *ex vitro* подтверждают, что данные токи участвуют в регуляции сердечного ритма, урежая частоту сердечных сокращений не только в целостном организме [20, 21], но и в изолированном сердце. Однако важно отметить, что блокада токов, активируемых при гиперполяризации, приводила к изменению давления, развиваемого левым желудочком, то есть влияла на сократительную активность изолированного сердца. Анализируя результаты, полученные на изолированных полосках миокарда предсердий и желудочков [22], параметры электрической активности рабочего миокарда желудочков взрослых животных [23] и результаты на изолированном сердце, мы убедительно показали, что блокада данных токов оказывает влияние на силу сокращения сердечной мышцы. Возможно, данный эффект обусловлен присутствием HCN-каналов в желудочковых кардиомиоцитах [19] и их влиянием на конфигурацию потенциала действия рабочего миокарда [23]. Кроме того, важно отметить, что блокада *I_f* оказывала существенное влияние на показатели коронарного протока, приводя к сужению коронарных сосудов, тем самым снижая кровоснабжение сердца. Известно, что HCN-канал является хорошей мишенью для разработки новых лекарств, ингибирующих сердечный ритм, поскольку он создает спонтанную активность и контролирует частоту сердечных сокращений. Полученные нами экспериментальные данные о влиянии токов, активируемых при гиперполяризации, и на другие свойства сердечной мышцы, а также на тонус коронарных сосудов, требуют особенного подхода при рассмотрении препаратов блокирующих *I_f* при терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

Благодарности. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров, а также при поддержке РФФИ (проекты № 17-04-00071, 18-44-160022).

Литература

1. DiFrancesco D. The role of the funny current in pacemaker activity // *Circ. Res.* – 2010. – V. 106, No 3. – P. 434–446. – doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.208041.
2. Biel M., Wahl-Schott C., Michalakis S., Zong X. Hyperpolarization-activated cation channels: From genes to function // *Physiol. Rev.* – 2009. – V. 89, No 3. – P. 847–885. – doi: 10.1152/physrev.00029.2008.
3. Krieger J., Strobel J., Vogl A., Hanke W., Breer H. Identification of a cyclic nucleotide- and voltage-activated ion channel from insect antennae // *Insect Biochem. Mol. Biol.* – 1999. – V. 29, No 3. – P. 255–267. – doi: 10.1016/S0965-1748(98)00134-9.
4. Altomare C., Bucchi A., Camatini E., Baruscotti M., Viscomi C., Moroni A., DiFrancesco D. Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels // *J. Gen. Physiol.* – 2001. – V. 117, No 6. – P. 519–532. – doi: 10.1085/jgp.117.6.519.

5. *Craven K.B., Zagotta W.N.* CNG and HCN channels: Two peas, one pod // *Annu. Rev. Physiol.* – 2006. – V. 68. – P. 375–401. – doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040104.134728.
6. *DiFrancesco D.* Dual allosteric modulation of pacemaker (f) channels by cAMP and voltage in rabbit SA node // *J. Physiol.* – 1999. – V. 515, Pt. 2. – P. 367–376. – doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.367ac.x.
7. *Barbuti A., Crespi A., Capilupo D., Mazzocchi N., Baruscotti M., DiFrancesco D.* Molecular composition and functional properties of f-channels in murine embryonic stem cell-derived pacemaker cells // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2009. – V. 46, No 3. – P. 343–351. – doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.12.001.
8. *Bucchi A., Barbuti A., DiFrancesco D., Baruscotti M.* Funny current and cardiac rhythm: Insights from HCN knockout and transgenic mouse models // *Front. Physiol.* – 2012. – V. 3. – Art. 240, P. 1–10. – doi: 10.3389/fphys.2012.00240.
9. *Notomi T., Shigemoto R.* Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain // *J. Comp. Neurol.* – 2004. – V. 471, No 3. – P. 241–276. – doi: 10.1002/cne.11039.
10. *Hughes D.I., Boyle K.A., Kinnon C.M., Bilsland C., Quayle J.A., Callister R.J., Graham B.A.* HCN4 subunit expression in fast-spiking interneurons of the rat spinal cord and hippocampus // *Neuroscience.* – 2013. – V. 237. – P. 7–18. – doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.01.028.
11. *Fyk-Kolodziej B., Pourcho R.G.* Differential distribution of hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels in cone bipolar cells of the rat retina // *J. Comp. Neurol.* – 2007. – V. 501, No 6. – P. 891–903. – doi:10.1002/cne.21287.
12. *Wahl-Schott C., Fenske S., Biel M.* HCN channels: New roles in sinoatrial node function // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2014. – V. 15. – P. 83–90. – doi: 10.1016/j.coph.2013.12.005.
13. *Roubille F., Tardif J.-C.* New therapeutic targets in cardiology: Heart failure and arrhythmia: HCN channels // *Circulation.* – 2013. – V. 127, No 19. – P. 1986–1996. – doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000145.
14. *Herrmann S., Layh B., Ludwig A.* Novel insights into the distribution of cardiac HCN channels: An expression study in the mouse heart // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2011. – V. 51, No 6. – P. 997–1006. – doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.09.005.
15. *Fenske S., Krause S., Biel M., Wahl-Schott C.* The role of HCN channels in ventricular repolarization // *Trends Cardiovasc. Med.* – 2011. – V. 21, No 8. – P. 216–220. – doi: 10.1016/j.tcm.2012.05.013.
16. *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.* – 2016. – V. 16, No 16. – P. 1764–1791. – doi: 10.2174/1568026616999160315130832.
17. *He C., Chen F., Li B., Hu Z.* Neurophysiology of HCN channels: From cellular functions to multiple regulations // *Prog. Neurobiol.* – 2014. – V. 112. – P. 1–23. – doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.10.001.
18. *Gao Z., Chen B., Joiner M.-L.A., Wu Y., Guan X., Koval O.M., Chaudhary A.K., Cunha S.R., Mohler P.J., Martins J.B., Song L.-S., Anderson M.E.* I_f and SR Ca^{2+} release both contribute to pacemaker activity in canine sinoatrial node cells // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2010. – V. 49, No 1. – P. 33–40. – doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.03.019.
19. *Schweizer P.A., Yampolsky P., Malik R., Thomas D., Zehelein J., Katus H.A., Koenen M.* Transcription profiling of HCN-channel isoforms throughout mouse cardiac development // *Basic Res. Cardiol.* – 2009. – V. 104. – P. 621–629. – doi: 10.1007/s00395-009-0031-5.
20. *Zefirov T.L., Ziyatdinova N.I., Zefirov A.L.* Effects of blockade of hyperpolarization-activated ion currents (Ih) on autonomic control of the heart in rats: Age-related pecu-

- liarities // *Neurophysiology*. – 2003. – V. 35, No 6. – P. 415–421. – doi: 10.1023/B:NEPH.0000024602.05250.fl.
21. *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.* – 2001. – V. 131, No 6. – P. 518–522. – doi: 10.1023/A:1012329930448.
22. *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.* – 2007. – V. 144, No 3. – P. 273–275. – doi: 10.1007/s10517-007-0308-3.
23. *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.* – 2015. – V. 158, No 5. – P. 600–603. – doi: 10.1007/s10517-015-2815-y.
24. *Robinson R.B.* Autonomic receptor–effector coupling during postnatal development // *Cardiovasc. Res.* – 1996. – V. 31, – P. E68–E76. – doi: 10.1016/0008-6363(95)00151-4.
25. *Смирнов В.М.* Симпатическая нервная система не участвует в развитии ваготомической тахикардии // *Бюл. экспер. биол. и мед.* – 1995. – № 8. – С. 125–128.

Поступила в редакцию
10.07.18

Купцова Анна Михайловна, кандидат биологических наук доцент кафедры охраны здоровья человека

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: anuta0285@mail.ru

Зиятдинова Нафиса Ильгизовна, доктор биологических наук, профессор кафедры охраны здоровья человека

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: nafisaz@mail.ru

Фасхутдинов Ленар Ильсурович, ассистент кафедры охраны здоровья человека

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: f.lenar89@mail.ru

Биктемирова Раиса Габдулловна, доктор медицинских наук, профессор кафедры охраны здоровья человека

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: RGBiktemirova@kpfu.ru

Зефирова Тимур Львович, доктор медицинских наук, профессор кафедры охраны здоровья человека

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: zefirovtl@mail.ru

Influence of HCN Channels on Isolated Heart Functions in Adult Rats

A.M. Kuptsova^{*}, *N.I. Ziyatdinova*^{**}, *L.I. Faskhutdinov*^{***},
R.G. Biktemirova^{****}, *T.L. Zefirov*^{*****}

Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

E-mail: **anuta0285@mail.ru*, ***nafisaz@mail.ru*, ****f.lenar89@mail.ru*,
*****RGBiktemirova@kpfu.ru*, ******zefirovtl@mail.ru*

Received July 10, 2018

Abstract

Heart pacemaking has triggered a research interest for many decades. Hyperpolarization-activated currents (If) and ion channels (HCN channels) that provide this current are widespread in the central and peripheral nervous system. In atypical cardiomyocytes, HCN channels generate a spontaneous electrical activity. The physiological role of HCN channels in the working myocardium remains a subject of constant research. The expression of HCN channels in cardiomyocytes of the ventricles was shown. It is possible that If participates in the formation of the potential action of working cardiomyocytes and, consequently, in the regulation of the inotropic cardiac function. The study was performed in order to investigate the role of hyperpolarization-activated currents on chronotropy, inotropy, and coronary flow of the Langendorff heart in adult rats. Experiments *ex vivo* were performed on random-bred albino rats aged 20 weeks. The heart was perfused in the Langendorff System (ADInstruments). The coronary flow, left ventricular pressure, and heart rate were calculated along the curve. 10^{-9} – $3 \cdot 10^{-5}$ M concentrations range of ZD7288 (Sigma) were used for If blockade.

The analysis of the results demonstrated that the left ventricular pressure increased after the blockade of If at the concentration of 10^{-9} M and decreased with the blocker concentration of $3 \cdot 10^{-5}$ M. The ZD7288 caused bradycardia of the isolated heart at the concentrations of 10^{-9} , 10^{-6} , $3 \cdot 10^{-5}$ M. The isolated heart coronary flow decreased with the blockade of If at the concentration of 10^{-9} M and $3 \cdot 10^{-5}$ M.

It was concluded that If blockade changes chronotropy, inotropy, and coronary flow of the isolated heart in adult rats.

Keywords: isolated heart, left ventricular pressure, heart rate, coronary flow, hyperpolarization activated currents

Acknowledgments. The work is performed according to the Russian Government Program of Competitive Growth of Kazan Federal University and supported by the Russian Foundation for Basic Research (projects nos. 17-04-00071 and 18-44-160022).

Figure Captions

Fig. 1. Left ventricular pressure dynamics of the isolated heart in adult rats after If blockade. *Y*-axis – left ventricular pressure (LVP, %), *X*-axis – experiment recording time (min). Note: * – significance compared with the initial values: $p < 0.05$.

Fig. 2. Isolated heart rate dynamics in adult rats after If blockade. *Y*-axis – heart rate (HR, %), *X*-axis – experiment recording time (min). Note: significance compared with the initial values: $p < 0.05$.

Fig. 3. Coronary flow dynamics of the isolated heart in adult rats after If blockade. *Y*-axis – coronary flow (CF, %), *X*-axis – experiment recording time (min). Note: ** – significance compared with the initial values: $p < 0.01$; *** – significance compared with the initial values: $p < 0.001$.

References

1. DiFrancesco D. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ. Res.*, 2010, vol. 106, no. 3, pp. 434–446. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.208041.
2. Biel M., Wahl-Schott C., Michalakis S., Zong X. Hyperpolarization-activated cation channels: From genes to function. *Physiol. Rev.*, 2009, vol. 89, no. 3, pp. 847–885. doi: 10.1152/physrev.00029.2008.
3. Krieger J., Strobel J., Vogl A., Hanke W., Breer H. Identification of a cyclic nucleotide- and voltage-activated ion channel from insect antennae. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1999, vol. 29, no. 3, pp. 255–267. doi: 10.1016/S0965-1748(98)00134-9.
4. Altomare C., Bucchi A., Camatini E., Baruscotti M., Viscomi C., Moroni A., DiFrancesco D. Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels. *J. Gen. Physiol.*, 2001, vol. 117, no. 6, pp. 519–532. doi: 10.1085/jgp.117.6.519.
5. Craven K.B., Zagotta W.N. CNG and HCN channels: Two peas, one pod. *Annu. Rev. Physiol.*, 2006, vol. 68, pp. 375–401. doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040104.134728.
6. DiFrancesco D. Dual allosteric modulation of pacemaker (f) channels by cAMP and voltage in rabbit SA node. *J. Physiol.*, 1999, vol. 515, pt. 2, pp. 367–376. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.367ac.x.
7. Barbuti A., Crespi A., Capiluppo D., Mazzocchi N., Baruscotti M., DiFrancesco D. Molecular composition and functional properties of f-channels in murine embryonic stem cell-derived pacemaker cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2009, vol. 46, no. 3, pp. 343–351. doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.12.001.
8. Bucchi A., Barbuti A., DiFrancesco D., Baruscotti M. Funny current and cardiac rhythm: Insights from HCN knockout and transgenic mouse models. *Front. Physiol.*, 2012, V. 3, art. 240, pp. 1–10. doi: 10.3389/fphys.2012.00240.
9. Notomi T., Shigemoto R. Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1–4, in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 2004, vol. 471, no. 3, pp. 241–276. doi: 10.1002/cne.11039.
10. Hughes D.I., Boyle K.A., Kinnon C.M., Bilsland C., Quayle J.A., Callister R.J., Graham B.A. HCN4 subunit expression in fast-spiking interneurons of the rat spinal cord and hippocampus. *Neuroscience*, 2013, vol. 237, pp. 7–18. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.01.028.
11. Fyk-Kolodziej B., Pourcho R.G. Differential distribution of hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels in cone bipolar cells of the rat retina. *J. Comp. Neurol.*, 2007, vol. 501, no. 6, pp. 891–903. doi: 10.1002/cne.21287.
12. Wahl-Schott C., Fenske S., Biel M. HCN channels: New roles in sinoatrial node function. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2014, vol. 15, pp. 83–90. doi: 10.1016/j.coph.2013.12.005.
13. Roubille F., Tardif J.-C. New therapeutic targets in cardiology: Heart failure and arrhythmia: HCN channels. *Circulation*, 2013, vol. 127, no. 19, pp. 1986–1996. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000145.
14. 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.*, 2011, vol. 51, no. 6, pp. 997–1006. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.09.005.
15. Fenske S., Krause S., Biel M., Wahl-Schott C. The role of HCN channels in ventricular repolarization. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2011, vol. 21, no. 8, pp. 216–220. doi: 10.1016/j.tcm.2012.05.013.
16. 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.*, 2016, vol. 16, no. 16, pp. 1764–1791. doi: 10.2174 / 1568026616999160315130832.
17. He C., Chen F., Li B., Hu Z. Neurophysiology of HCN channels: From cellular functions to multiple regulations. *Prog. Neurobiol.*, 2014, vol. 112, pp. 1–23. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.10.001.
18. Gao Z., Chen B., Joiner M.-I.A., Wu Y., Guan X., Koval O.M., Chaudhary A.K., Cunha S.R., Mohler P.J., Martins J.B., Song L.-S., Anderson M.E. I_f and SR Ca^{2+} release both contribute to pacemaker activity in canine sinoatrial node cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2010, vol. 49, no. 1, pp. 33–40. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.03.019.
19. Schweizer P.A., Yampolsky P., Malik R., Thomas D., Zehelein J., Katus H.A., Koenen M. Transcription profiling of HCN-channel isoforms throughout mouse cardiac development. *Basic Res. Cardiol.*, 2009, vol. 104, pp. 621–629. doi: 10.1007/s00395-009-0031-5.

20. 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*, 2003, vol. 35, no. 6, pp. 415–421. doi: 10.1023/B:NEPH.0000024602.05250.f1.
21. 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.*, 2001, vol. 131, no. 6, pp. 518–522. doi: 10.1023/A:1012329930448.
22. 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.*, 2007, vol. 144, no. 3, pp. 273–275. doi: 10.1007/s10517-007-0308-3.
23. 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.*, 2015, vol. 158, no. 5, pp. 600–603. doi: 10.1007/s10517-015-2815-y.
24. Robinson R.B. Autonomic receptor–effector coupling during postnatal development. *Cardiovasc. Res.*, 1996, vol. 31, pp. E68–E76. doi: 10.1016/0008-6363(95)00151-4.
25. Smirnov V.M. The sympathetic nervous system is not implicated in the development of vagotomy-induced tachycardia. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 1995, vol. 120, no. 2, pp. 767–770. doi: 10.1007/BF02445948.

⟨ **Для цитирования:** Купцова А.М., Зиятдинова Н.И., Фасхутдинов Л.И., Биктемирова Р.Г., Зефиоров Т.Л. Влияние HCN-каналов на работу изолированного сердца взрослых крыс // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2018. – Т. 160, кн. 4. – С. 568–578. ⟩

⟨ **For citation:** Kuptsova A.M., Ziyatdinova N.I., Faskhutdinov L.I., Biktemirova R.G., Zefirov T.L. Influence of HCN channels on isolated heart functions in adult rats. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2018, vol. 160, no. 4, pp. 568–578. (In Russian) ⟩