

УДК 576.5

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО Ca^{2+} НА ЗАВИСИМОСТЬ «ЧАСТОТА–СИЛА»: ЭФФЕКТ ПОТЕНЦИАЦИИ ПАУЗОЙ В УСЛОВИЯХ ВЫРАЖЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ В МИОКАРДЕ МОРСКОЙ СВИНКИ

© 2021 г. А.С. Аверин, Н.М. Захарова, Д.А. Игнатьев

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: averinas82@gmail.com

Поступила в редакцию 06.09.2021 г.

После доработки 06.09.2021 г.

Принята к публикации 17.09.2021 г.

Исследовано влияние четырехкратного снижения концентрации Ca^{2+} в перфузирующей среде в условиях выраженной гипотермии на сократительные ответы папиллярных мышц правого желудочка морской свинки – зависимости «частота–сила» в интервале частот 0.1–1.0 Гц и эффекта потенциации паузой при частоте стимуляции 0.3 и 0.8 Гц при температуре 20°C. Показано, что при снижении концентрации внеклеточного Ca^{2+} происходило значительное снижение силы сокращения папиллярных мышц от 40 до 70%, достигающее максимума в $72 \pm 3\%$ при частоте 0.4 Гц; при этом сохранялся положительный характер зависимости «частота–сила». Абсолютные значения эффекта потенциации паузой снижались, причем наиболее выражено при более низкой частоте стимуляции ($79 \pm 6\%$ и $40 \pm 19\%$ при 0.3 и 0.8 Гц соответственно). Таким образом, показано, что в условиях выраженной гипотермии в миокарде морской свинки сохраняется преимущественная зависимость сокращения от внеклеточных источников Ca^{2+} , вместе с тем увеличение частоты стимуляции ведет к увеличению содержания Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме.

Ключевые слова: миокард, гипотермия, зависимость «частота–сила», потенциация паузой, морская свинка, внеклеточный Ca^{2+} .

DOI: 10.31857/S0006302921060144

Частота сокращений сердца является одним из важнейших показателей работы миокарда. Помимо этого, показано, что частота сокращений сердца является также важным внутренним регулятором, позволяющим адаптировать производительность сердца согласно потребностям организма. В миокарде большинства млекопитающих ее рост ведет к увеличению силы сокращения (положительный инотропный эффект) [1]. Исключение составляет миокард крыс и мышей, для которых описан двухфазный тип зависимости «частота–сила» (ЧС) [2, 3]. Еще одним важным показателем работы миокарда является эффект потенциации паузой, который может служить не только качественным показателем содержания Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме (СР) [4], но и важным диагностическим признаком [5, 6].

Из данных литературы известно, что при изменении концентрации внеклеточного Ca^{2+} может

происходить изменение характера ЧС [7, 8] и выраженности эффекта потенциации паузой [9].

Помимо трансформации ритмоинотропных эффектов изменение уровня внеклеточного Ca^{2+} оказывает влияние на большое число физиологических параметров в сердце: чувствительность к адренергической стимуляции [10], сократительный ответ миокарда [11] и его пассивные механические свойства [12]. Снижение концентрации Ca^{2+} в перфузирующем растворе может использоваться как дополнительный кардиопротекторный фактор при холодовой кардиоплегии [13–15].

В настоящее время отсутствует полная картина изменений ритмоинотропных характеристик при снижении концентрации внеклеточного Ca^{2+} в миокарде морской свинки в условиях выраженной гипотермии. Данное исследование посвящено исследованию влияния снижения Ca^{2+} до 0.45 мМ в перфузирующей среде в условиях выраженной гипотермии (20°C) на сократитель-

Сокращения: ЧС – зависимость «частота–сила», СР – саркоплазматической ретикулум.

ные ответы папиллярной мышцы правого желудочка морской свинки, а именно зависимости «частота—сила» (диапазон частот стимуляции 0.1–1.0 Гц) и эффекта потенциации паузой при частоте стимуляции 0.3 и 0.8 Гц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на папиллярных мышцах правого желудочка морских свинок. В экспериментах использовали морских свинок породы Агути (самцы массой 200–250 г). Животных содержали в виварии ИБК РАН в стандартных условиях в соответствии с правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев): в проветриваемых помещениях, исключающих возникновение сквозняков и резких перепадов температур. Световой режим составлял 12 ч света и 12 ч темноты, режим кормления — *ad libitum*. Температуру воздуха поддерживали в пределах 18–21°C.

Всех морских свинок, отобранных для эксперимента, доставляли в экспериментальное помещение из вивария не менее чем за час до его начала. Животных предварительно наркотизировали диэтиловым эфиром. Выделенное сердце помещали в раствор Тироде (20°C) следующего состава (в мМ): NaCl — 135, KCl — 4, MgCl_2 — 1, CaCl_2 — 1.8, NaHCO_3 — 13.2, NaH_2PO_4 — 1.8, глюкоза — 11, pH 7.4. Раствор аэрировали газовой смесью, содержащей 95% O_2 + 5% CO_2 . Выделение папиллярных мышц, стимуляцию и измерение амплитуды сокращения в изометрическом режиме проводили по ранее описанной методике [16] при температуре перфузирующего раствора $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Диаметр папиллярных мышц варьировал от 0.6 до 1.0 мм, а длина — от 1.0 до 3.0 мм. Для исследования их механической активности использовали автоматизированную установку на основе персонального компьютера и плат АЦП—ЦАП (L-Card 154 и L-Card E14-440). Механическую активность мышц регистрировали с помощью механотрона 6X-2M. В начале каждого опыта препарат стимулировали прямоугольными импульсами (напряжение 5 В; длительность 5 мс; сила тока, в два раза превышающая пороговую) частотой 0.3 Гц в течение часа для стабилизации силы сокращения.

Зависимость «частота—сила» в изометрическом режиме регистрировали в интервале частот стимуляции от 0.1 до 1.0 Гц. При построении зависимости ЧС величину силы сокращения для каждой из частот стимуляции в исследуемом диапазоне выражали в процентах по отношению к ее величине на частоте стимуляции 0.1 Гц, принимаемой за 100% [17, 18].

Регистрация эффекта паузы. На фоне постоянной стимуляции с заданной частотой, при кото-

рой сила сокращения находится на стабильном уровне (базовое сокращение), вносится пауза в стимуляции, что приводит к потенциации первого после паузы сокращения (тестового). Величину эффекта выражали в процентах по отношению к силе сокращения на базовой частоте стимуляции (0.3 и 0.8 Гц). Данные проверяли на нормальность распределения при помощи теста Шапиро—Уилка. Достоверность полученных результатов оценивали с помощью парного теста Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа (one way ANOVA) (по уровню значимости $p < 0.05$). Данные представлены как средние значения \pm стандартная ошибка среднего. Статистический анализ данных проводили с использованием пакетов статистических программ Microsoft Excel 2019 и GraphPad Prism 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Зависимость «частота—сила». При температуре 20°C в диапазоне 0.1–1.0 Гц снижение уровня Ca^{2+} с 1.8 мМ до 0.45 мМ вызывало значительное (от 40 до 70%) снижение силы сокращения папиллярных мышц, достигающее максимума в $72 \pm 3\%$ при частоте 0.4 Гц (рис. 1). Данный факт еще раз иллюстрирует одну из фундаментальных особенностей миокарда — значительную зависимость силы сокращения от входа внеклеточного Ca^{2+} . Вместе с тем следует отметить, что полученное нами снижение сократимости в миокарде морской свинки было значительно более выражено, чем описано для миокарда крысы [10]. Данное различие может объясняться большим вкладом СР в активацию сокращения в миокарде крысы в условиях гипотермии [19]. В литературе встречаются данные о том, что высокие концентрации Ca^{2+} могут видоизменять характер ЧС, маскируя ее отдельные фазы [7, 8]. Следует отметить, что в нашем случае сохраняется однофазная положительная зависимость ЧС, которая характерна для здорового миокарда большинства млекопитающих [1] и морских свинок, в частности [20]; в том числе, как было показано нами ранее, и в условиях гипотермии [21]. При этом в литературе имеются данные, согласно которым увеличение частоты стимуляции в кардиомиоцитах морской свинки ведет преимущественно к снижению Ca^{2+} -тока [22, 23], однако при исследовании сократительного ответа в условиях блокирования Ca^{2+} -тока L-типа происходит подавление положительной зависимости ЧС [3, 21], что свидетельствует о возрастании роли данного механизма с увеличением частоты стимуляции. Гипотермия также может снижать пиковые значения Ca^{2+} -то-

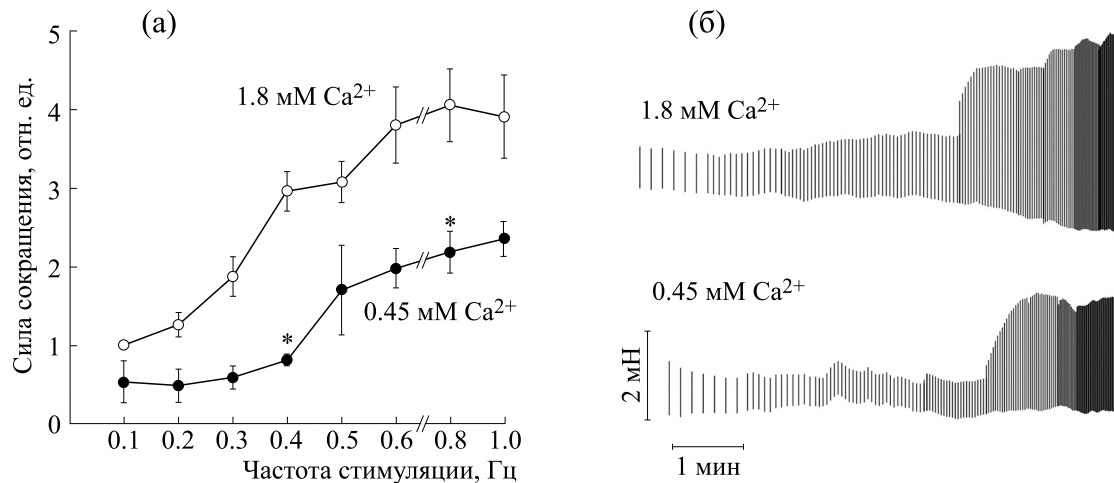


Рис. 1. Влияние концентрации Ca^{2+} в перфузирующем растворе на зависимость «частота–сила» в папиллярных мышцах правого желудочка морской свинки ($n = 5$). (а) – Кривые зависимости силы сокращения от частоты стимуляции. По оси абсцисс – частота стимуляции, Гц; по оси ординат – сила изометрического сокращения по отношению к частоте стимуляции на 0.1 Гц, принимаемая за единицу. Данные представлены как средние значения \pm ошибка среднего (* – достоверное отличие от начальной частоты, $p < 0.05$). (б) – Оригинальные записи сокращений папиллярной мышцы при концентрации Ca^{2+} 1.8 мМ и 0.45 мМ.

ка, однако замедляется его инактивация и общее количество Ca^{2+} , вошедшего в клетку, остается на уровне, близком к исходному [24], что приводит в итоге к росту сократимости в ответ на гипотермию [25, 26], значительную роль в котором играет Ca^{2+} -ток L-типа [19, 27]. Повышение диастолического уровня кальция может само по себе оказывать положительное инотропное действие [28].

Таким образом, снижение уровня Ca^{2+} до 0.45 мМ в условиях гипотермии не вызывает заметных изменений в характере зависимости «частота–сила», и ведущую роль в активации сокращения играют внеклеточные источники Ca^{2+} , что косвенно подтверждается положительным характером ЧС.

Потенциация паузы. В контроле при частоте стимуляции 0.3 Гц эффект потенциации паузой достигал максимума при длительности паузы 15 с и составлял $25 \pm 7\%$, постепенно снижаясь при дальнейшем увеличении длительности паузы и переходя в спад при длительности паузы 60 с (рис. 2). При снижении концентрации Ca^{2+} в перфузирующем растворе происходило значительное снижение как силы базового сокращения на 0.3 Гц, так и сокращения после паузы, которое, как и в контрольных условиях, прогрессивно падало с увеличением продолжительности паузы, достигая минимума при 60 с, при этом уровень

падения составляет 64 ± 11 и $79 \pm 6\%$ при паузах 5 и 60 с соответственно. Выраженность эффекта паузы при этом сама по себе практически не меняется.

При частоте стимуляции 0.8 Гц наблюдалась несколько иная картина: исходно внесение паузы приводило к снижению тестового сокращения относительно базового; при этом снижение содержания Ca^{2+} в растворе до 0.45 мМ приводило к тому, что вместо спада проявлялось потенцирование тестового сокращения. Абсолютная величина тестового сокращения при этом, так же, как и при частоте стимуляции 0.3 Гц, снижалась, однако спад этот был значительно менее выражен и составлял в минимуме от $18 \pm 9\%$ при паузе 10 с до 40 ± 19 при 60 с (рис. 3), ни при одной из исследованных длительностей паузы это снижение не было достоверным. Полученные нами результаты хорошо согласуются с данными литературы, согласно которым содержание Ca^{2+} в СР морской свинки прогрессивно падает с увеличением длительности паузы [29, 30]. Неожиданным представляется тот факт, что при более высокой частоте стимуляции снижение эффекта потенциации менее выражено (рис. 2 и 3), хотя из литературных данных известно что сократимость на более высоких частотах связана преимущественно с внеклеточными источниками Ca^{2+} [3]. Это может объясняться тем, что при низкой частоте сокращений в условиях гипотермии СР со-

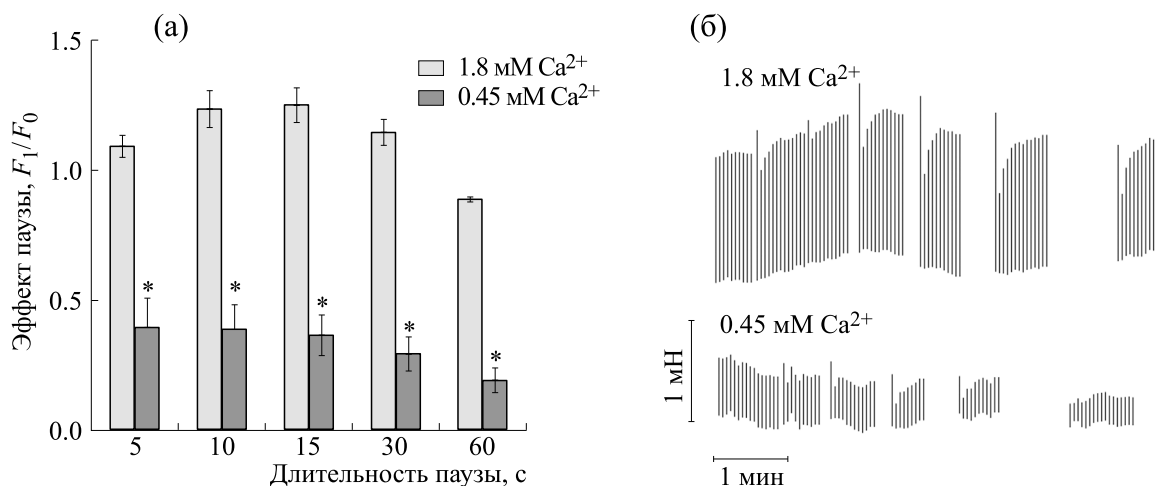


Рис. 2. (а) – Влияние концентрации Ca^{2+} в перфузирующем растворе на эффект паузы при частоте стимуляции 0.3 Гц в папиллярных мышцах правого желудочка морской свинки при 20°C ($n = 5$). По оси абсцисс – длительность паузы; по оси ординат – сила первого после паузы сокращения по отношению к силе сокращений при базовой частоте стимуляции (0.3 Гц), принимаемой за единицу. Данные представлены как средние значения \pm ошибка среднего (* – достоверное отличие от начальной частоты, $p < 0.05$). (б) – Оригинальные записи сокращений папиллярной мышцы.

держит сравнительно небольшое количество Ca^{2+} , и эффект потенциации паузой будет сильно зависеть от входа внеклеточного Ca^{2+} [31]. В то же время повышение частоты стимуляции будет способствовать заполнению СР [30] и снижать зависимость эффекта потенциации паузой от внеклеточного Ca^{2+} , при этом зависимость от внекле-

точного Ca^{2+} проявляется более ярко при больших длительностях паузы, что сходно с литературными данными [32]. Таким образом, в условиях выраженной гипотермии снижение внеклеточной концентрации Ca^{2+} способствует более яркому проявлению эффекта потенциации паузой. Также меньшее влияние на абсолютные показатели первого после внесения паузы сокраще-

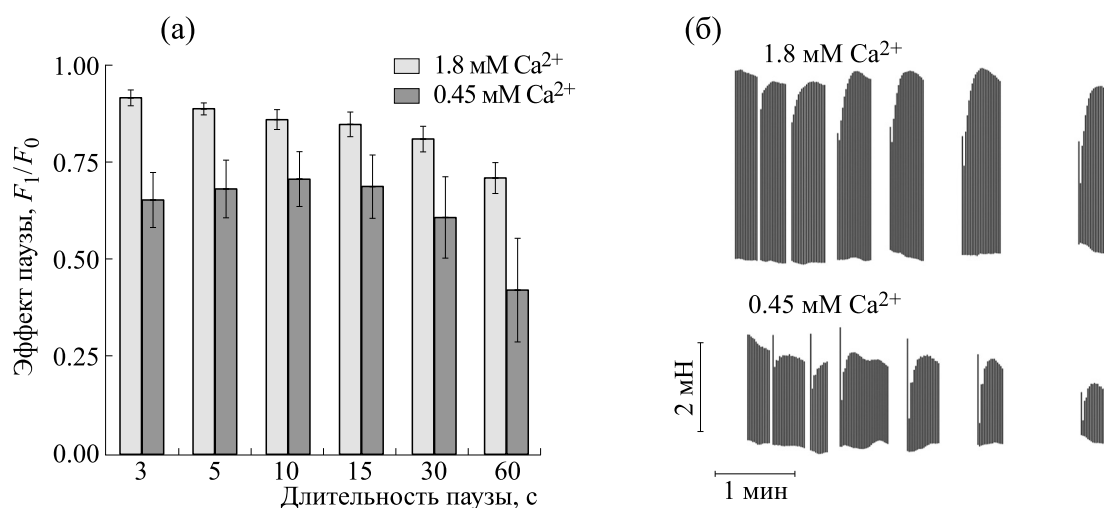


Рис. 3. (а) – Влияние концентрации Ca^{2+} в перфузирующем растворе на эффект паузы при частоте стимуляции 0.8 Гц в папиллярных мышцах правого желудочка морской свинки при 20°C ($n = 5$). По оси абсцисс – длительность паузы; по оси ординат – сила первого после паузы сокращения по отношению к силе сокращений при базовой частоте стимуляции (0.8 Гц), принимаемой за единицу. Данные представлены как средние значения \pm ошибка среднего. (б) – Оригинальные записи сокращений папиллярной мышцы.

ния при частоте стимуляции 0.8 Гц может свидетельствовать о повышении содержания Ca^{2+} в СР при увеличении частоты стимуляции.

ВЫВОДЫ

Впервые было показано, что в условиях выраженной гипотермии (20°C) при снижении концентрации Ca^{2+} в перфузирующем растворе с 1.8 мМ до 0.45 мМ для папиллярных мышц правого желудочка морской свинки характерны следующие закономерности: сохраняется положительная зависимость «частота—сила», что может свидетельствовать о преобладании внеклеточных источников Ca^{2+} в активации сокращения; абсолютное значение эффекта потенциации паузой снижается, причем выраженность этого снижения уменьшается с увеличением частоты стимуляции, что может свидетельствовать о повышении содержания Ca^{2+} в СР с увеличением частоты стимуляции.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по теме Государственного задания «Механизмы криоустойчивости и гипобиоза у животных» (НИОКТР: АААА-А20-120101390069-4).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Опыты проводили с соблюдением правил Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (European Communities Council Directive (86/609)ЕЕС) и в соответствии с требованиями комиссии по этике ИБК РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Endoh, *Eur. J. Pharmacol.* **500**, 73 (2004).
2. Z. Kassiri, R. Myers, R. Kaprielian, et al., *J. Physiol.* **524** (Pt 1), 221 (2000).
3. B. D. Stuyvers, A. D. McCulloch, J. Guo, et al., *J. Physiol.* **544**, 817 (2002).
4. A. Lukas and R. Bose, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **334**, 480 (1986).
5. S. E. Ahlberg, R. C. Hamlen, D. L. Ewert, et al., *Cardiovasc. Eng.* **7**, 32 (2007).
6. W. Schillinger, S. E. Lehnart, J. Prestle, et al., *Basic Res. Cardiol.* **93** (Suppl. 1), 38 (1998).
7. K. Li and J. L. Rouleau, *J. Mol. Cell Cardiol.* **27**, 1251 (1995).
8. A. Redel, W. Baumgartner, K. Golenhofen, et al., *Eur. J. Physiol.* **445**, 297 (2002).
9. J. G. Mill, D. V. Vassallo, and C. M. Leite, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **25**, 399 (1992).
10. D. V. Vassallo, E. Q. Lima, P. Campagnaro, et al., *Pharmacol. Res.* **29**, 251 (1994).
11. E. Holt and G. Christensen, *Am. J. Physiol.* **273**, H573 (1997).
12. R. S. Kirton, A. J. Taberner, P. M. F. Nielsen, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**, H1662 (2005).
13. J. An, A. K. S. Camaraa, Q. Chena, and D. F. Stowea, *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **24** (6), 974 (2003).
14. S. M. Minasian, M. M. Galagudza, Y. V. Dmitriev, et al., *J. Cardiothorac. Surg.* **8**, 60 (2013).
15. L. A. Robinson and D. L. Harwood, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **101**, 314 (1991).
16. O. V. Nakipova, A. S. Averin, E. V. Evdokimovskii, et al., *PLoS One* **12**, e0177469 (2017).
17. O. V. Nakipova, A. S. Averin, L. S. Kosarsky et al., *Biophysics* **64** (5), 786 (2019).
18. N. M. Zakharova, O. V. Nakipova, A. S. Averin, et al., *Dokl. Biol. Sci.* **424**, 21 (2009).
19. M. J. Shattock, D. M. Bers, *Circ. Res.* **61**, 761 (1987).
20. K. Mubagwa, W. Lin, K. Sipido et al., *J. Mol. Cell Cardiol.* **29**, 977 (1997).
21. А. С. Аверин, Н. М. Захарова и С. В. Тарлачков, *Журн. эволюц. биохимии и физиологии* **57** (4), 289 (2021).
22. S. P. Kaspar and D. J. Pelzer, *J. Gen. Physiol.* **106**, 175 (1995).
23. S. E. Bates and A. M. Gurney, *Cardiovasc. Res.* **44**, 381 (1999).
24. J. L. Puglisi, W. Yuan, J. W. Bassani, et al., *Circ. Res.* **85**, e7 (1999).
25. J. C. Herve, K. Yamaoka, V. W. Twist, et al., *Am. J. Physiol.* **263**, R177 (1992).
26. R. H. Shutt and S. E. Howlett, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295**, C692 (2008).
27. S. Q. Wang, Y. H. Huang, K. S. Liu, et al., *Cryobiology* **35**, 193 (1997).
28. R. H. Shutt, G. R. Ferrier, and S. E. Howlett, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291**, H1623 (2006).
29. C. M. Terracciano, R. U. Naqvi, and K. T. MacLeod, *Circ. Res.* **77**, 354 (1995).
30. B. M. Wolska and B. Lewartowski, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **25**, 75 (1993).
31. E. R. Migliaro, M. Michelini, and H. N. Durán, *Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.* **47**, 107 (1997).
32. H. Bjørnstad, P. M. Tande, and H. Refsum, *Acta Physiol. Scand.* **148**, 253 (1993).

Influence of Extracellular Ca^{2+} Concentration on Force-Frequency Relationship and Rest Effect under Conditions of Pronounced Hypothermia in the Myocardium of Guinea Pig

A.S. Averin, N.M. Zakharova, and D.A. Ignatiev

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

The effects of a 4-fold decrease in Ca^{2+} concentration in the perfusing medium during pronounced hypothermia on the contractile responses in right ventricle papillary muscles of the guinea pig were studied. For instance, the force-frequency relationship was analyzed between 0.1 and 1.0 Hz, the rest effect was assessed at stimulation frequencies of 0.3 and 0.8 Hz at 20°C. It was shown that a decrease in the concentration of extracellular Ca^{2+} led to a significant decrease in the force of contraction of the papillary muscles from 40 to 70%, reaching a maximum value of $72 \pm 3\%$ at the frequency of 0.4 Hz, though the force-frequency relationship remained positive. The absolute values of the rest effect were decreased, it was more clearly seen at the lower stimulation frequencies ($79 \pm 6\%$ and $40 \pm 19\%$ at 0.3 and 0.8 Hz, respectively). In summary, the results suggest that during pronounced hypothermia for the guinea pig myocardium, contraction primarily depends on extracellular sources of Ca^{2+} , meanwhile an increase in the stimulation frequency promotes an increase in the content of Ca^{2+} in the sarcoplasmic reticulum.

Keywords: myocardium, hypothermia, force-frequency relationship, rest effect, guinea pig, extracellular Ca^{2+}