

ЭФФЕКТЫ ХЛОРИДА НИКЕЛЯ НА СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ МИОКАРДА АКТИВНЫХ СУСЛИКОВ С РАЗЛИЧНЫМ ОТВЕТОМ НА ГИПОТЕРМИЮ

© 2022 г. А.С. Аверин*, #, Н.М. Захарова*, Д.А. Игнатъев*

*Институт биофизики клетки — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: averinas82@gmail.com

Поступила в редакцию 19.07.2022 г.

После доработки 19.07.2022 г.

Принята к публикации 29.07.2022 г.

Исследовано влияние 1.5 мМ хлорида никеля на силу сокращений, зависимость «частота—сила» и эффект паузы в миокарде активных сусликов *Urociellus undulatus* с разной реакцией на гипотермию. Показано, что при температуре 20°C в группе сусликов, сохраняющих отрицательную направленность зависимости «частота—сила» при охлаждении, сила сокращения составляет $52 \pm 15\%$ и $4 \pm 3\%$ от силы сокращения в контроле при частоте стимуляции 0.1 и 1 Гц соответственно. В миокарде, в котором при охлаждении тип зависимости «частота—сила» менялся с двухфазного на положительный, уменьшение сократимости было значительно более выраженным; происходило практически полное подавление сокращений до $6 \pm 3\%$ и $1 \pm 0.5\%$ для частот стимуляции 0.1 и 1.0 Гц соответственно. В присутствии 1.5 мМ ионов Ni^{2+} при частоте стимуляции 0.3 Гц величина эффекта паузы снижалась в среднем на 45–55% в группе с отрицательной зависимостью «частота—сила», в группе с положительной зависимостью снижение достигало 90–98%. При частоте стимуляции 1.0 Гц уменьшение эффекта паузы в данных группах составляло 45–55% и 65–85% соответственно. Таким образом, миокард сусликов, сохраняющий отрицательную зависимость «частота—сила», существенно менее зависим от поступления внеклеточного Ca^{2+} по сравнению с миокардом активных сусликов, для которого при охлаждении характерен переход к положительной зависимости «частота—сила».

Ключевые слова: миокард, гипотермия, частота-сила, потенциация паузой, Ni^{2+} .

DOI: 10.31857/S0006302922050131, EDN: JJSEXK

Зависимость «частота—сила» впервые описана более ста лет назад, но до сих пор остается в фокусе современных исследований. При этом одна часть работ использует этот показатель как важный диагностический признак, позволяющий судить о физиологическом состоянии миокарда [1–3], а другая стремится раскрыть на зависимости «частота—сила» влияние отдельных механизмов электромеханического сопряжения [4–8]. Как правило, выделяют три основных типа зависимости «частота—сила»: положительная — характерная для здорового миокарда большинства млекопитающих [9], двухфазная — наблюдается у некоторых грызунов (крысы, мыши и др.) [8, 10, 11] и отрицательная — отмечается в патологическом миокарде [2, 7], в миокарде гибернантов и при некоторых физиологических состояниях [12–14].

Сокращения: CP — саркоплазматической ретикулум, LTCC — Ca^{2+} канал L-типа.

Дополнительным источником информации о состоянии миокарда также может служить эффект паузы, который заключается в том, что если на фоне стимуляции с постоянной частотой вносится временной перерыв, то это ведет к потенциации первого после паузы сокращения, при этом сила сокращения будет пропорциональна количеству ионов кальция, выброшенных из саркоплазматического ретикулума (CP) [15]. Анализ эффекта паузы может являться диагностическим признаком в силу того, что внесение паузы в здоровом миокарде вызывает потенциацию сокращения, а в патологическом миокарде приводит к снижению потенциации или ее спаду [7, 16, 17].

Миокард гибернантов представляет большой интерес для исследований в силу своей поразительной устойчивости к действию гипотермии и своей уникальной пластичности. Из литературных данных известно о существенных отличиях между миокардом гибернирующих животных

зимнего сезона и сезона летней активности. В частности, было установлено, что при переходе между сезонами меняется характер зависимости «частота—сила» [11], выраженность эффектов различных инотропных воздействий [18], а также активность Ca^{2+} -каналов L-типа (LTCC) [19]. Ранее в нашей лаборатории было показано, что среди сусликов периода летней активности возможно существование различных видов зависимости «частота—сила» и эффекта паузы [13]. Такое многообразие находит свое дальнейшее отражение в формировании различных типов реакции данных показателей на охлаждение [20]. Механизмы, лежащие в основе наблюдаемых отличий между активными сусликами с различным типом реакции на температуру, остаются еще недостаточно изученными. Известно, что в условиях гипотермии, может значительно изменяться действие блокаторов отдельных механизмов электромеханического сопряжения [21]. Поэтому в качестве инструмента блокирования входа внеклеточного Ca^{2+} мы использовали ионы никеля.

Цель данного исследования — оценить соотношение вклада внеклеточных и внутриклеточных источников Ca^{2+} в активацию сокращения миокарда с помощью физиологических тестов — зависимости «частота—сила» и эффекта паузы, а также посредством блокирования входа внеклеточного Ca^{2+} хлоридом никеля в условиях гипотермии. Преимуществом использования Ni^{2+} является его способность ингибировать несколько путей поступления внеклеточного Ca^{2+} в цитозоль, при этом эффективность его не зависит от температуры в отличие, например, от нефидипина, что делает использование хлорида никеля более предпочтительным.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на папиллярных мышцах правого желудочка сердца якутских сусликов *Urociellus undulatus* в периоды летней (июнь—июль, $n = 10$) активности.

Животные. Животных предварительно наркотизировали диэтиловым эфиром. Выделенное сердце помещали в раствор Тироде (20°C) следующего состава (в мМ): $\text{NaCl} - 135$, $\text{KCl} - 4$, $\text{MgCl}_2 - 1$, $\text{CaCl}_2 - 1.8$, $\text{NaHCO}_3 - 13.2$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - 1.8$, глюкоза — 11 (рН 7.4). Раствор аэрировали газовой смесью состава 95% $\text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2$. Выделенные папиллярной мышцы, стимуляцию и измерение силы сокращения в изометрическом режиме проводили по ранее описанной методике [22] при температуре перфузирующего раствора $20 \pm \pm 0.1^\circ\text{C}$. Для исследования механической активности папиллярной мышцы использовали автоматизированную установку на основе персональ-

ного 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 (напряжением 5 В и длительностью 5 мс, с силой тока, в два раза превышающей пороговую) с частотой 0.3 Гц в течение 1 ч для стабилизации силы сокращения.

Зависимость «частота—сила». Зависимость «частота—сила» в изометрическом режиме регистрировали в интервале частот стимуляции от 0.1 до 1.0 Гц. При построении зависимости 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% [14, 20].

Регистрация эффекта паузы. На фоне постоянной стимуляции с заданной частотой, при которой сила сокращения находится на стабильном уровне (базовое сокращение) вносили паузу в стимуляции, что приводило к потенциации первого после паузы сокращения (тестового). Величину эффекта выражали в процентах по отношению к силе сокращения на базовой частоте стимуляции (0.3 и 1.0 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». Как говорилось выше, группа активных сусликов неоднородна по типу реакции миокарда на охлаждение, на рис. 1а можно видеть пример сохранения отрицательной зависимости «частота—сила» в ответ на охлаждение до 10°C и трансформацию из двухфазной зависимости в положительную (рис. 1б); также заметно, что при 20°C для миокарда этих типов была характерна отрицательная (рис. 1в,д) и положительная зависимости (рис. 1г,е).

Под воздействием 1.5 мМ Ni^{2+} в группе сусликов с отрицательной зависимостью «частота—сила» при стимуляции частотами 0.1 Гц и 1 Гц сила сокращения снижалась до $52 \pm 15\%$ и $4 \pm 3\%$ соответственно (рис. 1в,д); в миокарде с положительной зависимостью «частота—сила» отрицательный инотропный эффект был значительно более выражен при практически полном подавлении

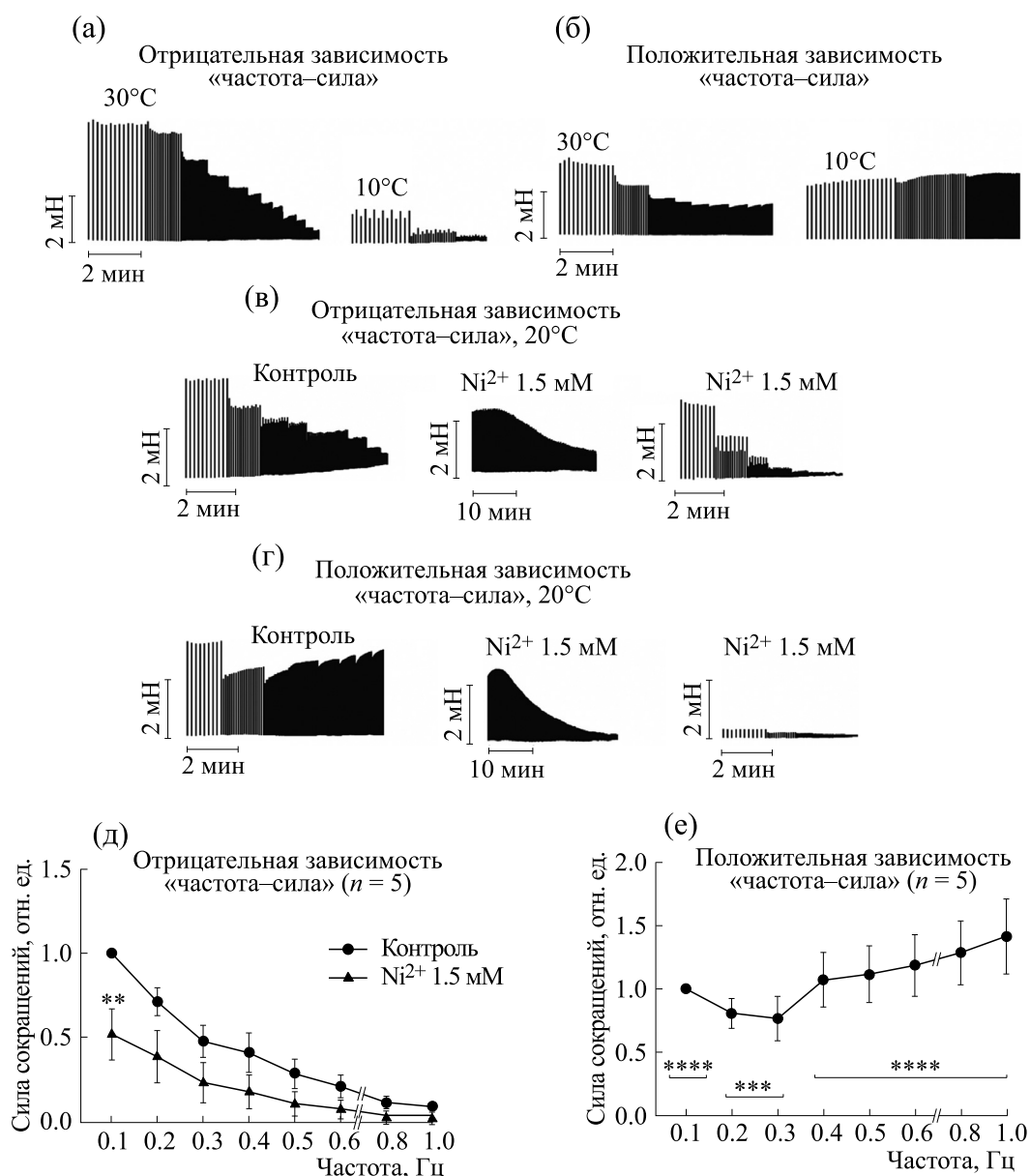


Рис. 1. Влияние 1.5 мМ Ni²⁺ на силу сокращений и зависимость «частота–сила» в папиллярных мышцах правого желудочка сердца сусликов с отрицательной (n = 5) и положительной (n = 5) зависимостью. (а) – Пример сохранения отрицательного характера зависимости «частота–сила» при охлаждении; (б) – пример перехода из отрицательной к положительной зависимости «частота–сила»; (в, г) – типичные примеры действия 1.5 мМ Ni²⁺ на сократимость папиллярной мышцы с отрицательной и положительной зависимостью «частота–сила» соответственно; (д, е) – соответствующие кривые зависимости «частота–сила». По оси ординат – сила изометрического сокращения по отношению к частоте стимуляции на частоте 0.1 Гц, принимаемая за единицу; по оси абсцисс – частота стимуляции, Гц. Данные представлены как средние значения ± ошибка среднего (достоверное отличие от значений в контроле на той же частоте: ** – p < 0.005; *** – p < 0.001; **** – p < 0.0001).

сокращений, сила которых составляла $6 \pm 3\%$ (0.1 Гц) и $1.0 \pm 0.5\%$ (1 Гц) (рис. 1г,е).

Из данных литературы известно, что концентрации Ni²⁺ менее 100 мкМ блокируют преимущественно T-Ca²⁺-ток с различной эффективностью действия на отдельные изоформы [23], при этом более высокие концентрации (0.5–5 мМ)

блокируют LTCC [24], а концентрациями около 5 мМ блокируется натрий-кальцевый обменник [25, 26].

Полученные нами эффекты с более выраженным подавлением в группе с положительной зависимостью «частота–сила» в целом соответствуют, по-видимому, большей роли LTCC в актива-

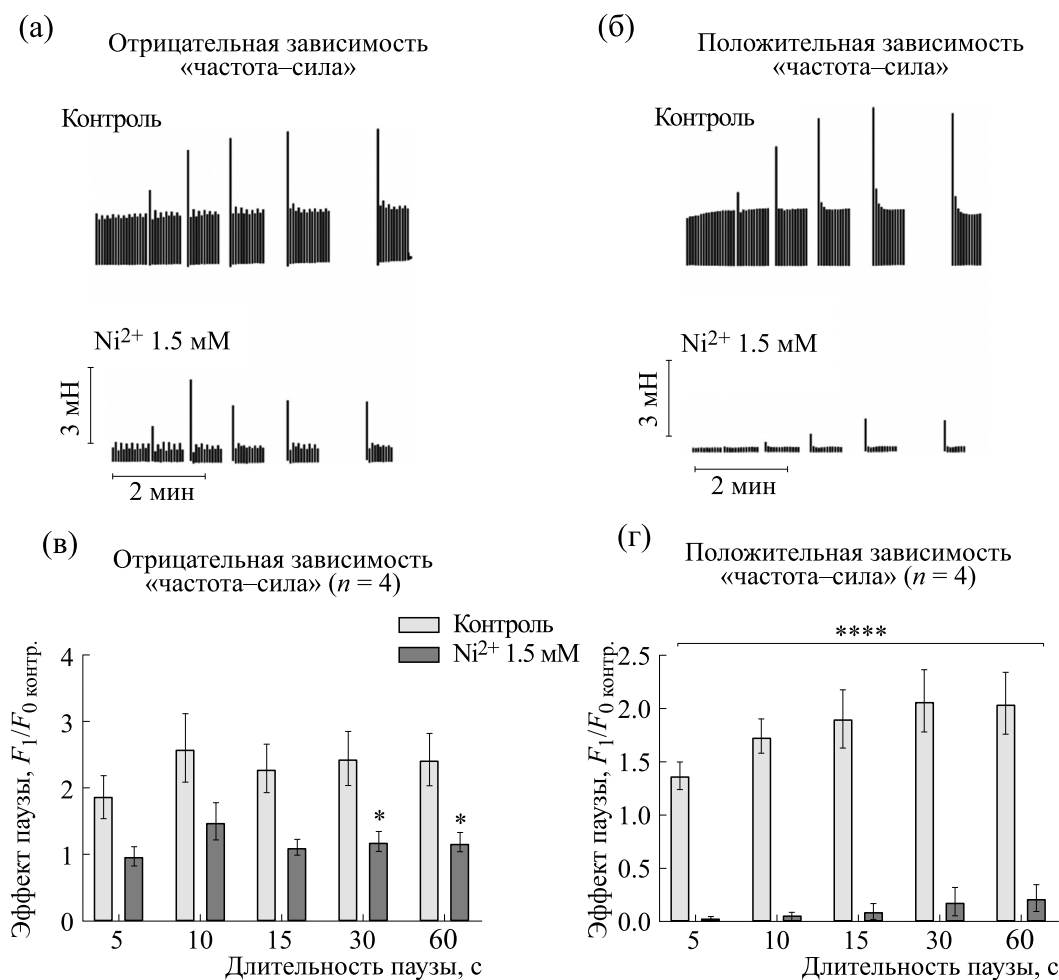


Рис. 2. Влияние 1.5 мМ Ni²⁺ на эффект паузы при частоте стимуляции 0.3 Гц в папиллярных мышцах правого желудочка сердца сусликов с отрицательной ($n = 4$) и положительной ($n = 4$) зависимостью «частота–сила». (а, б) – Типичные примеры действия 1.5 мМ Ni²⁺ на эффект паузы с отрицательной и положительной зависимостью «частота–сила» соответственно; (в, г) – соответствующие статистические гистограммы. По оси ординат – эффект паузы (сила первого после паузы сокращения по отношению к силе сокращения на базовой частоте стимуляции в контроле); по оси абсцисс – длительность пауз, с. Данные представлены как средние значения \pm ошибка среднего (достоверное отличие от значений в контроле при той же длительности паузы: * – $p < 0.05$; **** – $p < 0.0001$).

ции сокращения. Вместе с тем они показывают, что в миокарде сусликов с данным типом реакции на температуру ведущую роль в формировании положительной зависимости «частота–сила» играет LTCC сходно с миокардом нормотермных животных как в условиях, близких к физиологическим, так и при умеренной гипотермии [27, 28]. В экспериментальной группе, сохраняющей негативную зависимость «частота–сила» в диапазоне 0.1–0.3 Гц оставались заметные сокращения, что может свидетельствовать с одной стороны о наполненности СР Ca²⁺, а с другой – что при блокировании LTCC дополнительные источники, такие как депозависимый вход Ca²⁺ [22] или обратная форма натрий-кальциевого обменника [26, 29, 30], могут активировать выброс Ca²⁺ из

СР. По некоторым данным, дополнительной возможностью для активации сокращения также может стать прямое конформационное взаимодействие между LTCC и каналами рианодиновых рецепторов без проведения ионов Ca²⁺ [31].

В наших опытах, независимо от типа реакции на температуру, при данных экспериментальных условиях мы наблюдали исключительно отрицательный инотропный эффект, в то время как в миокарде лягушки, для которого характерна положительная зависимость «частота–сила» [32], как в некоторых состояниях у сусликов, может наблюдаться положительный инотропный эффект Ni²⁺ (10–200 мкМ) [33]. Причина и условия формирования положительного эффекта Ni²⁺ в миокарде зимоспящих остается неясной. Не-

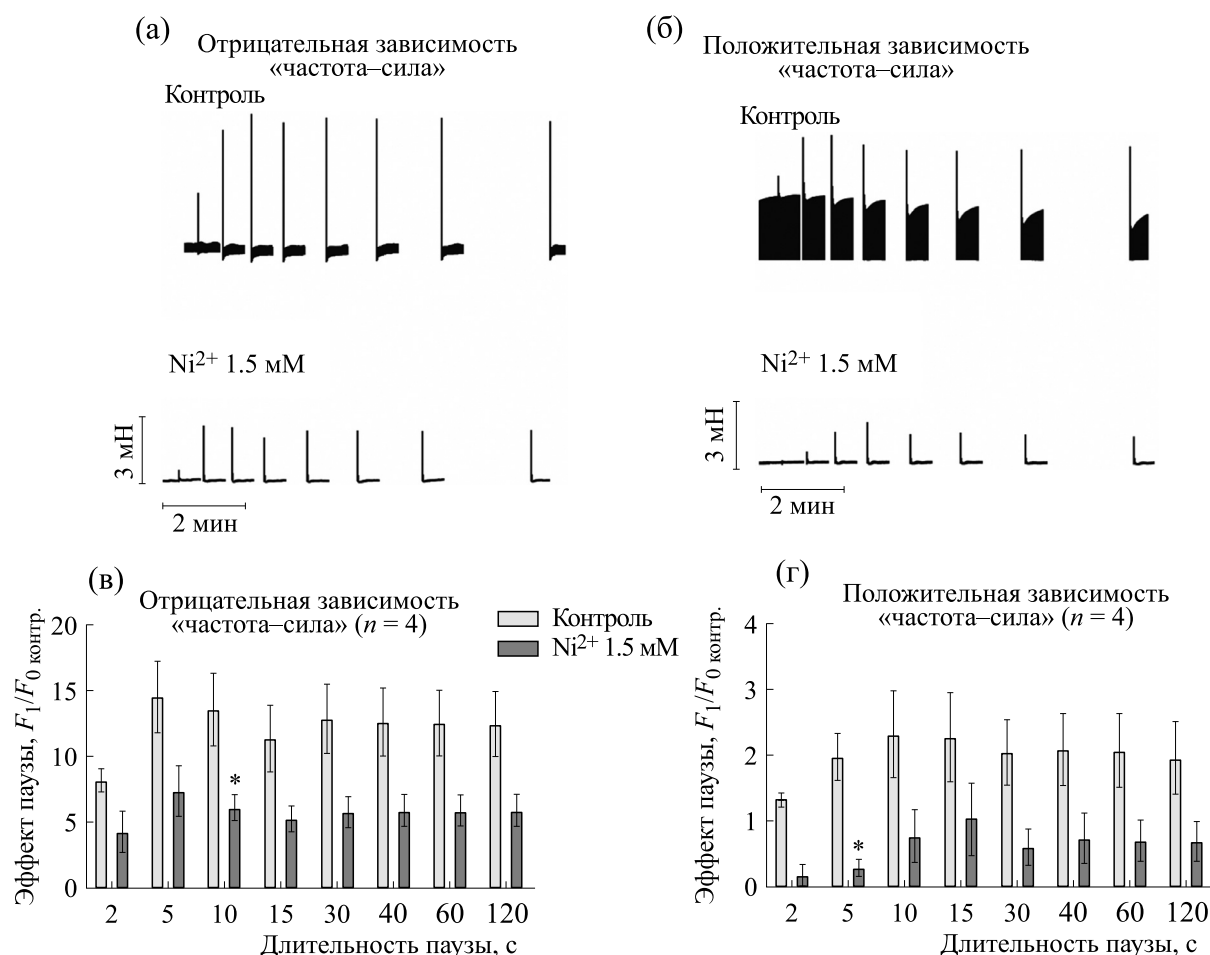


Рис. 3. Влияние 1.5 мМ Ni²⁺ на эффект паузы при частоте стимуляции 1.0 Гц в папиллярных мышцах правого желудочка сердца сусликов с отрицательной ($n = 4$) и положительной ($n = 4$) зависимостью «частота–сила». (а, б) – Типичные примеры действия 1.5 мМ Ni²⁺ на эффект паузы с отрицательной и положительной зависимостью «частота–сила» соответственно; (в, г) – соответствующие статистические гистограммы. По оси ординат – эффект паузы (сила первого после паузы сокращения по отношению к силе сокращения на базовой частоте стимуляции в контроле); по оси абсцисс – длительность пауз, с. Данные представлены как средние значения \pm ошибка среднего (достоверное отличие от значений в контроле при той же длительности паузы: * – $p < 0.05$).

смотря на то что прямые исследования, объясняющие этот феномен, в миокарде отсутствуют, можно провести определенную аналогию между клетками разных типов. Так, в гепатоцитах Ni²⁺ вызывал рост внутриклеточного Ca²⁺ [34], в гладких мышцах – рост сократимости через участие активных форм кислорода [35]. Показано также, что создание условий, затрудняющих прямую работу натрий-кальциевого обменника (который блокируется Ni²⁺ в концентрациях в несколько миллимолей) ведет к росту сократимости [36–38], однако в целом этот вопрос еще требует дополнительных исследований.

Потенциация паузой. В контроле при частоте стимуляции 0.3 Гц эффект потенциации паузой в миокарде с отрицательной зависимостью «частота–сила» достигал максимума при длительности

паузы 10 с и составлял $260 \pm 11\%$, снижаясь до $230 \pm 36\%$ при 15 с и незначительно увеличиваясь при дальнейшем увеличении длительности паузы. В присутствии 1.5 мМ Ni²⁺ характер эффекта паузы не претерпевал значительных изменений, при этом величина его уменьшалась в среднем на 45–55% (достоверно для пауз 30 и 60 с) (рис. 2а,в). Для миокарда животных с положительной зависимостью «частота-сила» наблюдался иной характер эффекта паузы. Он постепенно нарастал с $137 \pm 13\%$ при 5 с, достигая максимума в $208 \pm 29\%$ при 30 с и значительно не изменяясь к 60 с (рис. 2б,г). Также как и в другой группе, характер эффекта паузы не претерпевал изменений, однако величина его снижалась более значительно: на 98% при паузе 5 с и на 90% при паузе 60 с достоверно при всех длительностях пауз.

При частоте стимуляции 1.0 Гц наблюдалась схожая картина. В группе животных с негативной зависимостью «частота–сила» после воздействия Ni^{2+} эффекта паузы составлял 45–55% от контрольного уровня, при этом статистически значимыми были отличия только для паузы в 10 с (рис. 3а,в). В группе животных с положительной зависимостью снижение эффекта паузы было более заметным – от 85 до 65%. Достоверными отличия были только для паузы в 5 с (рис. 3б,г).

Эффект паузы был при этом более выраженным, чем в контроле в обеих группах при частоте стимуляции как 0.3, так и 1.0 Гц. Сходная картина описана для миокарда телят, где блокирование входа внеклеточного Ca^{2+} с помощью ионов Ni^{2+} и Co^{2+} приводило к более яркому проявлению эффекта паузы [39], а также для миокарда сусликов с препятствованием входу внеклеточного Ca^{2+} блокатором ЛТСС нифедипином [13].

Таким образом, увеличение частоты стимуляции практически не влияет на выраженность подавляющего эффекта Ni^{2+} в группе с негативной зависимостью «частота–сила» что может свидетельствовать о том, что СР уже заполнен Ca^{2+} даже при частоте стимуляции 0.3 Гц и ее увеличение не приводит к каким-либо изменениям. В группе с трансформирующейся зависимостью увеличение частоты стимуляции ведет к снижению подавления эффекта паузы под воздействием Ni^{2+} , то есть в СР данной группы животных с увеличением частоты стимуляции увеличивается содержание Ca^{2+} . Этот факт хорошо согласуется с данными литературы о том, что увеличение частоты стимуляции может способствовать увеличению содержания Ca^{2+} в СР и, следовательно, меньшей зависимости эффекта паузы от входа внеклеточного Ca^{2+} [40, 41].

ВЫВОДЫ

Впервые было показано, что в условиях выраженной гипотермии (20°C) миокард сусликов, сохраняющий отрицательную зависимость «частота–сила» существенно менее зависим от поступления внеклеточного Ca^{2+} , так как СР уже содержит значительное количество аккумулярованных ионов Ca^{2+} , которое индифферентно к повышению частоты стимуляции. Миокард активных сусликов, для которого характерен переход к положительной зависимости «частота–сила» при охлаждении, напротив, в значительной степени зависит от входа внеклеточного Ca^{2+} и загрузку Ca^{2+} в СР можно существенно увеличить.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по теме Госзадания «Механизмы природного и искусственного гипобиоза» (НИОКТР: 122041100276-0).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с экспериментальными животными проведены в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в научных исследованиях (1986, 86/609/ЕЕС).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. S. Maier, C. Schwan, W. Schillinger, et al., *Cardiovasc. Res.*, **45**, 913 (2000).
2. M. A. Mashali, N. S. Saad, B. D. Canan, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **156**, 7 (2021).
3. B. Pieske, L. S. Maier, V. Piacentino, et al., *Circulation*, **106**, 447 (2002).
4. W. F. Bluhm, E. G. Kranias, W. H. Dillmann, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **278**, 249 (2000).
5. J.-H. Chung, B. D. Canan, B. A. Whitson, et al., *Physiol. Rep.*, **6**, e13898 (2018).
6. A. Krishna, M. Valderrábano, P. T. Palade, et al., *Theor. Biol. Med. Model.*, **10**, 54 (2013).
7. W. Schillinger, S. E. Lehnart, J. Prestle, et al., *Basic Res. Cardiol.*, **93** (Suppl 1), 38 (1998).
8. B. D. Stuyvers, A. D. McCulloch, J. Guo, et al., *J. Physiol.*, **544**, 817 (2002).
9. M. Endoh, *Eur. J. Pharmacol.*, **500**, 73 (2004).
10. Z. Kassiri, R. Myers, R. Kaprielian, et al., *J. Physiol.*, **524** (Pt 1), 221 (2000).
11. N. Kondo and S. Shibata, *Science*, **225**, 641 (1984).
12. K. Li and J. L. Rouleau, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **27**, 1251 (1995).
13. O. V. Nakipova, N. M. Zakharova, L. A. Andreeva, et al., *Cryobiology*, **55**, 173 (2007).
14. O. V. Nakipova, A. S. Averin, L. S. Kosarsky, et al., *Biophysics*, **64** (5), 786 (2019).
15. A. Lukas, R. Bose, A. Lukas, et al., *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **334**, 480 (1986).
16. S. E. Ahlberg, R. C. Hamlen, D. L. Ewert, et al., *Cardiovasc. Eng.*, **7**, 32 (2007).
17. D. S. Kondratieva, S. A. Afanasiev, V. Yu. Usov, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.*, **163**, 612 (2017).
18. N. Kondo, *Circ. Res.*, **59**, 221 (1986).
19. Y. Kokoz, A. S. Grichenko, A. F. Korystova, et al., *Membr. Cell. Biol.*, **14**, 277 (2000).

20. N. M. Zakharova, O. V. Nakipova, A. S. Averin, et al., *Dokl. Biol. Sci.*, **424**, 21 (2009).
21. H. M. Piper, J. F. Hütter, and P. G. Spieckermann, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **16**, 277 (1984).
22. O. V. Nakipova, A. S. Averin, E. V. Evdokimovskii, et al., *PLoS One*, **12**, e0177469 (2017).
23. E. Perez-Reyes, *Physiol. Rev.*, **83**, 117 (2003).
24. I. A. Hobai, J. C. Hancox, and A. J. Levi, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **279**, H692 (2000).
25. D. J. Beuckelmann and W. G. Wier, *J. Physiol.*, **414**, 499 (1989).
26. A. J. Levi, K. W. Spitzer, O. Kohmoto, et al., *Am. J. Physiol.*, **266**, H1422 (1994).
27. A. S. Averin, N. M. Zakharova, and S. V. Tarlachkov, *J. Evol. Biochem. Phys.*, **57** (4), 761 (2021).
28. A. Redel, W. Baumgartner, K. Golenhofen, et al., *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, **445**, 297 (2002).
29. J. Huang, L. Hove-Madsen, and G. F. Tibbits, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **294**, C516 (2008).
30. S. E. Litwin, J. Li, and J. H. Bridge, *Biophys. J.*, **75**, 359 (1998).
31. U. Mackiewicz, K. Emanuel, and B. Lewartowski, *J. Physiol. Pharmacol.*, **51**, 777 (2000).
32. S. Subramani, S. Balakrishnan, T. Jyoti, et al., *Acta Physiol. Scand.*, **185**, 193 (2005).
33. I. V. Shemarova, S. V. Kuznetsov, I. N. Demina, et al., *J. Evol. Biochem. Phys.*, **45** (3), 319 (2009).
34. K. Sayuri Utsunomiya, L. Jonatas da Silva, J. Iwamoto, et al., *J. Biol. Inorg. Chem.*, **26**, 641 (2021).
35. S. Ahmad Wani, L. Ahmad Khan, and S. Farhat Basir, *J. Smooth Muscle Res.*, **54**, 71 (2018).
36. H. Lüllmann, U. Ravens, and P. Stöckel, *Pharmacol. Toxicol.*, **68**, 39 (1991).
37. K. Mubagwa, W. Lin, K. Sipido, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **29**, 977 (1997).
38. K. Tsuchida, H. Hirose, S. Ozawa, et al., *Pharmacology*, **106**, 91 (2021).
39. O. Bass, *Circ. Res.*, **39**, 396 (1976).
40. A. S. Averin, N. M. Zakharova, and D. A. Ignatiev, *Biophysics*, **66** (6), 1011 (2021).
41. B. M. Wolska and B. Lewartowski, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **25**, 75 (1993).

Effects of Nickel Chloride on Myocardial Contractile Parameters in Active Ground Squirrels with Different Responses to Hypothermia

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 effect of 1.5 mM nickel chloride on contraction force, the force-frequency relation, and the effect of rested state contraction in the myocardium of active ground squirrels *Urociellus undulates* with different responses to hypothermia were studied. It was shown that at 20°C, in the group of ground squirrels retaining the negative direction of the force-frequency relation in cooling, contraction force was $52 \pm 15\%$ and $4 \pm 3\%$ of contraction force in the control using a 0.1 Hz and 1 Hz stimulation frequencies, respectively. In the myocardium, when the muscle contraction pattern changed from biphasic contraction to positive in cooling, a reduction of contractility was much more pronounced rest effect leading to almost complete suppression of contractions, contraction force was $6 \pm 3\%$ and $1 \pm 0.5\%$ at 0.1 Hz and 1.0 Hz, respectively. During stimulation frequency of 0.3 Hz in the presence of 1.5 mM Ni²⁺, when the force-frequency relation in the myocardium was negative, the magnitude of the effect of rested state contraction decreased by 45–55% on the average, but when the force-frequency relation was positive, this effect was reduced by 90–98%. At a stimulation frequency of 1.0 Hz, there was a 45–55% and 65–85% reduction, respectively. Thus, it was shown that the myocardium of ground squirrels retaining negative force-frequency relation was significantly less dependent on extracellular Ca²⁺ input as compared with the myocardium of active ground squirrels, which was characterized by the transition to a positive force-frequency relationship in cooling.

Keywords: myocardium, hypothermia, force-frequency relation, rest potentiation, Ni²⁺