

## ВЛИЯНИЕ АПАМИНА НА ПРОФИЛИ ВНЕКЛЕТОЧНО РЕГИСТРИРУЕМЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ ДЕЙСТВИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ СУБЭПИКАРДА В МОДЕЛИ ИНФАРКТА МИОКАРДА У КРЫС

© 2024 г. А. В. Степанов<sup>1, \*</sup>, М. Г. Добрецов<sup>1</sup>, Ю. А. Филиппов<sup>1</sup>, И. В. Кубасов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: botanik2407@gmail.com

Поступила в редакцию 08.04.2024 г.

После доработки 23.05.2024 г.

Принята к публикации 03.06.2024 г.

Роль  $Ca^{2+}$ -активируемых калиевых каналов низкой проводимости (СК) в патогенезе кардиомиопатий различной этиологии остается малоизученной. Целью данной работы было оценить влияние блокатора этих каналов апамина на электрогенез внеклеточно регистрируемых потенциалов действия (ВПД) субэпикардиальных миоцитов левого желудочка изолированных сердец ложнопериорированных крыс и крыс с инфарктом миокарда, вызванным ишемией-реперфузией. Было установлено, что локальная доставка в зону регистрации ВПД блокатора СК-каналов апамина в концентрации 500 нМ не влияла на профили ВПД в группе ложнопериорированных крыс, но вызывала существенное замедление времени реполяризации и снижение фазы следовой гиперполяризации ВПД в группе крыс с инфарктом миокарда. Полученные данные предполагают о том, что указанные изменения в электрогенезе ВПД после инфаркта могут быть связаны с усилением экспрессии и/или активности СК-каналов в субэпикардиальных миоцитах. Обсуждается возможная роль этих каналов в структурно-функциональном ремоделировании миокарда левого желудочка сердца после ишемии-реперфузии.

**Ключевые слова:** инфаркт миокарда, кардиомиоциты, внеклеточный потенциал действия, апамин, СК-каналы

**DOI:** 10.31857/S0044452924040065, **EDN:** YQCPFG

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что ассоциированное с инфарктом миокарда (ИМ) и ишемией увеличение концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  происходит вследствие утечки ионов  $Ca^{2+}$  из дисфункционального саркоплазматического ретикулума и притока внеклеточного  $Ca^{2+}$  [1–4]. Выраженное повышение содержания внутриклеточного  $Ca^{2+}$  может инициировать обширную активацию  $K^+$ -тока через СК-каналы ( $Ca^{2+}$ -активируемые калиевые каналы низкой проводимости), приводящую к сокращению продолжительности ПД и эффективного рефрактерного периода. Сокращение длительности ПД и гетерогенность реполяризации являются хорошо известными факторами, способствующими развитию аритмий, что указывает на значимость тока через

СК-каналы ( $I_{SK}$ ) при желудочковых аритмиях, вызванных ИМ [1].

Известно, что СК-каналы экспрессируются во многих тканях, в том числе в сердце. В кардиомиоцитах предсердий эти каналы представлены в значительном количестве [5–7], тогда как в желудочках СК-каналы представлены незначительно или вообще отсутствуют [8–10]. Однако при кардиомиопатиях различной этиологии у человека и в различных животных моделях (хроническая сердечная недостаточность (ХСН) [11, 12], инфаркт миокарда (ИМ) [13, 14], диабетическая кардиомиопатия [15]) наблюдается повышение вклада СК-каналов в реполяризацию желудочков. Кардиомиоциты экспрессируют SK1-, SK2- и SK3-изоформы СК-каналов [5], и все эти три изоформы блокируются апамином, являющимся их селективным блокатором [16, 17]. Было показано, что применение апамина для блокирования СК-каналов предотвращало и подавляло предсердную [18] и желудочковую фибрилляцию [10] на разных животных моделях, что подтверждает участие  $I_{SK}$  в развитии аритмий в патологических условиях. В то же время есть работы, в которых применение апамина в модели сердечной недостаточ-

**Сокращения:** ИМ — инфаркт миокарда; ИР — ишемия-реперфузия; ВПД — внеклеточный потенциал действия; ЛО — ложнопериорированные; ЛЖ — левый желудочек;  $I_{SK}$  — ток через СК-каналы; СГ — следовая гиперполяризация; ХСН — хроническая сердечная недостаточность; РТ — раствор Тироде; ВДМ — 2,3-бутандион монооксим; РТА — раствор Тироде с апамином; следовая деполяризации.

ности демонстрировало проаритмическое действие, нарушая реполяризацию, что приводило к развитию ранней постдеполяризации. Это может указывать на то, что апамин-чувствительный  $K^+$ -ток при ХСН поддерживает реполяризационный резерв кардиомиоцитов и предотвращает развитие полиморфной желудочковой тахикардии по типу “пируэт” (torsades de pointes) [19].

В наших недавних исследованиях с использованием метода внеклеточной регистрации ПД с использованием стеклянных электродов с тонким (наружный диаметр примерно 5 мкм) кончиком [20] было обнаружено, что после ИМ, вызванного ишемией-реперфузией (ИР) левого желудочка (ЛЖ) сердца крысы, наблюдаются изменения профилей внеклеточно регистрируемых ПД (вПД) субэпикардиальных кардиомиоцитов, заключающиеся в формировании сопровождающих их фазы следовой гиперполяризации (СГ). Было выдвинуто предположение, что фаза СГ может быть обусловлена появлением дополнительного входящего тока через SK-каналы. С целью проверки данной гипотезы с использованием этого же метода было проведено исследование влияния блокатора SK-каналов апамина на профили вПД желудочковых кардиомиоцитов при ИМ и вкладе этих каналов в реполяризацию и СГ. Поскольку данная методика позволяет осуществлять регистрацию вПД от различных компартментов клеточной мембраны субэпикардиальных кардиомиоцитов (участки, включающие выходы t-трубочек и свободные от них), другой целью было определить локализацию этих каналов в соответствующих мембранных компартментах.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнялись на сердцах лабораторных крыс-самцов линии Wistar (возраст и вес на начало эксперимента 3–4 месяца и 250–300 г соответственно). Во время эксперимента животные содержались в виварии ИЭФБ РАН в стандартных условиях и при свободном доступе к воде и пище. Всего в исследовании было использовано 36 животных: 15 ложнопериорированных крыс (ЛО-группа) и 21 крыса с ишемией и реперфузией (ИР-группа). Из 15 крыс ЛО-группы у всех животных производилась регистрация ЭКГ; 5 крыс были взяты на электрофизиологические исследования с последующим планиметрическим анализом для подтверждения отсутствия зон некроза. Из 21 крысы ИР-группы у всех животных была произведена регистрация ЭКГ; 17 крыс были использованы в планиметрическом исследовании для оценки доли рубцовой ткани; из них 5 крыс предварительно были взяты на электрофизиологические эксперименты.

В качестве модели ИМ применялась модель ИР. Коронароокклюзия с последующей реперфузией (ИР-группа) выполнялась на животных, нар-

котизированных с помощью золетила (40 мг/кг веса животного; Virbac, Франция) с добавлением ксиланита (10 мг/кг веса животного; Нита-Фарм, Россия) в соответствии с ранее описанной методикой [21]. В группе ИР-крыс лигатуру снимали через 45 мин после окклюзии левой коронарной артерии. У животных ЛО-группы лигатура вокруг артерии размещалась в точности, как и в случае с ИР, но без окклюзии артерии. Для проведения искусственной вентиляции легких с помощью аппарата ИВЛ (Kent Scientific TOPOTM Dual Mode Ventilator, США; частота дыхания — 60/мин, дыхательный объем в пределах от 1.5 до 3 мл/100 г массы) проводилась интубация трахеи с предварительной обработкой гортани 2 % раствором лидокаина. Окклюзия артерии подтверждалась подъемом сегмента ST на ЭКГ [22].

ЭКГ-исследование проводилось на крысах, обезвреженных с помощью ингаляции изофлурана (Laboratories Karizoo, S.A., Испания) через маску. Данный тип наркоза был выбран в соответствии с ранее опубликованными рекомендациями для проведения ЭКГ-исследований на крысах [23]. Регистрация ЭКГ осуществлялась в трёх стандартных отведениях с использованием подкожных игольчатых электродов, подключённых к электрокардиографу Поли-Спектр — 8/В (Россия). Во время регистрации ЭКГ животных размещали на подогреваемом столике (38 °С). Регистрация кардиограмм осуществлялась во время операции для определения качества наложения лигатуры и подтверждения развития ишемии и через 4 недели после операции. Длительность регистрации составляла 5 мин, а усреднённые параметры ЭКГ рассчитывались с использованием программы, разработанной в нашей лаборатории в среде MatLab. В полученных для каждого животного записях ЭКГ осуществлялось усреднение PQRST комплексов для более точной оценки исследуемых параметров (амплитуды основных зубцов и длительности интервалов).

Через 4 недели после операции наркотизированные золетилом и ксилазином (см. выше) крысы ЛО- и ИР-групп вывелись из эксперимента; сердца извлекались для проведения электрофизиологических экспериментов и оценки размера рубца после ИР.

Для оценки размера ИМ сердце разрезали на 5–6 поперечных срезов, которые после окраски трифенилтетразолием хлористым (1 % раствор трифенилтетразолия хлористого в 0.2 М Tris, pH 7.8) в соответствии с ранее описанной методикой [24] визуализировались под цифровым USB-микроскопом со штативом (модель МИКМЕД 5.0, Россия). Аналогичным образом исследовались сердца крыс ЛО-группы. Анализ полученных изображений проводился планиметрическим методом при помощи программы Fiji — ImageJ. Доля рубцовой ткани миокарда ЛЖ определялась как отношение площади

рубцовой ткани к общей площади стенок ЛЖ для каждого поперечного среза. Затем производился расчёт среднего значения для всего сердца.

Электрофизиологические исследования проводились на изолированных сердцах ЛО- и ИР-крыс в условиях сохраненного синусового ритма при постоянной перфузии сердца аэрируемым физиологическим раствором по методу Лангендорфа: сердце извлекалось и помещалось на установку для ретроградной перфузии, совмещенную с системой для микроэлектродной регистрации [25]. Перфузионный раствор представлял собой аэрированный карбогеном (95 %  $O_2$  и 5 %  $CO_2$ ) раствор Тироде со следующим составом: 140 мМ NaCl, 5.4 мМ KCl, 1 мМ  $CaCl_2$ , 1 мМ  $MgCl_2$ , 10 мМ HEPES, 5.6 мМ глюкозы, pH 7.4. Эксперименты проводили с подогревом перфузирующего раствора до 36–37°C. Скорость перфузии составляла 5–7 мл/мин. Удаление из экспериментальной камеры избыточного раствора осуществляли через силиконовую трубочку диаметром 1 мм, подключенную к аспиратору. Изготовление микроэлектродов (патч-пипеток) с диаметром кончика 5 мкм производили с использованием программируемого пуллера (Sutter Instr., Model P-1000, США) из трубочек боросиликатного стекла с наружным диаметром 1.5 мм и внутренним диаметром 0.86 мм. После этого микроэлектрод заполняли раствором Тироде (PT) или раствором Тироде с добавлением блокатора SK-каналов апамина (Tocris, США) в концентрации 500 нМ (PTA). Сопротивление заполненного PT микроэлектрода составляло около 2 МОм. Сократительная активность сердца блокировалась добавлением в перфузирующий раствор блокатора миозиновой АТФ-азы 2,3-бутандион моноксима (BDM, Sigma-Aldrich, США) в концентрации 30 мМ. Микроэлектрод, заполненный PT или PTA и подключенный к входу усилителя АМ-1500 (National Instruments, США), подводили к произвольно выбранным участкам поверхности ЛЖ исследуемых сердец ЛО- и ИР-групп крыс при помощи микроманипулятора Sensapex (Финляндия). При образовании устойчивого контакта кончика микроэлектрода на выбранном участке поверхности ЛЖ сердца нами регистрировались авторитмические систолические вПД субэпикардальных миоцитов с частотой в диапазоне 0.3 — 1 Гц. Как было нами ранее показано, при использовании микроэлектрода с тонким кончиком, свыше 80% случайным образом регистрируемых ответов от субэпикарда ЛЖ относятся к вПД2 (два негативных пика, позиция кончика электрода в зоне кардиомиоцита, содержащей один или более выходов t-трубочек на поверхность клетки) [25]. Поэтому для регистрации достаточного для статистической обработки количества вПД1 (один негативный пик, кончик микроэлектрода находится в районе мембраны клетки, не содержащей выходов t-трубочек на поверхность) осуществлял-

ся целенаправленный поиск именно таких ответов путем последовательного смещения (10–15 мкм) кончика микроэлектрода в соседние участки миоцитов субэпикарда до появления соответствующего ответа. При этом выбор мест регистрации вПД в сердцах ИР-группы определялся как в субэпикарде над зоной вероятного интрамурального инфаркта (ниже места перетяжки коронарной артерии), так и вне этой зоны. В среднем в каждом эксперименте выполнялось непрерывная 30-минутная регистрация 2–3 вПД1 или вПД2. После этого происходила замена микропипетки на микропипетку, заполненную альтернативным раствором, и последующая регистрация вПД по тому же алгоритму. Регистрируемые сигналы оцифровывались с частотой 10 кГц при помощи аналого-цифрового преобразователя NI USB-6211 (National Instruments, США) и анализировались с помощью программного пакета WinWSP 5 (SIPBS, Великобритания). Все данные проверяли на нормальность распределения (тест Шапиро–Уилка) и, в соответствии с результатами этой проверки, различия между значениями в ЛО- и ИР-группах оценивали как достоверные при  $p < 0.05$ , используя соответствующий параметрический или непараметрический тест. Представленные в тексте данные приведены в виде средних значений величин с их стандартными ошибками.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Электрокардиографические исследования.* Регистрация ЭКГ осуществлялась во время операции для определения точности наложения лигатуры: острая ишемия сопровождалась подъёмом ST-сегмента. Анализ записей II стандартного отведения ЭКГ крыс через 4 недели после операции в ИР-группе показал характерные достоверные изменения ряда амплитудных параметров по сравнению с крысами ЛО-группы, а именно снижение амплитуды S и T зубцов (рис. 1). Достоверных отличий амплитуды других зубцов показано не было. Также не было показано изменения длительности интервалов RR, QT и QTc в группе ИР-крыс по сравнению с крысами ЛО-группы.

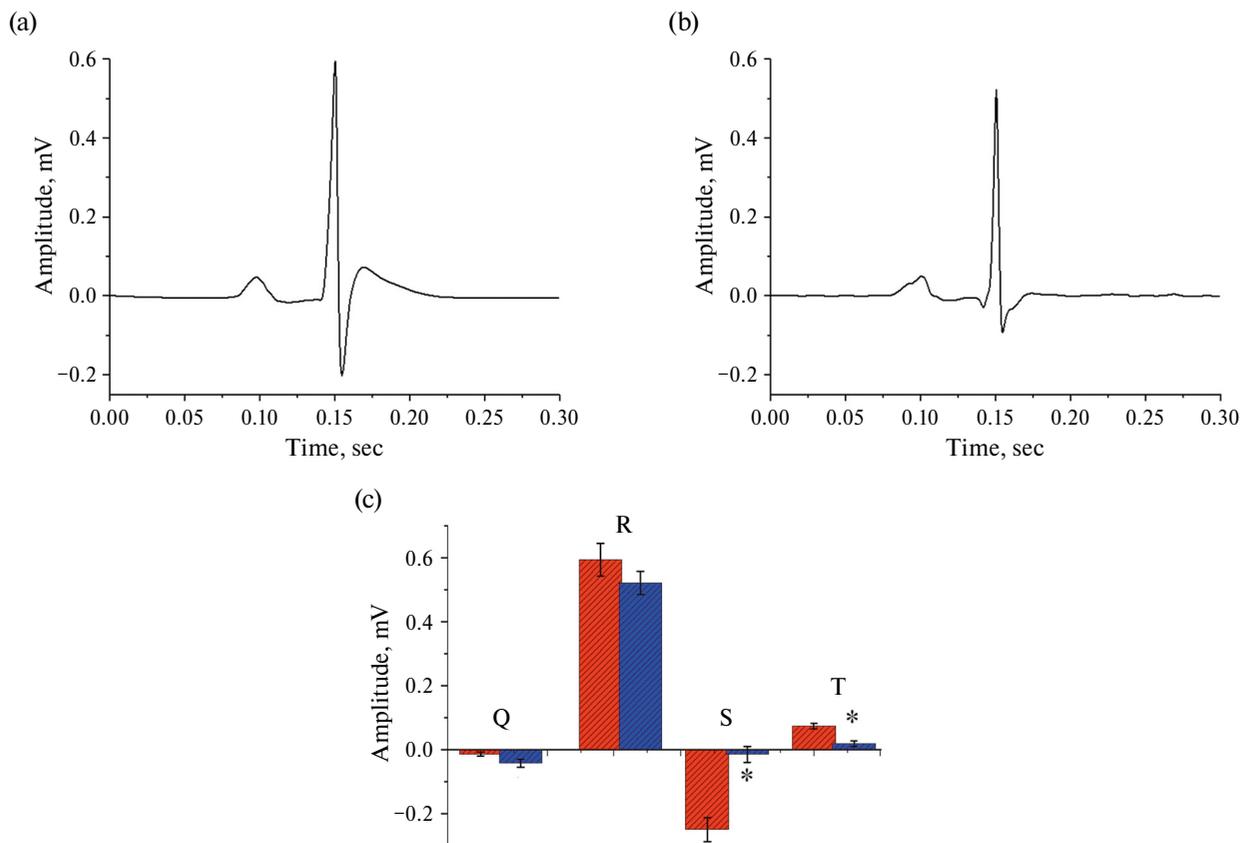
*Оценка размера инфарктной зоны.* У крыс ИР-группы после извлечения сердца и помещения в экспериментальную камеру зона инфаркта отчетливо визуализировалась в виде светлой области ниже области лигирования. Доля рубцовой ткани, рассчитанная на основе анализа поперечных срезов стенки ЛЖ, варьировала в диапазоне от 5% до 35% при среднем значении  $15.6 \pm 2.6\%$  (17 крыс). При этом зона рубца, как правило, не затрагивала субэпикардальные миоциты, от которых осуществлялось отведение вПД (рис. 2b), что согласуется с данными о том, что непродолжительная ишемия (< 45 мин) сопровождается минимальной гибелью клеток субэпикарда [26, 27].

В сердцах крыс ЛО-группы (5 крыс), использовавшихся в электрофизиологических экспериментах, зоны некроза на срезах выявлены не были, что позволяет говорить об отсутствии дополнительного, повреждающего миокард воздействия в период проведения электрофизиологических экспериментов на изолированном сердце (рис. 2а).

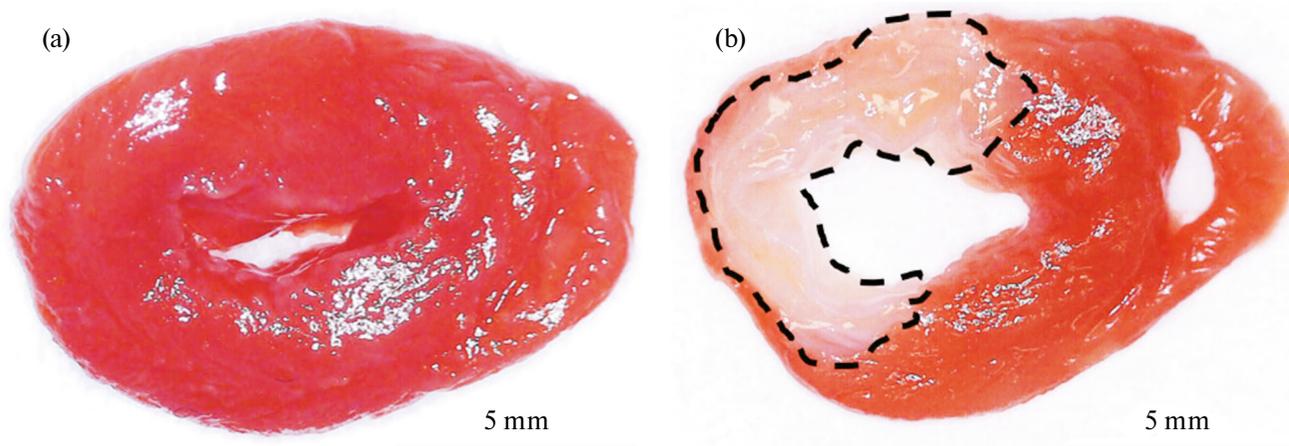
*Электрофизиологические исследования: изменение профилей вПД после ИР.* В электрофизиологических экспериментах были исследованы изолированные сердца крыс ЛО- и ИР-групп (по 5 крыс в каждой группе). Регистрация ответов осуществлялась с использованием микроэлектродов, заполненных РТ. На рис. 3 представлены примеры индивидуальных вПД1 и вПД2 субэпикардиальных кардиомиоцитов ЛЖ. Как отмечалось ранее (см. Материалы и методы), профили вПД кардиомиоцитов ЛЖ сердца ЛО- (рис. 3а) и ИР-крыс (рис. 3б) представляли собой сигналы двух типов. Профили внеклеточных ответов, регистрируемые в ЛО- и ИР-группах, существенно различались между собой по времени реполяризации  $T_{90}$  (время спада на 90% до базовой

линии):  $T_{90}$  вПД1 ИР-крыс было выше такового параметра в сердцах ЛО-крыс ( $12.2 \pm 1.04$  мс и  $5.4 \pm 0.5$  мс соответственно; более 100 регистраций в каждом из 5 сердец в каждой группе), тогда как  $T_{90}$  вПД2 в сердцах ИР-группы было ниже соответствующего значения в группе ЛО-животных ( $29.3 \pm 1.5$  мс и  $46.7 \pm 3.2$  мс соответственно; более 100 регистраций в каждом из 5 сердец в каждой группе). Также вПД1 и вПД2 у крыс ИР-группы сопровождалась выраженной позитивной фазой СГ. При этом указанные различия сохранялись вне зависимости от места регистрации ответов относительно зоны инфаркта.

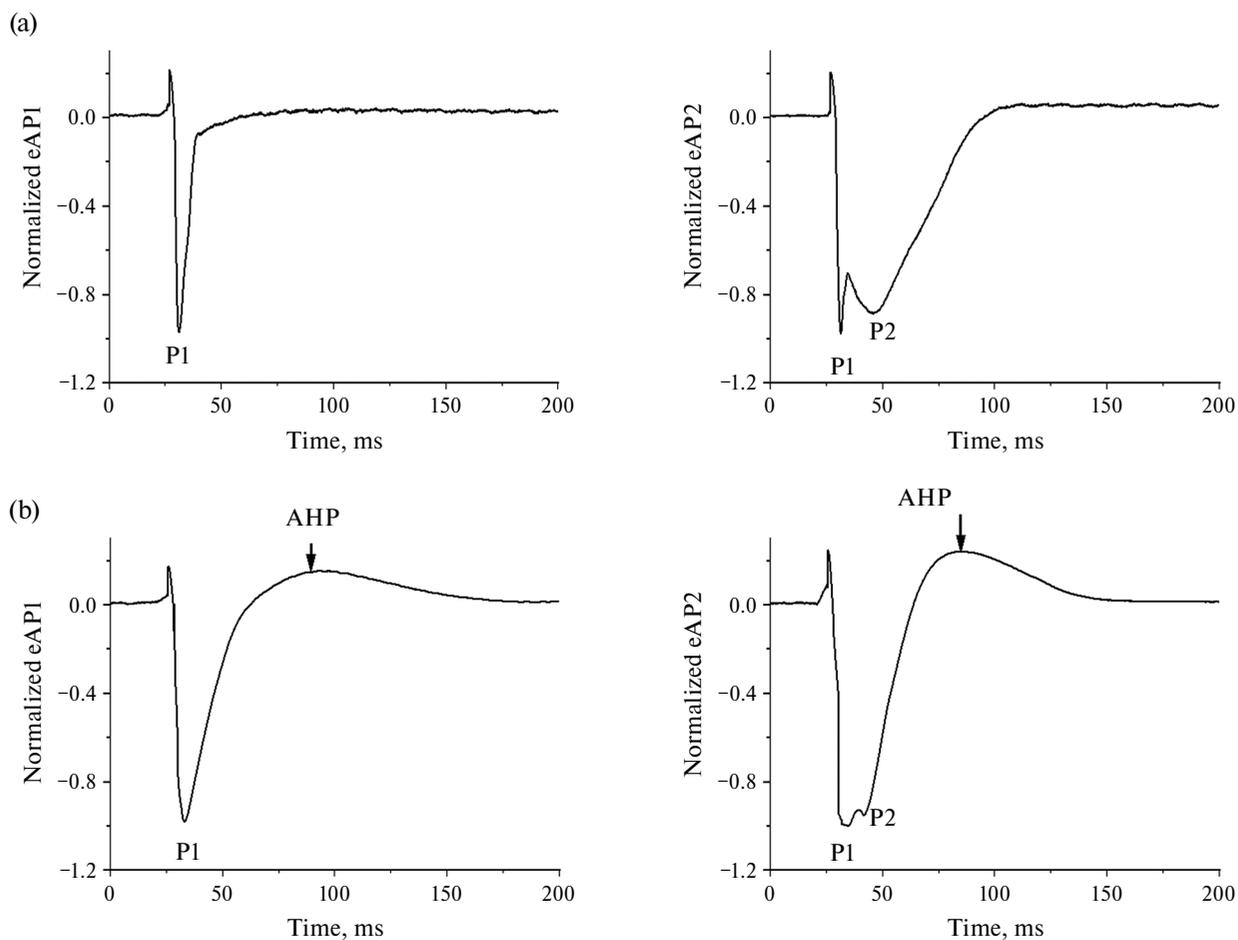
*Электрофизиологические эксперименты: изменения профилей вПД ЛО- и ИР-крыс при локальной доставке апамина.* Как показано на рис. 4, в ЛО-группе после формирования контакта кончика микропипетки, заполненной РТА, не наблюдалось достоверных изменений профилей вПД как 1-го, так и 2-го типа на протяжении 30-минутной непрерывной регистрации ( $p > 0.05$ ).



**Рис. 1.** Усредненные QRST-комплексы ЛО- (а) и ИР-крыс (б) во II стандартном отведении и средние значения амплитуд зубцов Q, R, S, T (с) по всей выборке через 4 недели после операции (красные столбцы – ЛО-группа (15 крыс); синие столбцы – ИР-группа (21 крыса). (\* – достоверное отличие от ЛО-группы,  $p < 0.05$ . Для зубцов Q, S и T – U-критерий Манна – Уитни; для зубца R – t-критерий Стьюдента).



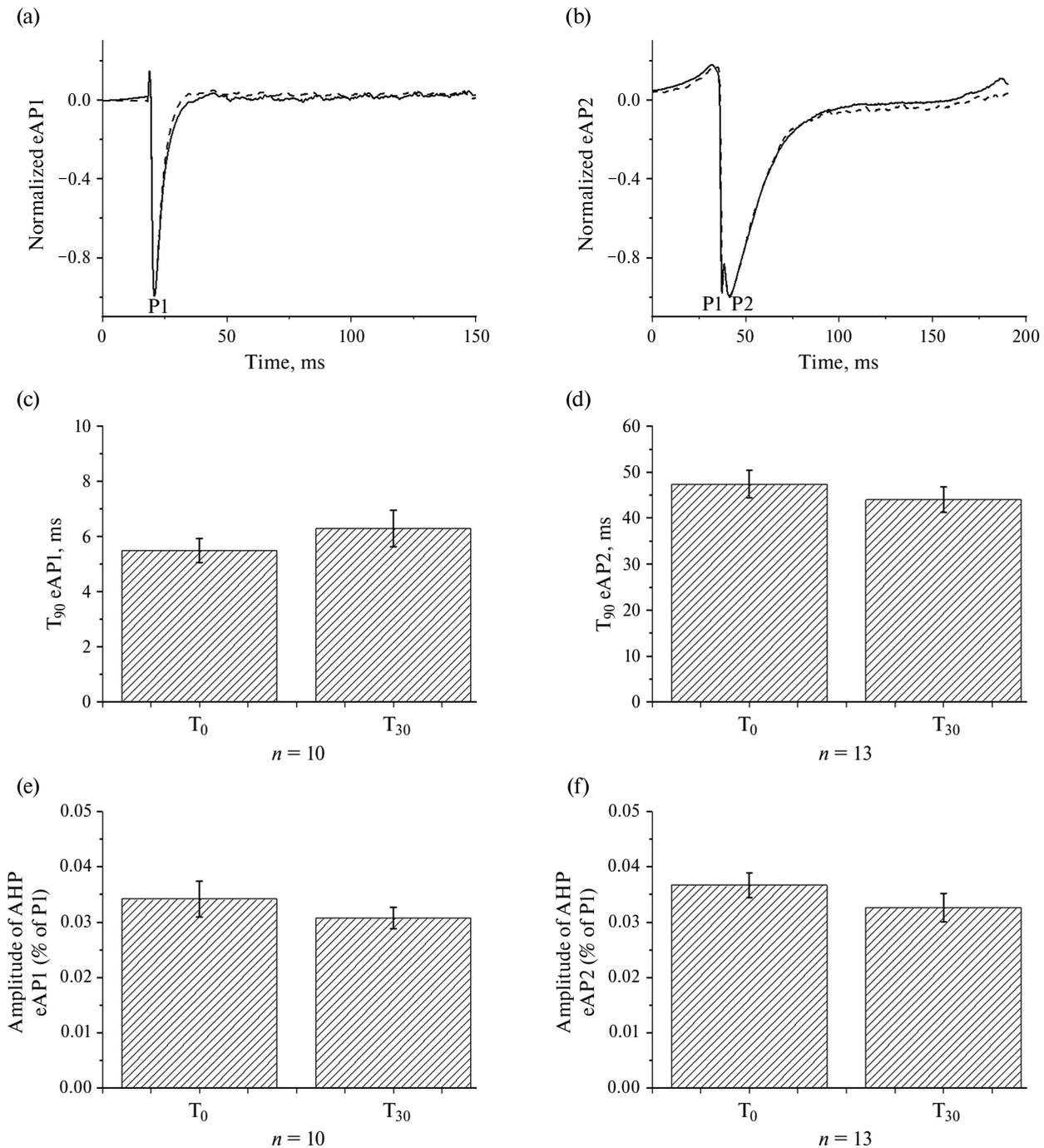
**Рис. 2.** Срезы сердец ЛО- (а) и ИР-крыс (б), окрашенные раствором трифенилтетразолия хлористого. Пунктиром обозначены границы рубцовой ткани.



**Рис. 3.** Репрезентативные примеры профилей вПД1 (eAP1) и вПД2 (eAP2) субэпикарда ЛЖ крыс ЛО- (а) и ИР-групп (б). Все ответы нормализованы к величине их первого и единственного для вПД1 отрицательного пика (P1); P2 – отметка второго отрицательного пика в составе вПД2. Стрелками отмечена фаза СГ (afterhyperpolarization, АНР).

Однако, как показано на рис. 5, в ИР-группе к 30-й минуте после формирования контакта кончика микропипетки, заполненной РТА, наблюдалось подавление фазы СГ у вПД1 и вПД2 и увеличение

их  $T_{90}$ . Одновременно у вПД2 наблюдалось формирование повторных отрицательных пиков постдеполяризация (afterdepolarization, AD), формирующихся как на спаде, так и после окончания вПД2.



**Рис. 4.** Апамин не влияет на спад вПД 1-го и 2-го типа эпикардиальных миоцитов ЛЖ сердца ЛО-крыс.

(a), (b) – репрезентативные примеры вПД1 (eAP1) и вПД2 (eAP2) соответственно в начале (сплошная линия) и через 30 минут (пунктирная линия) после контакта кончика микропипетки, заполненной РТА. P1 и P2 – отметка пиков в составе профилей вПД.

(c), (d) – средние значения  $T_{90}$  вПД1 (eAP1) и вПД2 (eAP2) соответственно в начале ( $T_0$ ) и через 30 минут ( $T_{30}$ ) непрерывной регистрации (парный t-критерий Стьюдента,  $p > 0.05$ ).

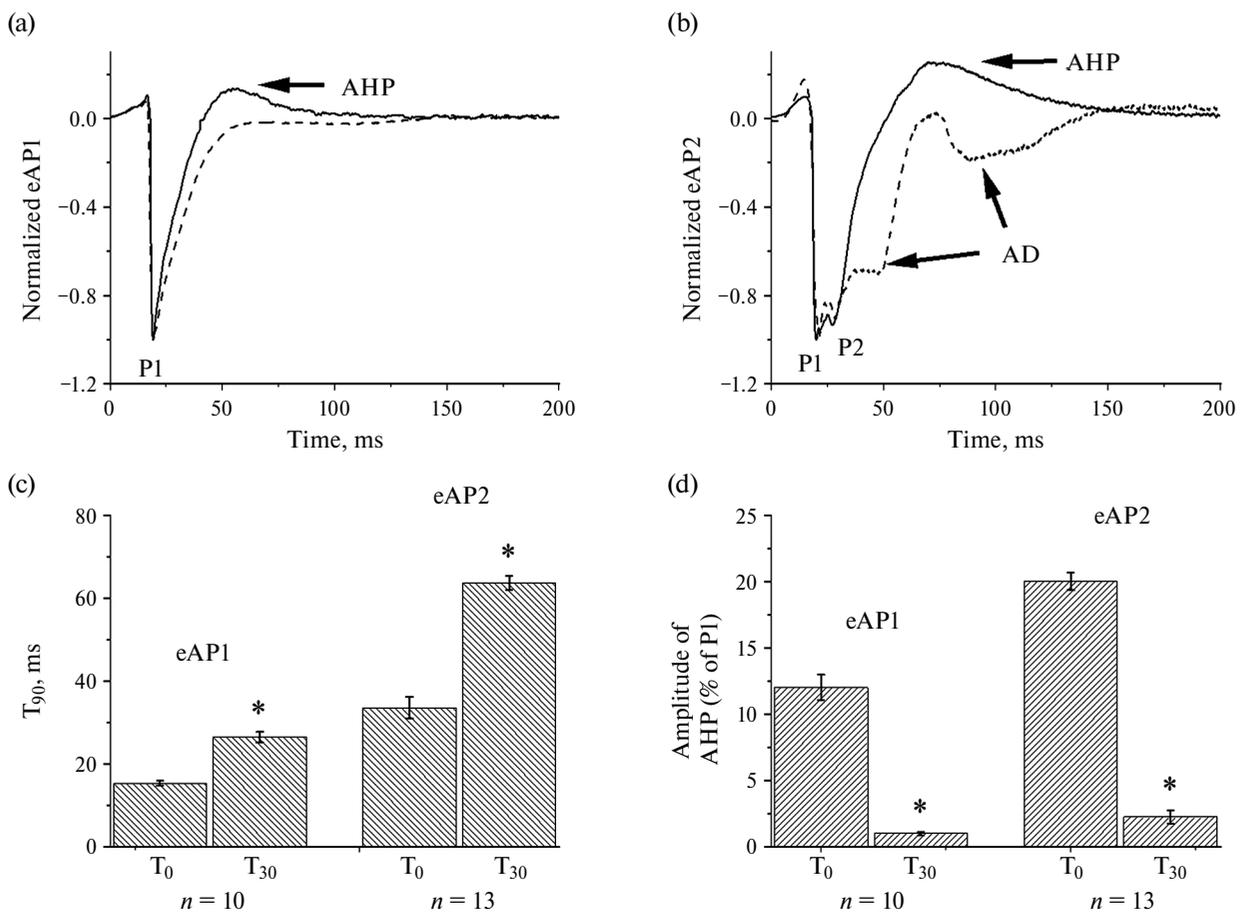
(e), (f) – средние значения амплитуды СГ (АНР) вПД1 (eAP1) и вПД2 (eAP2) соответственно, нормированные к первому негативному пику P1, в начале ( $T_0$ ) и через 30 мин ( $T_{30}$ ) непрерывной регистрации (T-критерий Вилкоксона для связанных выборок,  $p > 0.05$ ).

(n – число регистраций в группе из 5 животных).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в представленных исследованиях данные ЭКГ (достоверное снижение амплитуды S- и T-зубцов) и данные планиметрического анализа поперечных срезов сердца подтверждают ранее опубликованные нами результаты по развитию ИМ в модели ИР [20]. Как в вышеуказанной, так и в данной работе для регистрации ВПД мы использовали электроды с тонким кончиком (наружный диаметр 5 мкм). В отличие от традиционной внутриклеточной регистрации или внеклеточной регистрации сигналов электродами с большим диаметром кончика, этот метод позволяет осуществлять регистрацию ВПД от разных мембранных компартов индивидуальных кардиомиоцитов. С помощью данного метода было показано, что ИМ у крыс сопровождается разнонаправленными изме-

нениями ВПД1, отражающих активность ионных токов через наружную плазматическую мембрану, и ВПД2, отражающих активность ионных токов мембраны Т-системы кардиомиоцитов. А именно, у ВПД1 время реполяризации ( $T_{90}$ ) по сравнению с ЛО-крысами увеличивалось, тогда как ВПД2 демонстрировали ее существенное укорочение. Скорость реполяризации кардиомиоцитов является одним из критических параметров для поддержания нормальной сердечной активности и определяется во многом активностью  $K^+$ -каналов “реполяризационного” резерва. Основными реполяризующими токами в миокарде взрослых крыс являются  $I_{to}$  (transient outward  $K^+$  current) и  $I_{kur}$  (ultrarapid delayed rectifier current) [28, 29]. Показано, что при инфаркте миокарда происходит значительное снижение  $I_{to}$  [30], что может приводить к удлинению ПД. Уве-



**Рис. 5.** Апамин модулирует спад ВПД 1-го и 2-го типа эпикардиальных миоцитов ЛЖ сердца крыс ИР-группы.

(a), (b) – репрезентативные примеры ВПД1 (eAP1) и ВПД2 (eAP2) соответственно в начале (сплошная линия) и через 30 минут (пунктирная линия) после контакта кончика микропипетки, заполненной РТА. P1 и P2 – отметка пиков в составе профилей ВПД. Стрелками отмечены СГ (АНР) и постдеполяризация (AD).

(c), (d) – соответственно средние значения  $T_{90}$  и амплитуды СГ (АНР), нормированной к величине P1, в ходе непрерывной регистрации ВПД1 и ВПД2 в начале ( $T_0$ ) и через 30 минут ( $T_{30}$ ) после контакта кончика микропипетки, заполненной РТА ( $n$  – число регистраций в группе из 5 животных).

\* – достоверные отличия средних значений параметров ВПД1 и ВПД2 при  $T_{30}$  от среднего значения аналогичных параметров при  $T_0$  ( $p < 0.05$ ; парный t-критерий Стьюдента).

личение длительности вПД1, показанное в нашем исследовании, вероятнее всего, и определялось снижением реполяризирующего  $I_{to}$ . В свою очередь, снижение длительности вПД2, наблюдаемое нами в модели ИР, опосредовалось, по всей вероятности, активацией SK-каналов, локализованных преимущественно в районе Т-трубочек [31]. Причём  $I_{SK}$  компенсировал и превышал снижение  $I_{to}$ .

Роль SK-каналов в формировании СГ и в определении длительности вПД кардиомиоцитов ЛЖ сердец постинфарктных крыс (по сравнению с ЛО-крысами) в данном исследовании подтверждается нашими экспериментами с локальной аппликацией блокатора SK-каналов апамина. Наблюдавшееся в этих экспериментах удлинение спада вПД1 и вПД2 не может быть объяснено блокированием других типов  $K^+$ -токов реполяризационного резерва, поскольку апамин является высокоселективным блокатором именно SK-каналов [32]. Единственный известный ток, блокируемый апамином, — это ток через  $Ca^{2+}$ -каналы L-типа сердца куриного эмбриона [33]. Однако блокада этого деполяризирующего тока, если бы происходила в сердечной мышце крысы, привела бы к укорочению, но не удлинению вПД2 и не оказывала бы влияния на вПД1, формирующийся активностью преимущественно натриевых и калиевых каналов поверхностной мембраны клетки.

Важно то, что апамин не изменял профили вПД вентрикулярных кардиомиоцитов ЛО-крыс, но блокировал СГ и продлевал фазу спада как вПД1, так и вПД2 кардиомиоцитов ИР-группы. Это наблюдение предполагает, что ИР ассоциируется с увеличением экспрессии/активности SK каналов как в поверхностном, так и в тубулярном компартментах субэпикардальных миоцитов ЛЖ сердца крысы. Продление спада вПД2 апамином сопровождалось также во многих случаях формированием дополнительных пиков постдеполяризация (after-depolarization, AD; рис 5b). Одной из возможных причин формирования этих пиков может быть избыточная электрогенная активность  $Na^+/Ca^{2+}$ -обменника, преимущественно локализованного на мембране тубулярного компартмента [34]. Показано, что такая активность может являться триггером желудочковой тахикардии, развивающейся на поздних сроках после ИМ и сердечной недостаточности [35]. Наблюдаемые в наших экспериментах повторные пики деполяризации на фоне действия апамина могут отражать входящие токи через  $Na^+/Ca^{2+}$ -обменник, вызванные как спонтанным освобождением  $Ca^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума (задержанная постдеполяризация), так и накоплением этих ионов в субмембранном пространстве Т-системы (ранняя постдеполяризация) [20, 36]. Однако данное предположение требует до-

полнительной проверки. Вместе с тем тот факт, что эти пики деполяризации регистрируются только у вПД2, но не вПД1, свидетельствует об их активации именно в тубулярном компартменте мембраны, и в наших условиях они не приводят к развитию полноценной желудочковой тахикардии.

Стоит отметить, что BDM, применяемый в наших экспериментах для предотвращения сердечных сокращений, может модулировать некоторые ионные токи. Было показано, что BDM подавляет  $I_{to}$  и снижает активность  $Na^+/Ca^{2+}$ -обменника [37, 38]. В связи с этим стоит иметь в виду, что применение BDM может влиять на абсолютные значения ряда параметров ПД, включая его длительность. Однако в наших экспериментах BDM добавлялся во все растворы (РТ и РТА) при исследовании сердец обеих экспериментальных групп (ЛО и ИР). Поэтому описанные изменения профилей вПД в группе ИР-крыс по сравнению с ЛО-группой вряд ли могут быть отнесены к неспецифическим эффектам BDM.

В заключение отметим, что, согласно представленным данным, усиление экспрессии и/или активности SK-каналов в субэпикардальных миоцитах является одной из составляющих структурно-функционального ремоделирования миокарда ЛЖ сердца после ИМ. Значение (компенсаторное или патологическое) этого изменения для функции миокарда нуждается в дальнейшем исследовании.

#### ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы, планирование эксперимента (И.В.К.), сбор данных (А.В.С., И.В.К., Ю.А.Ф.), обработка данных (А.В.С., И.В.К., Ю.А.Ф.), написание и редактирование манускрипта (А.В.С., М.Г.Д., И.В.К.).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям, разработанным и утвержденным локальным этическим комитетом ИЭФБ РАН (Протокол № 5/2021 от 27.05.2021 г.).

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 075-00264-24-00.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hundahl LA, Sattler SM, Skibsbbye L, Diness JG, Tfelt-Hansen J, Jespersen T (2017) Pharmacological blockade of small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by ICA reduces arrhythmic load in rats with acute myocardial infarction. *Pflugers Arch* 469: 739–750. <https://doi.org/10.1007/S00424-017-1962-6>
- Krause S, Hess ML (1984) Characterization of cardiac sarcoplasmic reticulum dysfunction during short-term, normothermic, global ischemia. *Circ Res* 55: 176–184. <https://doi.org/10.1161/01.RES.55.2.176>
- Steenbergen C, Murphy E, Levy L, London RE (1987) Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circ Res* 60: 700–707. <https://doi.org/10.1161/01.RES.60.5.700>
- Tsujii E, Tanaka H, Oyamada M, Fujita K, Hamamoto T, Takamatsu T (2003) In situ visualization of the intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics at the border of the acute myocardial infarct. *Mol Cell Biochem* 248: 135–139. <https://doi.org/10.1023/A:1024188302849>
- Xu Y, Tuteja D, Zhang Z, Xu D, Zhang Y, Rodriguez J, Nie L, Tuxson HR, Young JN, Glatter KA, Vázquez AE, Yamoah EN, Chiamvimonvat N (2003) Molecular identification and functional roles of a Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel in human and mouse hearts. *J Biol Chem* 278: 49085–49094. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307508200>
- Tuteja D, Xu D, Timofeyev V, Lu L, Sharma D, Zhang Z, Xu Y, Nie L, Vázquez AE, Nilas Young J, Glatter KA, Chiamvimonvat N (2005) Differential expression of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels SK1, SK2, and SK3 in mouse atrial and ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: 2714–2723. <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00534.2005>
- Li N, Timofeyev V, Tuteja D, Xu D, Lu L, Zhang Q, Zhang Z, Singapuri A, Albert TR, Rajagopal A V., Bond CT, Periasamy M, Adelman J, Chiamvimonvat N (2009) Ablation of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel (SK2 channel) results in action potential prolongation in atrial myocytes and atrial fibrillation. *J Physiol* 587: 1087–1100. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2008.167718>
- Tuteja D, Rafizadeh S, Timofeyev V, Wang S, Zhang Z, Li N, Mateo RK, Singapuri A, Young JN, Knowlton AA, Chiamvimonvat N (2010) Cardiac small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel subunits form heteromultimers via the coiled-coil domains in the C termini of the channels. *Circ Res* 107: 851–859. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.215269>
- Nagy N, Szuts V, Horváth Z, Seprényi G, Farkas AS, Acsai K, Prorok J, Bitay M, Kun A, Pataricza J, Papp JG, Nánási PP, Varró A, Tóth A (2009) Does small-conductance calcium-activated potassium channel contribute to cardiac repolarization? *J Mol Cell Cardiol* 47: 656–663. <https://doi.org/10.1016/J.YJMCC.2009.07.019>
- Chua SK, Chang PC, Maruyama M, Turker I, Shino-hara T, Shen MJ, Chen Z, Shen C, Rubart-Von Der Lohe M, Lopshire JC, Ogawa M, Weiss JN, Lin SF, Ai T, Chen PS (2011) Small-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel and Recurrent Ventricular Fibrillation in Failing Rabbit Ventricles. *Circ Res* 108: 971–979. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.238386>
- Chang PC, Turker I, Lopshire JC, Masroor S, Nguyen BL, Tao W, Rubart M, Chen PS, Chen Z, Ai T (2013) Heterogeneous upregulation of apamin-sensitive potassium currents in failing human ventricles. *J Am Heart Assoc* 2: <https://doi.org/10.1161/JAHA.112.004713>
- Bonilla IM, Long VP, Vargas-Pinto P, Wright P, Belevych A, Lou Q, Mowrey K, Yoo J, Binkley PF, Fedorov V V., Györke S, Janssen PML, Kilic A, Mohler PJ, Carnes CA (2014) Calcium-Activated Potassium Current Modulates Ventricular Repolarization in Chronic Heart Failure. *PLoS One* 9: e108824. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0108824>
- Lee YS oo, Chang PC, Hsueh CH, Maruyama M, Park H Wook, Rhee KS, Hsieh YC, Shen C, Weiss JN, Chen Z, Lin SF, Chen PS (2013) Apamin-Sensitive Calcium-Activated Potassium Currents in Rabbit Ventricles with Chronic Myocardial Infarction. *J Cardiovasc Electro-physiol* 24: 1144–1153. <https://doi.org/10.1111/JCE.12176>
- Gui L, Bao Z, Jia Y, Qin X, Cheng ZJ, Zhu J, Chen QH (2013) Ventricular tachyarrhythmias in rats with acute myocardial infarction involves activation of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304: <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00820.2011>
- Kubasov IV, Stepanov AV, Panov AA, Chistyakova OV, Sukhov IB, Dobretsov MG (2021) Role of Potassium Currents in the Formation of After-Hyperpolarization Phase of Extracellular Action Potentials Recorded from the Control and Diabetic Rat Heart Ventricular Myocytes. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 2021 57:6 57: 1511–1521. <https://doi.org/10.1134/S0022093021060272>
- Grunnet M, Jensen BS, Olesen SP, Klaerke DA (2001) Apamin interacts with all subtypes of cloned small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Pflugers Arch* 441: 544–550. <https://doi.org/10.1007/S004240000447>
- Kuzmenkov AI, Peigneur S, Nasburg JA, Mineev KS, Nikolaev M V., Pinheiro-Junior EL, Arseniev AS, Wulff H, Tytgat J, Vassilevski AA (2022) Apamin structure and pharmacology revisited. *Front Pharmacol* 13: 977440. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.977440>
- Skibsbbye L, Diness JG, Sørensen US, Hansen RS, Grunnet M (2011) The duration of pacing-induced atrial fibrillation is reduced in vivo by inhibition of small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 57: 672–681. <https://doi.org/10.1097/FJC.0B013E318217943D>
- Chang PC, Hsieh YC, Hsueh CH, Weiss JN, Lin SF, Chen PS (2013) Apamin induces early afterdepolarizations and torsades de pointes ventricular arrhythmia from failing rabbit ventricles exhibiting secondary rises in intracellular calcium. *Heart Rhythm* 10: 1516–1524. <https://doi.org/10.1016/J.HRTHM.2013.07.003>
- Stepanov AV, Dobretsov MG, Novikova EV, Filippov YuA, Kubasov IV (2023) Remodeling of Extracellularly Recorded Action Potentials of Rat Heart Subepicardial Cardiomyocytes after Ischemia Reperfusion Injury. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 2023 59:5 59: 1497–1509. <https://doi.org/10.1134/S0022093023050046>

21. Zhang R, Han D, Li Z, Shen C, Zhang Y, Li J, Yan G, Li S, Hu B, Li J, Liu P (2018) Ginkgolide C alleviates myocardial ischemia/reperfusion-induced inflammatory injury via inhibition of CD40-NF- $\kappa$ B pathway. *Front Pharmacol* 9: 327207. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.00109>
22. Ciuffreda MC, Tolva V, Casana R, Gneccchi M, Vanoli E, Spazzolini C, Roughan J, Calvillo L (2014) Rat Experimental Model of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: An Ethical Approach to Set up the Analgesic Management of Acute Post-Surgical Pain. *PLoS One* 9: e95913. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0095913>
23. Murakami M, Niwa H, Kushikata T, Watanabe H, Hirota K, Ono K, Ohba T (2014) Inhalation Anesthesia Is Preferable for Recording Rat Cardiac Function Using an Electrocardiogram. *Biol Pharm Bull* 37: 834–839. <https://doi.org/10.1248/BPB.B14-00012>
24. Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J, Lando U, Kanmatsuse K, Mercier JC, Corday E, Ganz W (1981) Early phase acute myocardial infarct size quantification: Validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J* 101: 593–600. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(81\)90226-X](https://doi.org/10.1016/0002-8703(81)90226-X)
25. Kubasov I V, Stepanov A, Bobkov D, Radwanski PB, Terpilowski MA, Dobretsov M, Gyorke S (2018) Sub-cellular electrical heterogeneity revealed by loose patch recording reflects differential localization of sarcolemmal ion channels in intact rat hearts. *Front Physiol* 9: 309292. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2018.00061>
26. Tejada T, Tan L, Torres RA, Calvert JW, Lambert JP, Zaidi M, Husain M, Berce MD, Naib H, Pejler G, Abrink M, Graham RM, Lefer DJ, Naqvi N, Husain A (2016) IGF-1 degradation by mouse mast cell protease 4 promotes cell death and adverse cardiac remodeling days after a myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 6949–6954. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1603127113>
27. Shimizu Y, Nicholson CK, Lambert JP, Barr LA, Kuek N, Herszenhaut D, Tan L, Murohara T, Hansen JM, Husain A, Naqvi N, Calvert JW (2016) Sodium sulfide attenuates ischemic-induced heart failure by enhancing proteasomal function in an Nrf2-dependent manner. *Circ Heart Fail* 9. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002368>
28. Abramochkin D V, Moiseenko LS, Kuzmin VS (2009) The effect of hydrogen sulfide on electrical activity of rat atrial myocardium. *Bull Exp Biol Med* 147: 683–686. <https://doi.org/10.1007/s10517-009-0607-y>
29. Pustovit KB, Kuzmin VS, Abramochkin DV (2016) Dadenosine tetra- and pentaphosphates affect contractility and bioelectrical activity in the rat heart via P2 purinergic receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 389: 303–313. <https://doi.org/10.1007/s00210-015-1199-x>
30. Rozanski GJ, Xu Z, Zhang K, Patel KP (1998) Altered K<sup>+</sup> current of ventricular myocytes in rats with chronic myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 274. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.274.1.H259>
31. Zhang XD, Coulibaly ZA, Chen WC, Ledford HA, Lee JH, Sirish P, Dai G, Jian Z, Chuang F, Brust-Mascher I, Yomah EN, Chen-Izu Y, Izu LT, Chiamvimonvat N (2018) Coupling of SK channels, L-type Ca<sup>2+</sup> channels, and ryanodine receptors in cardiomyocytes. *Scientific Reports* 2018 8:1 8: 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22843-3>
32. Ishii TM, Maylie J, Adelman JP (1997) Determinants of apamin and d-tubocurarine block in SK potassium channels. *Journal of Biological Chemistry* 272: 23195–23200. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.37.23195>
33. Bkaily G, Sculptoreanu A, Jacques D, Economos D, Menard D (1992) Apamin, a highly potent fetal L-type Ca<sup>2+</sup> current blocker in single heart cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 262 <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.1992.262.2.H463>
34. Scriven DRL, Dan P, Moore EDW (2000) Distribution of Proteins Implicated in Excitation-Contraction Coupling in Rat Ventricular Myocytes. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76506-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76506-4)
35. Hegyi B, Bossuyt J, Griffiths LG, Shimkunus R, Coulibaly Z, Jian Z, Grimsrud KN, Sondergaard CS, Ginsburg KS, Chiamvimonvat N, Belardinelli L, Varró A, Papp JG, Pollesello P, Levijoki J, Izu LT, Boyd WD, Bányász T, Bers DM, Chen-Izu Y (2018) Complex electrophysiological remodeling in postinfarction ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: E3036–E3044. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1718211115/SUPPL\\_FILE/PNAS.201718211SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1718211115/SUPPL_FILE/PNAS.201718211SI.PDF)
36. Weber CR, Piacentino V, Ginsburg KS, Houser SR, Bers DM (2002) Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> Exchange Current and Submembrane [Ca<sup>2+</sup>] During the Cardiac Action Potential. *Circ Res* 90: 182–189. <https://doi.org/10.1161/HH0202.103940>
37. Coulombe A, Lefevre IA, Deroubaix E, Thuringer D, Coraboeuf E (1990) Effect of 2,3-butanedione 2-monoxime on slow inward and transient outward currents in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 22: 921–932. [https://doi.org/10.1016/0022-2828\(90\)90123-J](https://doi.org/10.1016/0022-2828(90)90123-J)
38. Watanabe Y, Iwamoto T, Matsuoka I, Ohkubo S, Ono T, Watano T, Shigekawa M, Kimura J (2001) Inhibitory effect of 2,3-butanedione monoxime (BDM) on Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange current in guinea-pig cardiac ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 132: 1317–1325. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0703926>

**INFLUENCE OF APAMIN ON THE EXTRACELLULARLY  
RECORDED ACTION POTENTIALS PROFILES  
OF SUBEPICARDIAL CARDIOMYOCYTES OF THE RAT HEART  
IN MYOCARDIAL INFARCTION**

**A. V. Stepanov<sup>#</sup>, M. G. Dobretsov, Yu. A. Filippov and I. V. Kubasov**

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry  
of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia*

*<sup>#</sup>e-mail: botanik2407@gmail.co*

The role of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>-channels (SK channels) in the pathogenesis of cardiomyopathies of various etiologies remains poorly understood. The purpose of this work was to evaluate the effect of the blocker of SK channels, apamin, on the extracellularly recorded action potentials (eAPs) of subepicardial myocytes in the left ventricles of sham-operated rats and rats with myocardial infarction caused by ischemia-reperfusion. It was found that local delivery of the SK channel blocker apamin at a concentration of 500 nM to the eAP recording area did not affect the eAP profiles in the group of sham-operated rats but caused a significant slowdown in the repolarization time and a decrease in the afterhyperpolarization phase of eAPs in the group of rats with myocardial infarction. These data suggest that changes in the waveform of eAPs after infarction are associated with increased expression and/or activity of SK channels in subepicardial myocytes. The possible role of these channels in the structural and functional remodeling of the myocardium of the left ventricle of the heart after ischemia-reperfusion is discussed.

*Keywords:* myocardial infarction, cardiomyocytes, extracellular action potential, apamin, SK channels