

DOI: 10.7868/S0869813918060096

**ОПТИЧЕСКИЕ И ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ОТВЕТЫ
КАРДИОМИОЦИТОВ В ИЗОЛИРОВАННОМ СЕРДЦЕ КРЫСЫ
ПРИ РАЗВИТИИ ГИПОКСИИ**

© И. В. Кубасов,¹ Д. Е. Бобков²

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

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: kbasov_igor@mail.ru

Ионы кальция (Ca^{2+}) играют ключевую роль в формировании электрических и сократительных ответов сердца. При помощи конфокальной лазерной микроскопии в субэпикардальных слоях миокарда изолированного сердца крысы в условиях гипоксии наблюдалось появление распространяющихся спорадических кальциевых волн. Микроэлектродное картирование поверхности миокарда изолированного сердца в тех же условиях показало, что помимо изменения формы регистрируемых ритмических внеклеточных потенциалов действия происходит формирование экстрасистолических aberrантных электрических ответов. Полученные данные свидетельствуют о возможности вовлечения аномального освобождения Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума в процесс аритмогенной активности сердца на фоне гипоксического воздействия.

Ключевые слова: гипоксия, кардиомиоциты, аритмогенез.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 6. С. 670—675. 2018

I. V. Kubasov,¹ D. E. Bobkov.² OPTICAL AND ELECTRICAL RESPONSES OF CARDIOMYOCYTES IN AN ISOLATED RAT HEART DURING DEVELOPMENT OF HYPOXIA. ¹Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the RAS, St. Petersburg, Russia; ²Institute of Cytology of the RAS, St. Petersburg, Russia, e-mail: kbasov_igor@mail.ru.

Calcium ions (Ca^{2+}) play a key role in the formation of electrical and contractile heart responses. The appearance of sporadic calcium waves propagating in subepicardial layers of the myocardium of an isolated rat heart was observed under hypoxia conditions by means of confocal laser scanning microscopy. Microelectrode mapping of the myocardial surface of an isolated heart under the same conditions showed that in addition to changing the shape of the recorded rhythmic extracellular action potentials, extrasystolic aberrant electric responses are formed. The obtained data testify to the possibility of involving an abnormal release of Ca^{2+} from the sarcoplasmic reticulum in the process of arrhythmogenic activity of the heart against a background of hypoxic action.

Key words: hypoxia, cardiomyocytes, arrhythmogenesis.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 6. P. 670—675. 2018

Интегральное освобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума (СР) вслед за распространяющимся по возбудимой мембране кардиомиоцитов потен-

циалами действия (ПД) является основным фактором, инициирующим сократительный ответ. При ряде неблагоприятных условий и/или при отдельных сердечных заболеваниях наблюдаются аномальные формы освобождения кальция из СР, что может являться причиной аритмогенеза [1]. Одной из форм такого аномального освобождения являются спонтанные пространственно-временные изменения уровня Ca^{2+} в цитоплазме (спорадические Ca^{2+} -волны), наблюдаемые как в изолированных кардиомиоцитах [2, 3], так и в опытах *in situ*, включая перфузируемое сердце [4, 5]. Однако источники этих волн, условия их появления, а также их роль и влияние на сердечную функцию изучены недостаточно. Известно, что гипоксия сердечной мышцы часто сопровождается тахикардией, групповыми экстрасистолами, приступами пароксизмального нарушения ритма. В какой степени указанные нарушения могут быть связаны с появлением Ca^{2+} -волн, остается неизвестным. Целью работы заключалась в выяснении, может ли гипоксия как один из факторов повреждения миокарда являться триггером спорадических Ca^{2+} -волн, и если так, то могут ли эти волны оказывать обратное влияние на электрическую активность интактных кардиомиоцитов в работающем сердце.

МЕТОДИКА

Все эксперименты проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с подопытными животными», утвержденными комиссией по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН. Крысы-самцы линии Вистар содержались в стандартных условиях вивария. Анестезию осуществляли внутривенным введением уретана (1000 мг/кг). Эксперименты проводились на изолированных сердцах крыс в условиях сохраненного синусового ритма, перфузируемых по методу Лангендорфа в соответствии с ранее описанной методикой [6, 7].

С использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 и микроэлектродной внеклеточной регистрации были выполнены исследования оптических и электрических ответов кардиомиоцитов субэпикардальных слоев миокарда правого желудочка при нормоксии (перфузия сердца аэрируемым раствором) и гипоксии (перфузия сердца неаэрируемым раствором). Скорость перфузии составляла 5—7 мл/мин. Удаление из экспериментальной камеры избыточного раствора осуществлялось через силиконовую трубочку диаметром 1 мм, подключенную к аспиратору. Для перфузии использовался раствор Тирода, содержащий (мМ): 140 NaCl, 4,5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 глюкоза, pH 7.2—7.4. Устранение сократительных ответов обеспечивалось добавлением в перфузирующий раствор блокатора миозиновой АТФазы бутанедионноксима (BDM, Sigma) в концентрации 20 мМ. Аэрация раствора осуществлялась карбогеном (5 % CO₂ и 95 % O₂). Все эксперименты проводились при комнатной температуре. Для регистрации электрических ответов использовалась описанная ранее авторская методика микроэлектродного картирования наружной поверхности миокарда — *narrow tipped pipettes loose patch* [6, 7] — с использованием микроэлектродов с диаметром кончика 5 мкм. Перемещение микроэлектрода, соединенного с входом усилителя AM-1500 (National Instruments, США), осуществлялось при помощи микроманипулятора NMH-21 (Narishige, Япония). Запись данных, хранение и обработка производилась при помощи аналого-цифрового преобразователя NI USB-6211 (National Instruments, США) и программного пакета Clampfit и Origin 7.5. В серии экспериментов с микроэлектродным картированием было исследовано 5 сердец, в каждом из которых было выполнено от 8 до 12 отведений от различных зон их правых желудочков с пошаговым смещением кончика микроэлектрода на 50—100 мкм. При проведении спектрального анализа с использованием конфокального микроскопа были выбраны участки поверхности миокарда правых желудочков размером 400 × 400 мкм от 3 изоли-

рованных сердец. Сердца помещались на специальные чашечки Петри. В выбранных участках производилась регистрация изменений интенсивности флуоресценции загруженного в сердце кальций-чувствительного красителя Fluo-4 во времени (режим хут) в течение 110 с с временным разрешением 25 кадров/с. Флуоресцентный сигнал измерялся в определенных областях интереса (region of interest, ROI), располагающихся, как правило, в пределах отдельных кардиомиоцитов. Представленные в тексте и на рисунках данные приведены в виде средних значений величин с их стандартными ошибками. Различия между значениями в контрольной и экспериментальной группах оценивали как достоверные при $p < 0.05$ (t -критерий Стьюдента).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опико-флуоресцентные исследования. В условиях нормоксии в кардиомиоцитах поверхности миокарда правых желудочков всех исследованных сердец наблюдались только интегральные кальциевые сигналы, соответствующие синусовому ритму (0.5—1 Гц). Через 15—20 мин после прекращения аэрации наблюдалось появление локальных зон повреждения, характеризующихся увеличенным числом кардиомиоцитов с повышенным содержанием ионов Ca^{2+} и формирующих, на фоне синусового ритма, спорадические Ca^{2+} -волны. На рис. 1 представлены примеры оптических имиджей эпикардального участка миокарда правого желудочка изолированного работающего сердца крысы при нормоксии и гипоксии. Интересно, что такие зоны повреждения носили «очаговый» характер и чередовались с зонами кардиомиоцитов, сохраняющих синусовый ритм освобождения Ca^{2+} , без формирования Ca^{2+} -волн. Частота спорадических волн к 30-й ми-

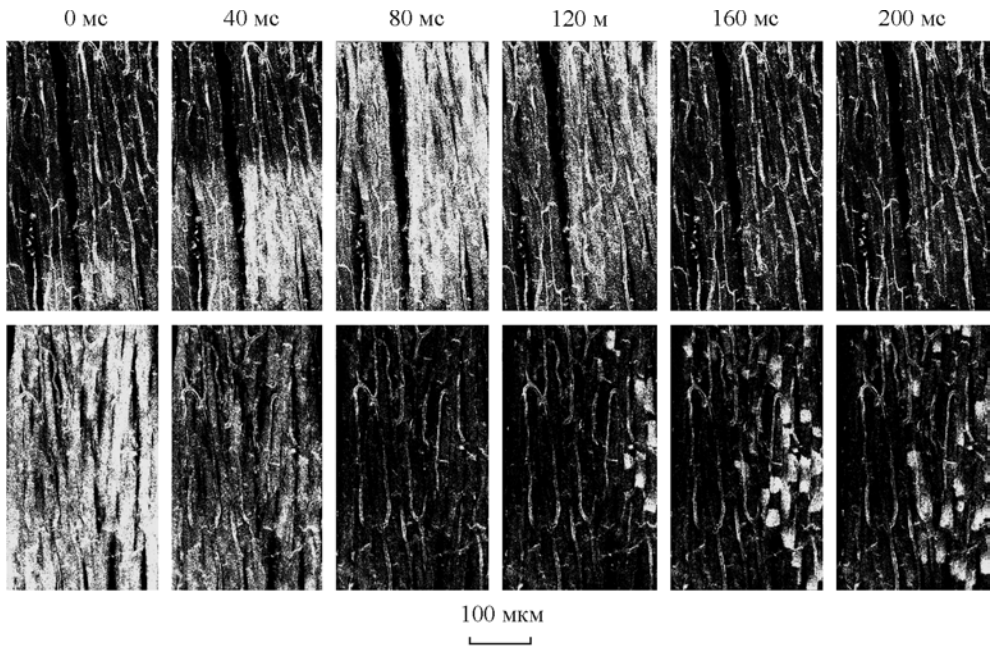


Рис. 1. Покадровая развертка видеоизображения оптических срезов эпикардального участка миокарда правого желудочка изолированного работающего сердца крысы при нормоксии (верхняя панель) и через 20 мин после начала гипоксии (нижняя панель). На трех последних кадрах нижней панели отчетливо видны кальциевые волны в индивидуальных кардиомиоцитах.

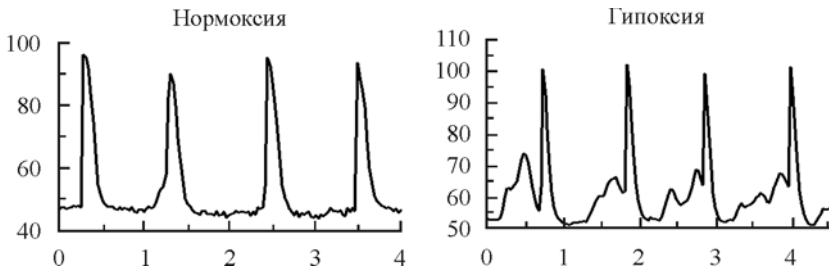


Рис. 2. Примеры записей амплитудно-временных характеристик кальциевых ответов в типичных областях интересов (ROI) участков миокарда правого желудочка изолированного сердца крысы при нормоксии и через 20 мин после начала гипоксии. В последнем примере отчетливо заметно появление спорадических кальциевых волн и укорочение спада систолических кальциевых ответов.

По вертикальной оси — время (интенсивность флуоресценции, усл. ед.); по горизонтальной оси — время, с.

ноте гипоксии составляла в среднем 2.6 ± 0.1 (3 сердца, 12 ROI) волн в секунду и сопровождалась повышением концентрации Ca^{2+} в цитозоле. Спорадические волны могли формироваться, распространяться и затухать как в пределах единичных кардиомиоцитов, так и распространяться от одного кардиомиоцита к другому как в поперечном, так и в продольном направлении. Эти волны появлялись, как правило, в зонах, максимально приближенных к зоне ишемического повреждения в среднем через 50—100 мс после завершения систолического выброса Ca^{2+} . Как показано на рис. 2, на фоне роста концентрация Ca^{2+} в цитозоле и появления Ca^{2+} -волн в кардиомиоцитах в условиях гипоксии наблюдалось существенное укорочение времени полуспада интегральных систолических кальциевых ответов. В среднем время полуспада интегральных систолических кальциевых ответов снижалось на фоне 30 мин гипоксии с 382 ± 42 до 212 ± 47 мс. Интенсивность флуоресценции Ca^{2+} -волн на этом фоне составляла в среднем $23 \pm 8\%$ (3 сердца, 23 ROI). Полученные результаты указывают на то, что гипоксия может являться не только триггером запуска спорадических Ca^{2+} -волн, но и то, что эти волны могут вызывать последующие аномалии в высвобождении кальция из СР на уровне интегральных ответов, инициированных распространяющимися ПД.

Микроэлектродные исследования. В различных зонах субэпикардиальных слоев миокарда правого желудочка в аэрируемом сердце регистрировались внеклеточные авторитмические ПД со средней амплитудой 6.1 ± 0.6 мВ (5 сердец, 42 регистрации от отдельных зон с шагом смещения кончика микроэлектрода 50—100 мкм). На рис. 3 представлены примеры записей последовательных микроэлектродных регистраций ПД от трех различных сайтов на поверхности миокарда правого желудочка одного и того же сердца в контроле и на фоне 30 мин гипоксического воздействия. Видно, что в контроле амплитудно-временные характеристики регистрируемых ПД практически не зависят от зоны их регистрации. При развитии гипоксии на фоне сохраняющегося синусового ритма внеклеточных ПД в отдельных зонах миокарда наблюдалось появление экстрастиольных aberrantных электрических ответов, существенно варьирующих в зависимости от локализации кончика микроэлектрода. По мере увеличения времени гипоксии приходило достоверное снижение амплитуды регистрируемых ПД синусового ритма. На 30-й минуте гипоксии амплитуда ПД снижалась до $84.4 \pm 8\%$ по отношению к контролю (5 сердец, 36 и 27 зон регистрации соответственно). Одновременно наблюдалось увеличение их длительности (до $133.1 \pm 7\%$ к контролю) как за счет увеличения длительности восходящей фазы, так и

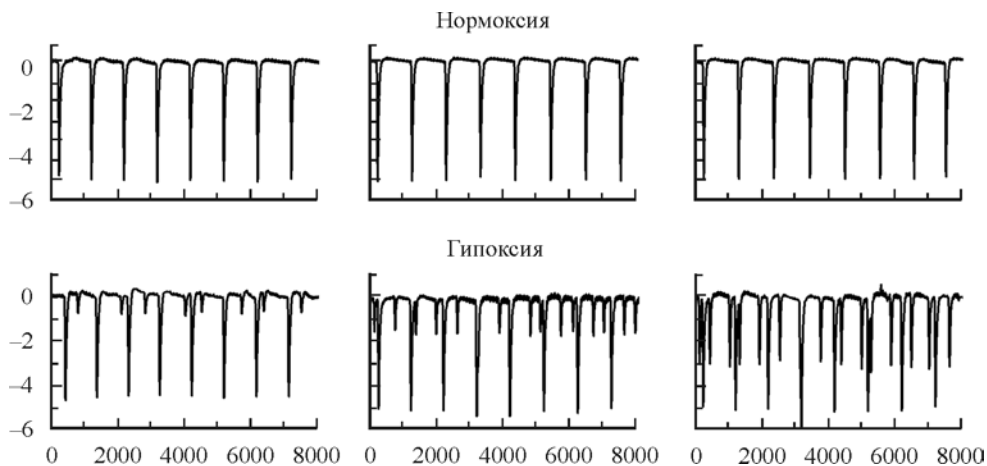


Рис. 3. Примеры записей внеклеточных ПД, последовательно регистрируемых от трех различных зон наружной поверхности миокарда правого желудочка при нормоксии и через 30 мин после начала гипоксии.

По вертикальной оси — время (амплитуда, мВ); по горизонтальной оси — время, мс.

за счет увеличения длительности фазы спада. Одновременно наблюдался рост амплитуды экстрасистольных ответов и переход от их эпизодического характера к ритмогенному. При этом частота ведущего синусового ритма практически не менялась.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Многочисленные исследования показывают, что нарушение баланса между утечкой и обратным захватом кальция может быть предшественником многих патологических состояний, в том числе ведущих к появлению аритмогенных кальциевых волн [5, 11]. На основании полученных данных можно прийти к заключению, что гипоксия является одним из таких состояний, вызывающих аномальное освобождение кальция, и проявляющееся в виде распространяющихся по кардиомиоцитам и между ними спорадических кальциевых волн. Появление таких волн происходит на фоне увеличения концентрации Ca^{2+} в цитоплазме, что соответствует данным других авторов [1, 4, 8]. Увеличение цитоплазматического Ca^{2+} при гипоксическом воздействии можно связывать с растущим дефицитом АТФ и как следствие замедлением скорости обратного захвата Ca^{2+} за счет снижения продуктивности работы Ca^{2+} -АТФазы СР (SERCA2).

Эти волны могут дополнительно повышать электрогенную активность мембраны кардиомиоцитов и, вероятно, служить в качестве субстрата для формирования сердечного аритмогенеза. Предположительно такие изменения могут быть обусловлены активацией электрогенного $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника (NCX) [2, 3], ведущей к увеличению скорости экструзии Ca^{2+} из цитоплазмы (и соответственно к наблюдаемому нами укорочению времени спада флуоресцентного кальциевого сигнала). Одновременно в силу электрогенного характера NCX возникают дополнительные входящие трансмембранные Na^+ -токи и инициирующие повторные ответы. Однако более детальный анализ механизмов, лежащих как в основе появления спорадических кальциевых волн, так и аберрантных электрических ответов, нуждается в проведения дальнейших исследований. В частности, можно предположить, что блокирование или ограничение активности

NCX-обменника может снижать аритмогенные проявления при гипоксических воздействиях.

Работа выполнена в рамках темы госзадания № АААА-А18-118012290371-3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] *Ishide N., Urayama T., Inoue K., Komaru T., Takishima T.* Propagation and collision characteristics of calcium waves in rat myocytes. *Am. J. Physiol.* 259: H940—H950. 1990.
- [2] *Hove-Madsen L., Llach A., Bayes-Genís A., Roura S., Rodriguez Font E., Arís A., Cincica J.* Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes. *Circulation.* 110 (11): 1358—1363. 2004.
- [3] *Heijman J., Voigt N., Nattel S., Dobrev D.* Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression. *Circul. Res.* 114(9):1483—1499. 2014.
- [4] *Kaneko T., Tanaka H., Oyamada M., Kawata S., Takamatsu T.* Three distinct types of Ca²⁺ waves in Langendorff-perfused rat heart revealed by real-time confocal microscopy. *Circul. Res.* 86: 1093—1099. 2000.
- [5] *Ter Keurs H. E., Wakayama Y., Sugai Y., Price G., Kagaya Y., Boyden P. A., Miura M., Stuyvers B. D.* Role of sarcomere mechanics and Ca²⁺ overload in Ca²⁺ waves and arrhythmias in rat cardiac muscle. *Ann. N. Y. Sci.* 1080: 248—267. 2006.
- [6] *Kubasov I. V., Stepanov A. V., Györke S.* Action potential heterogeneity as revealed by extracellular microelectrode recording from the surface of the isolated rat heart. *Zhurn. Evol. Biokh. Fiziol.* 53(6): 456—459. 2017.
- [7] *Kubasov I. V., Stepanov A., Bobkov D., Radwanski P. B., Terpilowski M. A., Dobretsov M., Györke S.* Sub-cellular electrical heterogeneity revealed by loose patch recording reflects differential localization of sarcolemmal ion channels in intact rat hearts. *Front. Physiol.* 9:61. 2018.
- [8] *Minamikawa T., Cody S. H., Williams D. A.* In situ visualization of spontaneous calcium waves within perfused whole heart by confocal imaging. *Am. J. Physiol.* 272: H236—H243. 1997.
- [9] *Stables C. L., Curtis M. J.* Development and characterization of a mouse in vitro model of ischemia induced ventricular fibrillation. *Cardiovasc. Res.* 83: 397—404. 2009.
- [10] *Takamatsu T., Wier W. G.* Calcium waves in mammalian heart: quantification of origin, magnitude, and velocity. *FASEB J.* 4: 1519 —1525. 1990.
- [11] *Wakayama Y., Miura M., Stuyvers B. D., Boyden P. A., ter Keurs H. E.* Spatial nonuniformity of excitation-contraction coupling causes arrhythmogenic Ca²⁺ waves in rat cardiac muscle. *Circul. Res.* 96: 1266—1273. 2005.

Поступила 19 IV 2018