

КИНЕТИКА ЦИТОЗОЛЬНОГО КАЛЬЦИЯ В МИОКАРДЕ ПРАВОГО ЖЕЛУДОЧКА МОРСКОЙ СВИНКИ И КРЫСЫ

© 2016 г. О.Н. Лукин, Ю.Л. Проценко

Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, 620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

E-mail: o.lookin@iip.uran.ru

Поступила в редакцию 06.10.15 г.

Сопоставлены характеристики развития и спада силы и кальциевого перехода в трабекулах правого желудочка морской свинки и крысы в изометрическом режиме сокращения при разных преднагрузках. Измерения проведены при различных температурах физиологического раствора, а также при ингибировании основных механизмов выведения кальция из цитозоля – Na^+ - Ca^{2+} -обмена и АТФ-зависимого Ca^{2+} -насоса саркоплазматического ретикулума (SERCA2a). Впервые показано, что в миокарде морской свинки увеличение температуры с 25 до 30°C приводит к возникновению фазы кратковременного замедления спада кальциевого перехода (фаза «bump»), которая ранее была описана только в миокарде крысы, а при повышении температуры до 35°C фаза «bump» вырождается в фазу «плато» кальциевого перехода. В миокарде крысы влияние температуры на характер спада кальциевого перехода практически отсутствует. Напротив, последовательное растяжение трабекулы правого желудочка крысы сопровождается возникновением и градуальным усилением выраженности фазы «bump» (амплитуда, интегральная интенсивность, длительность), тогда как в миокарде морской свинки этот эффект преднагрузки отсутствует. Избирательное ингибирование реверсного режима работы Na^+ - Ca^{2+} -обмена не влияет на характеристики спада кальциевого перехода в миокарде морской свинки. Избирательное ингибирование SERCA2a в миокарде морской свинки и крысы значительно модифицирует фазу спада кальциевого перехода и приводит к возникновению или усилению фазы «bump» в миокарде этих видов животных. Характеристики этой фазы могут быть использованы для количественной оценки длинозависимой активации сокращения миокарда.

Ключевые слова: миокард, кальциевый переход, температура, преднагрузка, натрий-кальциевый обменный механизм, АТФ-зависимый Ca^{2+} -насос мембраны саркоплазматического ретикулума.

Наряду с другими механизмами, регуляция кинетики свободного внутриклеточного кальция в одиночном цикле сокращение–расслабление сердечной мышцы играет ключевую роль в реализации феномена Франка–Старлинга – зависимости конечно-систолического выброса желудочка от его конечно-диастолического наполнения. В изолированных препаратах миокарда этот феномен проявляется в связи между степенью растяжения мышцы (преднагрузкой) и силой ее сокращения. Молекулярную основу феномена Франка–Старлинга составляют: а) изменение количества доступных мест связывания миозина с актином при изменении степени перекрытия актин-миозиновых филаментов [1],

б) изменение кинетики связывания регуляторного белка тропонина С (ТnC) с ионами кальция, в том числе за счет кооперативных эффектов [2,3], в) изменение функции обменных механизмов, участвующих в регуляции ионного баланса [4,5]. Помимо этого, вклад в реализацию длинозависимого изменения силы сокращения сердечной мышцы вносят: изменение кинетики циклирования поперечных миозиновых мостиков [6,7], структурные изменения молекулы миозина [8], дополнительная сенситизация контрактильных белков к кальцию за счет гигантского белка титина [9]. При этом основным регулятором длинозависимой активации сократимости миокарда являются кооперативные эффекты, которые реализуются как за счет увеличения сродства ТnC к кальцию при наличии соседних уже активированных кальцием молекул ТnC, так и за счет увеличения вероятности образования актин-миозиновой связи при наличии в непосредственной близости сильно связанных (т.е. силогенерирующих) поперечных

Сокращения: ТnC – тропонин С; SERCA2a – АТФ-зависимый кальциевый насос мембраны саркоплазматического ретикулума клетки, сердечная изоформа; «bump» – фаза кратковременного замедления спада кальциевого перехода; CaT – кальциевый переход (calcium transient), ВДМ – время достижения максимума.

миозиновых мостиков [2,3,10]. Так как ионы Ca^{2+} являются ключевым «посредником» в реализации актин-миозинового взаимодействия, характер изменения концентрации Ca^{2+} в цитозоле непосредственно влияет на связь между степенью растяжения сердечной клетки и ее сократимостью. И наоборот, степень растяжения сердечной мышцы (преднагрузка) влияет на кинетику утилизации ионов кальция кон-трактильными белками.

Расслабление миокарда является важной составляющей одиночного цикла сокращения и обеспечивается различными механизмами выведения несвязанного кальция из цитозоля у разных видов теплокровных животных. У крыс основным механизмом экстррузии кальция из цитозоля является АТФ-зависимый кальциевый насос мембраны саркоплазматического ретикула (SERCA2a), обеспечивающий до 92% всего количества выводимого из цитозоля кальция (этот кальций остается внутри клетки), а остальные 8% приходятся на натрий-кальциевый обменный механизм (Na^+ - Ca^{2+} -обмен) и Ca^{2+} -АТФазный насос плазматической мембраны (в этом случае кальций выводится из клетки), а также на митохондриальный кальциевый транспорт [11–13]. В кардиомиоцитах морской свинки SERCA2a обеспечивает выведение 50–80% кальция (в зависимости от внешних условий), в то время как доля кальция, выводимого посредством Na^+ - Ca^{2+} -обмена, составляет 20–50%; при этом Ca^{2+} -АТФазный насос плазматической мембраны также принимает заметное участие в выведении кальция из цитозоля [13,14]. Не только соотношение вкладов, но и кинетические свойства SERCA2a и Na^+ - Ca^{2+} -обмена различны у разных видов животных. Например, в миокарде крысы SERCA2a функционирует в два–три раза быстрее, чем в миокарде кролика, в то время как обратная ситуация наблюдается в отношении скорости работы Na^+ - Ca^{2+} -обмена [11]. Поэтому падение концентрации несвязанного цитозольного кальция в ходе расслабления в миокарде крысы протекает существенно быстрее, чем в миокарде других животных (морской свинки, кролика, собаки). Соотношение механизмов выведения кальция из цитозоля меняется в зависимости от внешних условий, например температуры. В миокарде кролика относительный вклад SERCA2a/ Na^+ - Ca^{2+} -обмена в выведение кальция из цитозоля составляет соответственно 70/27% при температуре 25°C и 74/23% при 35°C [15]. Напротив, повышение температуры с 24 до 37°C увеличивает относительный вклад Na^+ - Ca^{2+} -обмена в выведение кальция из цитозоля в миокарде крысы (с 6 до 7,5%) и очень значительно в миокарде мор-

ской свинки (с 21 до 52%), за счет соответствующего уменьшения вклада SERCA2a [13].

Отсутствуют данные о влиянии преднагрузки непосредственно на функцию SERCA2a или Na^+ - Ca^{2+} -обмена, хотя расслабление сердечной мышцы (у разных видов животных) значительно зависит от степени ее растяжения. На изолированных мышечных полосках показано, что изменение длины сердечной мышцы сопровождается изменением амплитуды кальциевого перехода [16–18]. Поэтому цель работы состояла в сравнении эффектов температуры и преднагрузки на характеристики изометрического сокращения и кальциевого перехода в миокарде правого желудочка крыс и морских свинок. Наряду с изменением температуры раствора, которое является неизбирательным воздействием на функцию SERCA2a и Na^+ - Ca^{2+} -обмена, мы использовали вещества, селективно ингибирующие эти механизмы.

Обнаружен принципиально разный эффект температуры и преднагрузки на характер спада кальциевого перехода в миокарде правого желудочка крысы и морской свинки. Впервые показан эффект кратковременного замедления спада кальциевого перехода (фаза «bump») в миокарде морской свинки при ингибировании АТФ-зависимого Ca^{2+} -насоса саркоплазматического ретикула. Таким образом, наряду с общностью существует и выраженная видовая специфика кальциевой регуляции сократимости миокарда, а внешние факторы (преднагрузка, температура) по-разному влияют на механизмы выведения кальция из цитозоля в миокарде теплокровных животных разных видов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на изолированных трабекулах правого желудочка сердец здоровых морских свинок ($n = 20$) и крыс линии Вистар ($n = 12$) обоего пола в возрасте трех месяцев. Все манипуляции с подопытными животными соответствовали международным правилам обращения с лабораторными животными и были одобрены комиссией по контролю за лабораторными животными в Институте иммунологии и физиологии УрО РАН.

Животным внутримышечно вводили миорелаксант (рометар, 1 мл/кг), анестетик (золетил, 0,02 мл/кг) и гепарин (1000 Ед/кг). Спустя 15 мин животное подвергали эвтаназии путем цервикальной дислокации, затем извлекали сердце и помещали его в препаративную ванну с раствором Кребса–Хенселейта (в мМ): $\text{NaCl} - 118$, $\text{KCl} - 4,7$, $\text{MgSO}_4 - 1,2$, $\text{NaHCO}_3 - 14,5$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1,2$, $\text{CaCl}_2 - 2,5$, глюкоза – 11,1,

pH 7,35. Для предотвращения повреждения препарата при его иссечении в препаровальный раствор добавляли 2,3-бутандион моноксим (30 мМ). Из правого желудочка сердца иссекали тонкие трабекулы (диаметр < 300 мкм, длина 1–3 мм). Препарат перемещали в экспериментальную ванну с проточным раствором Кребса–Хенселейта при постоянном его насыщении смесью 95% O₂ и 5% CO₂. Один конец мышцы фиксировали клипсой к штоку датчика силы, другой конец – к штоку линейного сервомотора длины. После фиксации препарата в экспериментальной ванне включали электрическую стимуляцию с частотой 0,33 Гц в течение 30 мин. Затем в физиологический раствор добавляли кальцийсвязывающий флюорофор fura-2 в форме сложного эфира (Fura-2/AM) в концентрации 5 мкМ/л. Перфузию этим раствором производили в течение одного часа при комнатной температуре и частоте электрической стимуляции 0,2 Гц, затем его заменяли на раствор Кребса–Хенселейта без флюорофора. Измерения начинали после полного удаления остатков флюорофора из омывающего раствора.

Биомеханические измерения и оптическую регистрацию свечения флюорофора Fura-2/AM в многоклеточном препарате выполняли с помощью системы для исследования мышечной активности (Muscle Research System, Scientific Instruments GmbH, Гейдельберг, Германия) на базе инвертированного эпифлюоресцентного микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия). Для оптического возбуждения флюорофора использовали широкополосную ртутную лампу и систему вращающихся узкополосных светофильтров с длиной волны пропускания 340 и 380 нм (Scientific Instruments GmbH, Гейдельберг, Германия). Для регистрации излучения флюорофора использовали светоделительный кубик с полосой пропускания 510/590 нм (FilterSet #21NE, Carl Zeiss, Германия). Одновременную регистрацию сократительного ответа мышцы и интенсивности свечения флюорофора проводили в псевдореальном масштабе времени с помощью АЦП/ЦАП (PCI-1716S, AdLink Technology Inc., Тайвань) и программного обеспечения, функционирующего в подсистеме реального времени HyperKernel (Arc Systems Ltd., Япония), интегрированной в ОС Windows XP, что позволило обеспечивать сбор информации и управление периферийными устройствами с дискретностью 0,1 мс.

Для задания одной и той же относительной степени растяжения (преднагрузки) в различных мышечных препаратах с исходно разной длиной определяли длину мышцы, при которой она развивала максимальную амплитуду изометри-

ческой силы; эту длину обозначали как L_{\max} и в дальнейшем преднагрузку задавали в процентах от этой длины. Силу изометрического сокращения и интенсивность свечения флюорофора Fura-2/AM в периодически стимулируемом многоклеточном препарате сердечной мышцы регистрировали одновременно, в условиях задания различной температуры физиологического раствора и/или величины преднагрузки. Измерения проводили при базовой частоте электрической стимуляции 1 Гц, температуре физиологического раствора 25°C (контрольное состояние), 30 или 35°C и при задании преднагрузки, равной 85 или 95% L_{\max} . Увеличение температуры раствора рассматривалось как неизбирательное воздействие, одновременно меняющее функциональную активность SERCA2a и Na⁺-Ca²⁺-обмена. Для избирательного подавления функции Na⁺-Ca²⁺-обмена использовали ингибиторы SN-6 и KB-R7943 в концентрации 50 и 10 мкМ/л соответственно. Для избирательного подавления функции SERCA2a использовали тапсигаргин в концентрации 10 мкМ/л; этот агент не воздействует на сарколеммальный транспорт кальция или на кальцийвысвобождающие каналы саркоплазматического ретикулума. В экспериментах были использованы реагенты компании Sigma-Aldrich (США), за исключением SN-6 и KB-R7943 (Tocris Bioscience, Великобритания).

Влияние внешних факторов (температура, преднагрузка) и избирательных воздействий, меняющих функциональную активность внутриклеточных механизмов выведения кальция из цитозоля, оценивали путем анализа ряда характеристик развития и спада изометрического напряжения и кальциевого перехода (CaT). Изометрическое напряжение вычисляли по исходному сигналу силы сокращения мышцы и площади ее поперечного сечения, которую определяли по формуле $S = \pi d^2/4$, где d – средний диаметр мышцы в нерастянутом состоянии. CaT определяли как временную характеристику отношения интенсивностей свечения флюорофора Fura-2, полученных на длине волны 510 нм при возбуждении длиной волны 340 и 380 нм ($F = F_{340}/F_{380}$), и анализировали эту характеристику в виде F/F_0 , где F_0 – конечно-диастолический уровень кальциевого перехода, измеренный в нерастянутой мышце ($F_0 = F_{340(\text{нераст})}/F_{380(\text{нераст})}$). При анализе определяли амплитуду, максимальную скорость развития, время достижения максимума, максимальную скорость спада, время спада от максимума до половины амплитуды и полную длительность сокращения и CaT. Максимальные скорости развития и спада напряжения/CaT вычисляли в нормированном на

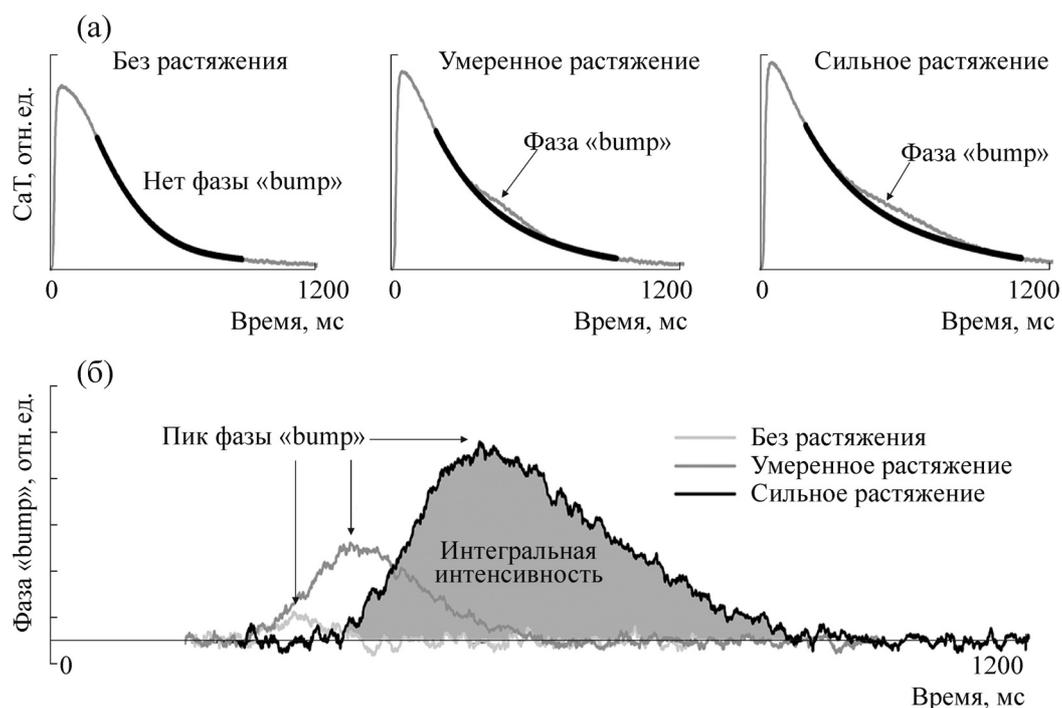


Рис. 1. Определение фазы «bump» на участке кривой спада кальциевого перехода. (а) – При последовательном растяжении трабекулы правого желудочка крысы на участке спада CaT все более отчетливо проявляется фаза кратковременного замедления этого спада (фаза «bump», показана стрелкой). Эта фаза определяется как отклонение исходного сигнала CaT (тонкая серая линия) от монотонной составляющей его спада (жирная черная линия). (б) – Амплитуда, интегральная интенсивность, время достижения максимального отклонения (пик) и полная длительность фазы «bump» существенно зависят от степени растяжения мышцы.

амплитуду напряжения/CaT виде. Время достижения максимума (ВДМ) напряжения/CaT определяли как интервал времени между заданием раздражающего электрического стимула и пиком соответствующего сигнала. Время спада напряжения/CaT от пика до половины амплитуды (T_{50}) определяли как интервал времени между моментом достижения максимума соответствующего сигнала и моментом его спада до половины амплитуды. Полную длительность напряжения/CaT определяли как интервал времени между заданием раздражающего стимула и снижением соответствующего сигнала до уровня не более 2% от амплитуды сигнала.

В ряде измерений мы наблюдали фазу кратковременного замедления спада CaT, когда исходный сигнал CaT отклонялся от монотонной составляющей его спада (так называемая фаза «bump», рис. 1а). Временной ход этой фазы показан на рис. 1б. Для количественного анализа степени выраженности фазы «bump» применяли собственную методику расчета. Амплитуду фазы «bump» определяли как максимальное отклонение кривой спада исходного CaT от его монотонного спада. Интегральную интенсивность фазы «bump» (суммарное изменение во времени) оценивали по величине пло-

щади под кривой, описывающей эту фазу (рис. 1б). При анализе мы нормировали абсолютное значение амплитуды или интегральной интенсивности фазы «bump» на амплитуду или интегральную интенсивность CaT (площадь под кривой CaT), соответственно. Время достижения максимума (ВДМ) фазы «bump» определяли как интервал времени между ВДМ CaT (т.е. начальным моментом спада CaT) и моментом максимального отклонения исходного CaT от монотонной составляющей его спада. Наконец, полную длительность фазы «bump» определяли как интервал времени между ВДМ CaT и моментом устойчивого совпадения кривых исходного CaT и его монотонного спада.

Для оценки значимости различий между средними значениями характеристик кальциевого перехода (амплитуда, ВДМ и т.д.), полученными при одной и той же преднагрузке и различных температурах раствора, использовали критерий Манна–Уитни. Для оценки значимости различий между средними значениями характеристик кальциевого перехода, полученными при воздействии ингибиторов Na^+ - Ca^{2+} -обмена или SERCA2a, применяли двухсторонний t -критерий. Эффекты считались значимыми при $P < 0,05$. Данные приведены как среднее

Сопоставление качественных эффектов температуры и преднагрузки на характеристики изометрического напряжения в трабекулах правого желудочка морской свинки

Характеристика	Температура (25°C → 30°C → 35°C)		Преднагрузка	
	Морская свинка	Крыса	Морская свинка	Крыса
Амплитуда	↓	↓	↑	↑
Максимальная скорость развития	↑	↑	↓	↓
Время достижения максимума (ВДМ)	↓	↓	↑	↑
Максимальная скорость расслабления	↑	↑	=	↓
Время спада от максимума до половины амплитуды (T_{50})	↓	↓	=	↑
Длительность	↓	↓	↑	↑

Примечание. Направление стрелки указывает изменение величины характеристики при действии фактора: ↓ – уменьшение, ↑ – увеличение.

арифметическое ± стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние температуры и преднагрузки на характеристики изометрического напряжения. В таблице приведено сравнение эффектов повышения температуры раствора и увеличения степени растяжения мышцы (преднагрузки) на характеристики изометрического напряжения в трабекулах правого желудочка крысы и морской свинки. Рост температуры или увеличение преднагрузки качественно одинаково влияют на характеристики изометрического сокращения в миокарде крысы и морской свинки. Отличия проявляются в том, что фаза расслабления слабо чувствительна к преднагрузке в миокарде морской свинки, но не у крысы. Это связано со слабой чувствительностью фазы спада кальциевого перехода в кардиомиоцитах правого желудочка морских свинок к преднагрузке (см. следующий подраздел).

Влияние температуры и преднагрузки на характеристики кальциевого перехода. *Миокард правого желудочка морской свинки.* Характеристики кальциевого перехода в препаратах миокарда морской свинки также менялись в зависимости от температуры раствора. При любой степени растяжения мышцы увеличение температуры раствора с 25°C (контроль) до 35°C приводило к значимому уменьшению амплитуды кальциевого перехода (например, для преднагрузки 95% L_{max} – с $0,23 \pm 0,02$ до $0,15 \pm 0,02 F/F_0$, $P < 0,05$), хотя при промежуточной температуре (30°C) достоверных отличий от контроля не зафиксировано (рис. 2а). Не было выявлено достоверного эффекта температуры на нормированную (на амплитуду CaT) вели-

чину максимальной скорости развития CaT (рис. 2б) и время достижения максимума CaT (рис. 2в). Однако характеристики спада CaT существенно менялись с повышением температуры. Нормированная величина максимальной скорости спада CaT значимо увеличивалась с ростом температуры и для любой преднагрузки была почти вдвое выше при 35°C, чем при температуре 25°C (рис. 2г). Время спада CaT от пика до половины амплитуды во всем диапазоне исследованных преднагрузок не отличалось достоверно при температурах 25 и 30°C, но при температуре 35°C было достоверно ниже контроля (рис. 2д). Например, для преднагрузки 95% L_{max} время спада от пика CaT до половины амплитуды уменьшилось с $223,1 \pm 7,6$ мс при контрольной температуре до $142,5 \pm 11,9$ мс при 35°C ($P < 0,05$). Длительность фазы спада CaT также достоверно уменьшалась с ростом температуры. Поэтому общая длительность CaT, определяемая как интервал времени между началом стимуляции и завершением спада CaT до конечно-диастолического уровня, достоверно уменьшалась при последовательном увеличении температуры раствора (рис. 2е). Так, для преднагрузки, равной 95% L_{max} , полная длительность CaT составляла 648 ± 16 мс при 25°C (контроль), при 30°C – падала до 572 ± 11 мс (на 12% относительно контроля, $P < 0,05$), а при 35°C – падала до 488 ± 26 мс (на 25% относительно контроля, $P < 0,05$). Следует отметить, что отношение ВДМ к длительности CaT при температуре 35°C было достоверно выше среднего значения при контрольной температуре, что свидетельствует о более выраженном температурном эффекте на внутриклеточные механизмы выведения несвязанного кальция из цитозоля (спад CaT), нежели чем

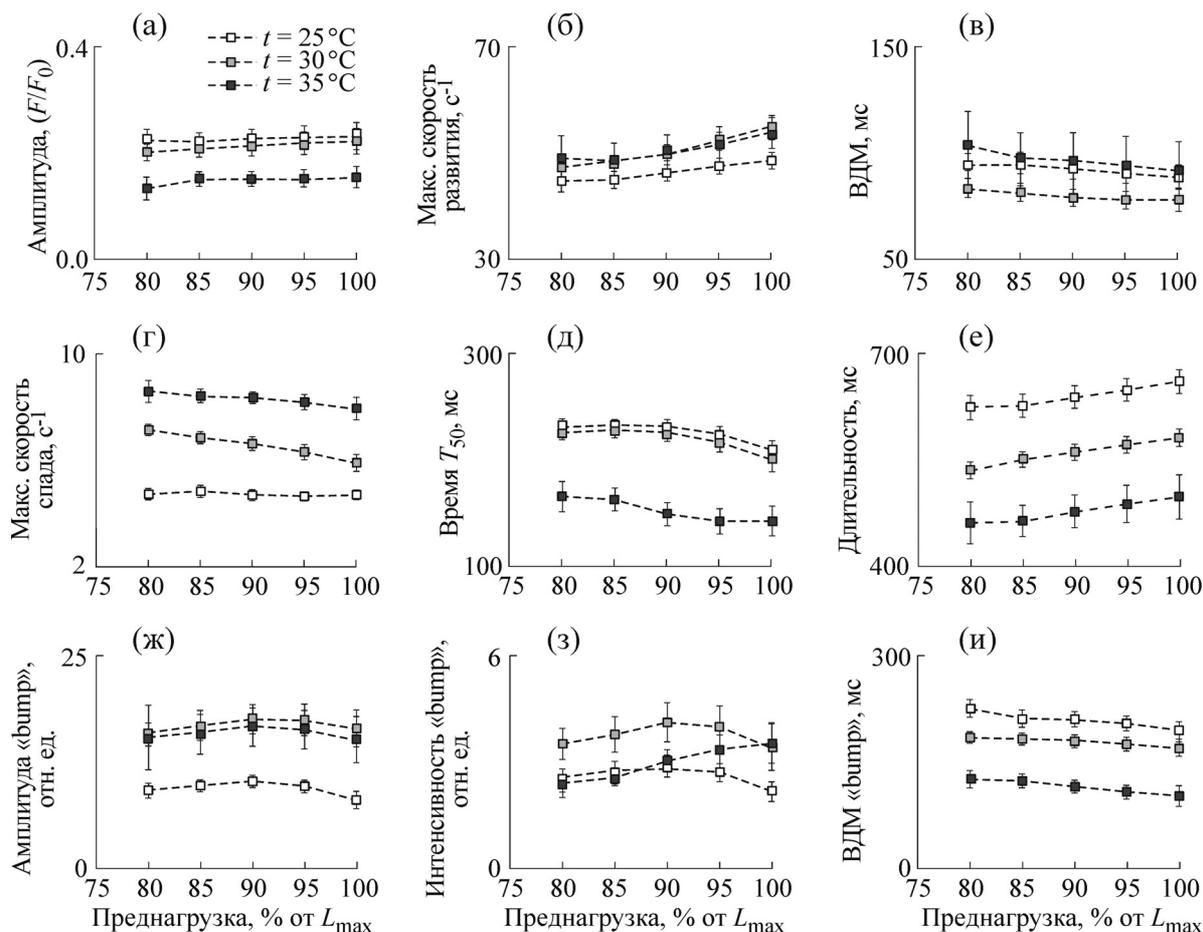


Рис. 2. Влияние температуры и преднагрузки на характеристики роста и спада кальциевого перехода в трабекулах правого желудочка морской свинки: (а) – амплитуда CaT; (б) – максимальная скорость развития CaT, нормированная на амплитуду CaT; (в) – время достижения максимума CaT; (г) – максимальная скорость спада CaT, нормированная на амплитуду CaT; (д) – время спада CaT от максимального значения до половины амплитуды (T_{50}); (е) – длительность CaT; (ж) – амплитуда фазы «bump» (нормированная на амплитуду CaT); (з) – интегральная интенсивность фазы «bump» (нормированная на площадь под кривой CaT); (и) – время достижения максимума фазы «bump». Зависимости получены при температурах омывающего раствора 25°C (контроль), 30 и 35°C. Преднагрузка (степень растяжения мышцы) приведена в процентах от L_{\max} . Данные приведены как среднее \pm ошибка среднего. Условные обозначения общие для всего рисунка.

на механизмы поступления кальция в цитоплазму (рост CaT).

Амплитуда фазы «bump», нормированная на амплитуду CaT, при температурах 30 и 35°C оказалась достоверно выше, чем при контрольной температуре 25°C, для любого значения преднагрузки (рис. 2ж). При этом величина интегральной интенсивности фазы «bump» была достоверно выше контрольных значений только при промежуточной температуре 30°C (рис. 2з). Наконец, сильное температурно-зависимое снижение найдено для среднего значения времени достижения максимума фазы «bump» при любой величине преднагрузки (рис. 2и). Например, для преднагрузки 95% L_{\max} среднее значение ВДМ фазы «bump» составляло $208,9 \pm 10,8$ мс

при 25°C (контроль), $178,6 \pm 9,9$ мс при 30°C (снижение относительно контроля на 14,5%, $P < 0,05$) и $109,8 \pm 10,9$ мс при 35°C (снижение относительно контроля на 47,4%, $P < 0,05$).

При температурах раствора 25, 30 или 35°C не было зафиксировано достоверных изменений амплитуды, максимальной скорости развития и времени достижения максимума кальциевого перехода при увеличении преднагрузки, хотя имелась тенденция к ускорению фазы роста кальциевого перехода (рис. 2а–в). Нормированная величина максимальной скорости спада CaT зависела от величины преднагрузки только при промежуточной температуре 30°C (среднее значение достоверно уменьшилось с $7,1 \pm 0,2$ с⁻¹ при 80% L_{\max} до $5,9 \pm 0,3$ с⁻¹ при L_{\max} , т.е. на

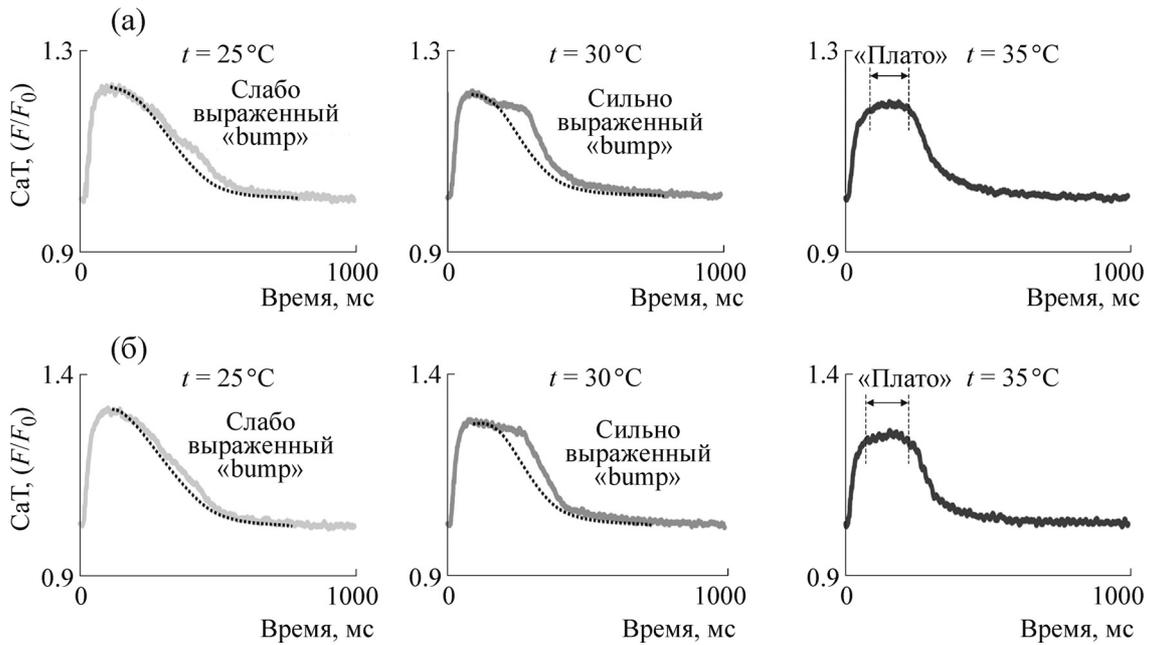


Рис. 3. Влияние температуры омывающего раствора на характеристики спада кальциевого перехода в трабекулах правого желудочка морской свинки: (а) – при малой ($85\% L_{\max}$) и (б) – большой ($95\% L_{\max}$) преднагрузках. Показаны репрезентативные кривые CaT, полученные в одном и том же препарате при различной температуре омывающего раствора (значения указаны на диаграммах). Пунктирные кривые описывают монотонную фазу спада CaT. При контрольной температуре (25°C) на кривой спада CaT фаза кратковременного замедления этого спада (фаза «bump») выражено слабо, при промежуточной температуре (30°C) фаза «bump» выражена отчетливо, при высокой температуре (35°C) фаза «bump» вырождается в фазу «плато».

17%), но не при контрольной или высокой температурах (рис. 2г). Время спада CaT от пика до половины амплитуды слабо уменьшалось, а полная длительность CaT – слабо увеличивалась с ростом величины преднагрузки (рис. 2д и 2е соответственно). Достоверный прирост среднего значения полной длительности CaT при увеличении длины мышцы с $80\% L_{\max}$ до L_{\max} имелся только при промежуточной температуре 30°C , и этот прирост составил $\sim 8\%$. При любой температуре нормированная величина амплитуды и интегральной интенсивности фазы «bump» слабо зависели от преднагрузки, имея тенденцию к достижению максимальной величины при физиологической преднагрузке (рис. 2ж и 2з соответственно). Время достижения максимума фазы «bump» достоверно не изменялось при вариации преднагрузки, хотя при исследованных температурах этот параметр имел отчетливую тенденцию к снижению в ходе увеличения преднагрузки (рис. 2и).

На рис. 3 представлены репрезентативные кривые кальциевых переходов, зарегистрированные в одной и той же трабекуле правого желудочка морской свинки при задании малой ($85\% L_{\max}$) или большой ($95\% L_{\max}$) преднагрузки при различных температурах омывающего раствора. Видно, что преднагрузка почти

не влияет на характер спада CaT, в то время как температура значительно изменяет этот характер. При контрольной температуре (25°C) спад CaT имел почти монотонный характер, независимо от степени растяжения мышцы. При промежуточной температуре (30°C) на кривой спада CaT отчетливо проявлялась фаза кратковременного замедления этого спада (фаза «bump»), вне зависимости от того, слабо или сильно растянута мышца. Наконец, при высокой температуре (35°C) в ходе развития CaT отчетливо проявлялась фаза «плато» кальциевого перехода, за которой уже следует монотонный спад CaT. И в этом случае величина преднагрузки не влияла на характер спада CaT (рис. 3).

Миокард правого желудочка крысы. В отличие от миокарда правого желудочка морской свинки, в трабекулах правого желудочка крыс рост температуры раствора не приводил к достоверному изменению амплитуды кальциевого перехода, какова бы ни была исходная преднагрузка (CaT, рис. 4а). При этом повышение температуры вызывало достоверное увеличение максимальной скорости развития CaT и уменьшение времени достижения максимума CaT (рис. 4б и 4в), а также достоверное увеличение максимальной скорости спада CaT (рис. 4г),

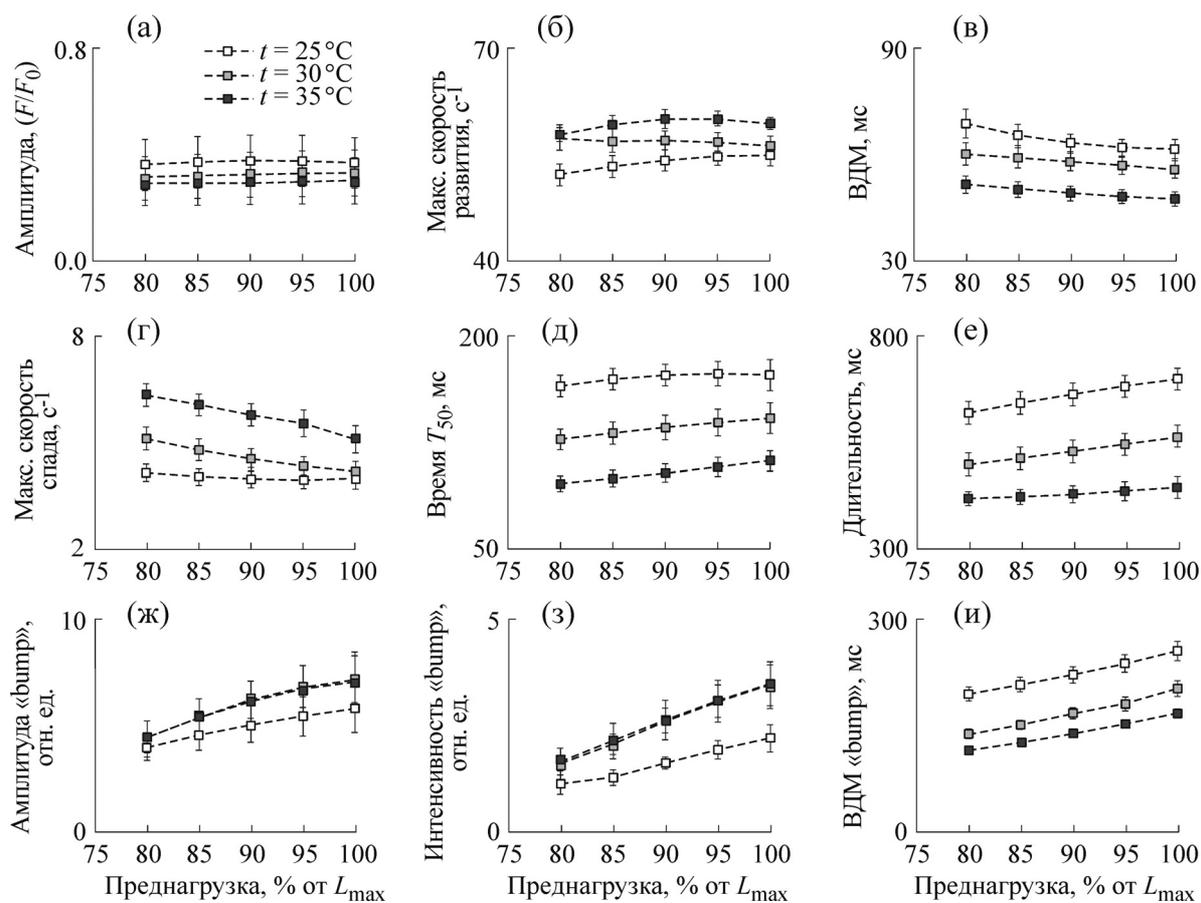


Рис. 4. Влияние температуры и преднагрузки на характеристики роста и спада кальциевого перехода в трабекулах правого желудочка крысы: (а) – амплитуда CaT; (б) – максимальная скорость развития CaT, нормированная на амплитуду CaT; (в) – время достижения максимума CaT; (г) – максимальная скорость спада CaT, нормированная на амплитуду CaT; (д) – время спада CaT от максимального значения до половины амплитуды (T_{50}); (е) – длительность CaT; (ж) – амплитуда фазы «bump» (нормированная на амплитуду CaT); (з) – интегральная интенсивность фазы «bump» (нормированная на площадь под кривой CaT); (и) – время достижения максимума фазы «bump». Зависимости получены при температурах омывающего раствора 25°C (контроль), 30 и 35°C. Преднагрузка (степень растяжения мышцы) приведена в процентах от L_{max} . Данные приведены как среднее \pm ошибка среднего. Условные обозначения общие для всего рисунка.

уменьшение времени спада CaT от максимального значения до половины амплитуды (T_{50} , рис. 4д) и уменьшение полной длительности CaT (рис. 4е), независимо от степени растяжения мышцы. Например, для преднагрузки 95% L_{max} время достижения максимума CaT уменьшалось с $61,9 \pm 2,3$ мс при 25°C до $48,2 \pm 1,9$ мс при 35°C (на 22%, $P < 0,05$), а полная длительность CaT уменьшалась с 679 ± 25 мс при 25°C до 433 ± 22 мс при 35°C (на 36%, $P < 0,05$). В результате отношение ВДМ CaT к полной длительности CaT при температуре 35°C было достоверно выше среднего значения при контрольной температуре, как это было показано для миокарда правого желудочка морской свинки. Таким образом, даже с учетом неодинакового вклада основных механизмов выведения кальция (SERCA2a и $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -обмен) в миокарде

этих двух видов теплокровных, можно предположить, что температура в большей степени влияет на эти механизмы и в меньшей степени – на механизм кальций-вызванного высвобождения кальция из саркоплазматического ретикула.

В миокарде правого желудочка крысы амплитуда фазы «bump» не имела температурной зависимости (рис. 4ж), но интегральная интенсивность фазы «bump» была достоверно выше при температурах 30 и 35°C, чем при контрольной температуре 25°C, но достоверных различий между этими показателями при температурах 30 и 35°C не найдено (рис. 4з). Как и в миокарде правого желудочка морской свинки, время достижения максимума фазы «bump» достоверно уменьшалось с ростом температуры, при любом значении преднагрузки (рис. 4и).

Так, для преднагрузки 95% L_{\max} среднее значение ВДМ фазы «bump» составляло $239,8 \pm 12,6$ мс при 25°C (контроль), $181,2 \pm 9,5$ мс при 30°C (снижение относительно контроля на 24,5%, $P < 0,05$) и $151,7 \pm 3,9$ мс при 35°C (снижение относительно контроля на 36,7%, $P < 0,05$).

Аналогично тому, что мы наблюдали в миокарде правого желудочка морской свинки, характеристики фазы развития CaT в миокарде крысы (амплитуда, максимальная скорость развития, ВДМ) не показали достоверного изменения при увеличении преднагрузки, вне зависимости от температуры раствора (рис. 4а–в). В то же время при любой температуре спад CaT в целом замедлялся с ростом преднагрузки. Так, максимальная скорость спада CaT при температуре 30°C или 35°C достоверно уменьшалась при увеличении преднагрузки с 80% L_{\max} до L_{\max} (в обоих случаях на ~32%, $P < 0,05$), хотя при контрольной температуре 25°C эффект преднагрузки отсутствовал (рис. 4г). Время спада CaT от пика до половины амплитуды CaT и полная длительность CaT имели тенденцию к длинноразличию при всех температурах, хотя достоверный рост первого параметра был зафиксирован только при температуре 35°C , а второго – только при контрольной температуре (рис. 4д и 4е соответственно). Важным наблюдением является тот факт, что в отличие от миокарда правого желудочка морской свинки фаза «bump» в сердечной мышце правого желудочка крысы демонстрирует отчетливую зависимость от преднагрузки, причем амплитуда, интегральная интенсивность и время достижения максимума этой фазы достоверно *возрастают* при увеличении преднагрузки (рис. 4ж–и). Этот эффект сохраняется при температурах раствора 25, 30 и 35°C . Так, интегральная интенсивность фазы «bump» при температуре 35°C возрастает с $1,62 \pm 0,32$ при 80% L_{\max} до $3,50 \pm 0,53$ при L_{\max} ($P < 0,05$). Также следует отметить, что если в миокарде правого желудочка морской свинки ВДМ фазы «bump» имело тенденцию к уменьшению с ростом преднагрузки, то в препаратах миокарда правого желудочка крысы имеет место прямая зависимость между ВДМ фазы «bump» и преднагрузкой (рис. 4и). Связанный с преднагрузкой прирост этого параметра был наиболее выраженным при температурах 30 и 35°C (при увеличении преднагрузки с 80% L_{\max} до L_{\max} среднее значение ВДМ выросло на 48,7 и 47,4% соответственно) и менее сильным – при контрольной температуре 25°C (прирост составил 32,3% при задании такого же растяжения мышцы).

В отличие от миокарда правого желудочка морских свинок, характер спада кальциевого перехода в миокарде правого желудочка крысы при изменении температуры омывающего раствора менялся значительно слабее, в то время как преднагрузка сильно влияла на этот характер (рис. 5). При малой преднагрузке спад кальциевого перехода был монотонным, а фаза «bump» отсутствовала либо была слабо выражена, причем повышение температуры раствора приводило к уменьшению этой выраженности (рис. 5а). При большой преднагрузке фаза «bump» на кривой спада кальциевого перехода проявлялась отчетливо как при низкой, так и при высокой температуре раствора (рис. 5б). В этом случае повышение температуры раствора также приводило к уменьшению выраженности фазы «bump» и ускорению ее развития (т.е. уменьшению времени достижения пика и полной длительности фазы «bump»).

Влияние ингибирования Na^+ - Ca^{2+} -обмена и SERCA2a на характеристики изометрического сокращения и кальциевого перехода. *Ингибирование Na^+ - Ca^{2+} -обмена.* Эффекты ингибирования функции Na^+ - Ca^{2+} -обмена (с использованием SN-6 и KB-R7943 в концентрации 50 и 10 мкМ/л соответственно, $n = 10$) исследовали только в препаратах миокарда правого желудочка морской свинки, поскольку известно, что в желудочковом миокарде крысы Na^+ - Ca^{2+} -обмен выражен слабо [12]. В ходе эксперимента регистрировали изометрическое напряжение и кальциевый переход непосредственно перед добавлением ингибитора Na^+ - Ca^{2+} -обмена в раствор и через каждые 10 мин в течение 60 мин после добавления. Средние значения амплитуд изометрического напряжения и кальциевого перехода (CaT) при перфузии ингибиторсодержащим раствором в течение 60 мин достоверно уменьшались на $24,1 \pm 4,8\%$ и $32,2 \pm 1,4\%$ соответственно (рис. 6а), в то время как достоверных изменений средних значений максимальной скорости развития силы/CaT и времени достижения максимума силы/CaT не наблюдалось (рис. 6б и 6в соответственно). Не было выявлено и достоверных изменений среднего значения максимальной скорости спада напряжения/CaT, а также средней величины времени спада от пика до половинного значения амплитуды напряжения/CaT (рис. 6г и 6д соответственно). При этом полная длительность изометрического сокращения достоверно уменьшалась на $5,5 \pm 2,2\%$ к 60-й минуте перфузии раствором с ингибитором, хотя полная длительность кальциевого перехода не менялась (рис. 6е).

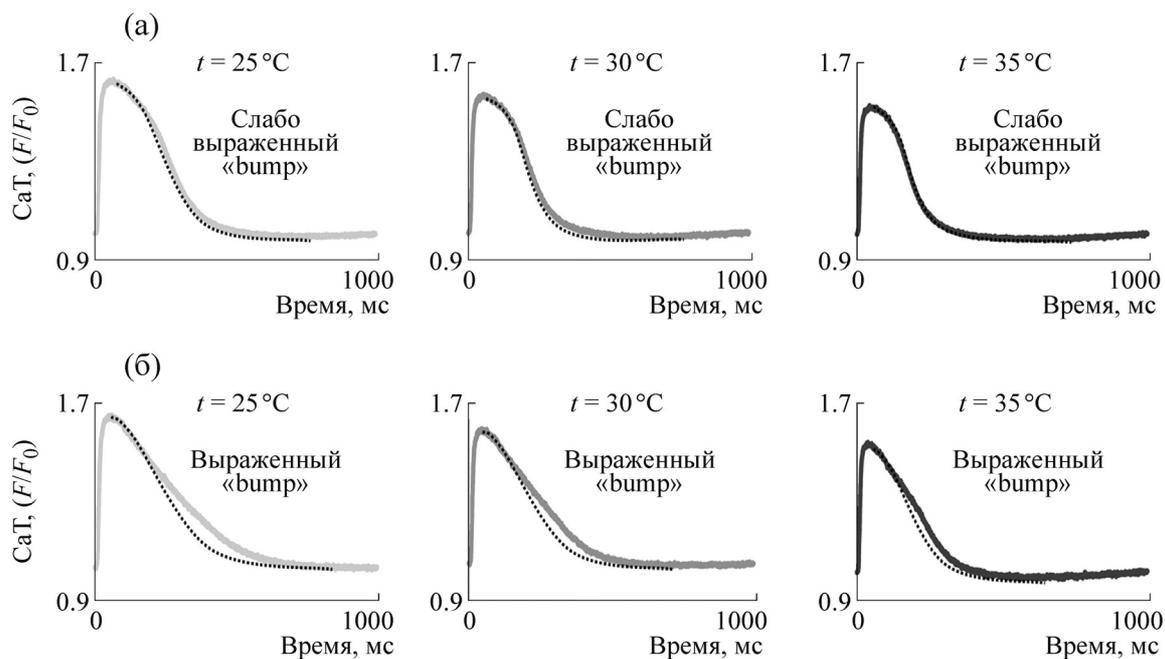


Рис. 5. Влияние температуры омывающего раствора на характеристики спада кальциевого перехода (CaT) в трабекулах правого желудочка крысы: (а) – при малой (85% L_{\max}) и (б) – большой (95% L_{\max}) преднагрузках. Показаны репрезентативные кривые CaT, полученные в одном и том же препарате при различной температуре омывающего раствора (значения указаны на диаграммах). Пунктирные кривые описывают монотонную фазу спада CaT. Характер фазы кратковременного замедления спада CaT (фаза «bump») слабо зависит от температуры раствора.

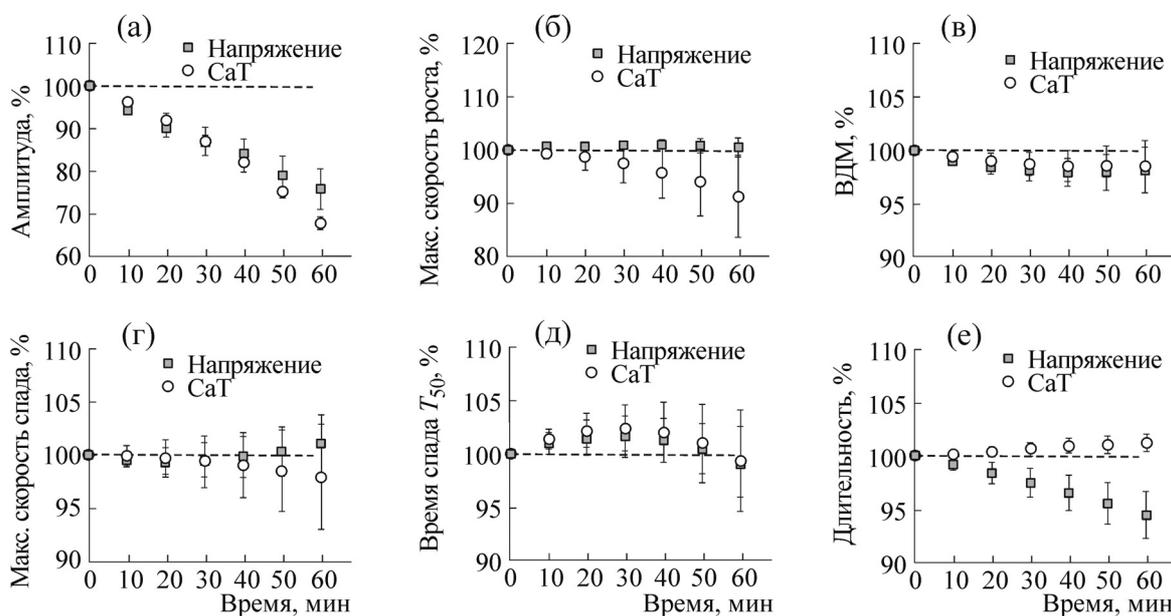


Рис. 6. Влияние времени перфузии раствором с ингибитором Na^+ - Ca^{2+} -обмена (50 мкМ/л SN-6 или 10 мкМ/л KB-R7943) на характеристики изометрического напряжения и кальциевого перехода в трабекулах правого желудочка морской свинки: (а) – амплитуда напряжения и CaT; (б) – максимальная скорость развития напряжения и CaT; (в) – время достижения максимума напряжения и CaT; (г) – максимальная скорость расслабления и спада CaT; (д) – время расслабления и спада CaT от пика до половины амплитуды; (е) – длительность изометрического сокращения и CaT. Данные нормированы на величину параметра непосредственно перед добавлением ингибитора Na^+ - Ca^{2+} -обмена и приведены как среднее \pm ошибка среднего. Пунктирная линия соответствует величине параметра в контрольном растворе непосредственно перед добавлением ингибитора Na^+ - Ca^{2+} -обмена. Температура раствора 25°C, частота стимуляции 1 Гц, относительная длина $\sim 95\%$ L_{\max} .

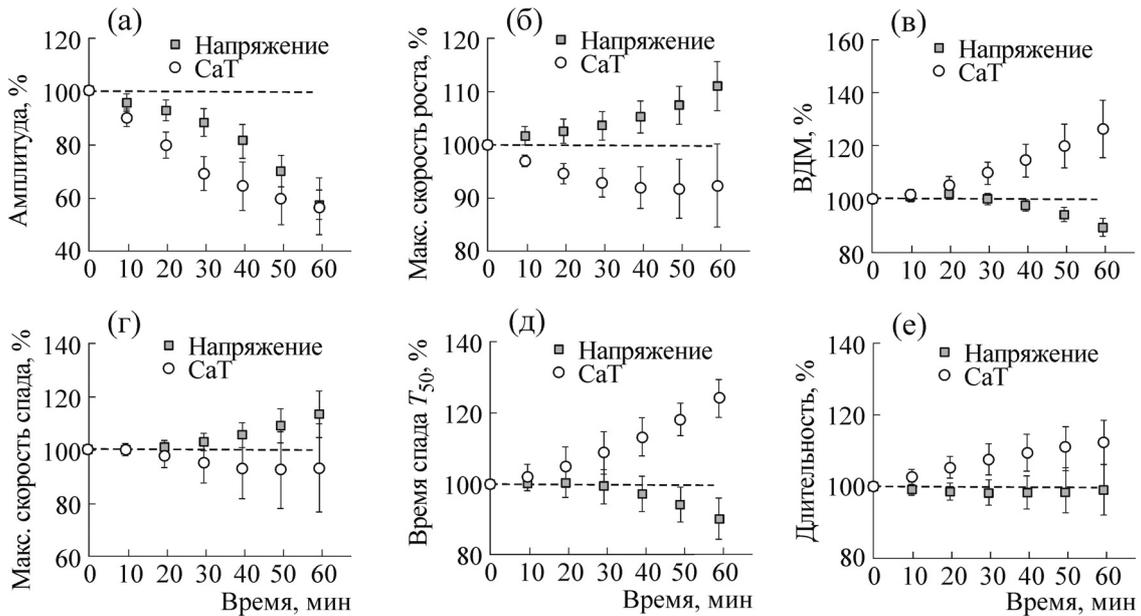


Рис. 7. Влияние времени перфузии раствором, содержащим 10 мкМ/л тапсигаргина (ингибитор SERCA2a), на характеристики изометрического напряжения и кальциевого перехода в трабекулах правого желудочка морской свинки и крысы: (а) – амплитуда напряжения и CaT; (б) – максимальная скорость развития напряжения и CaT; (в) – время достижения максимума напряжения и CaT; (г) – максимальная скорость расслабления и спада CaT; (д) – время расслабления и спада CaT от пика до половины амплитуды; (е) – длительность изометрического сокращения и CaT. Данные нормированы на величину параметра непосредственно перед добавлением ингибитора SERCA2a и приведены как среднее \pm ошибка среднего. Пунктирная линия соответствует величине параметра в контрольном растворе непосредственно перед добавлением ингибитора SERCA2a. Температура раствора 25°C, частота стимуляции 1 Гц, относительная длина $\sim 95\%$ L_{max} .

Мы не обнаружили достоверного эффекта этих блокаторов на характеристики спада кальциевого перехода. При этом общая потеря кальция в течение времени действия блокаторов (из-за блокады его поступления в клетку через Na^+-Ca^{2+} -обмен) приводила к достоверному уменьшению амплитуды кальциевого перехода и силы изометрического сокращения (рис. 6а). Отсутствие влияния ингибирования Na^+-Ca^{2+} -обмена на характеристики спада кальциевого перехода в препаратах миокарда морской свинки обусловлено тем, что KB-R7943 блокирует *только* обратный режим работы Na^+-Ca^{2+} -обмена (поступление кальция в клетку), а SN-6 блокирует *преимущественно* обратный режим работы Na^+-Ca^{2+} -обмена [19,20].

Ингибирование SERCA2a. Для ингибирования функции SERCA2a трабекулы правого желудочка крыс и морских свинок перфузировали раствором с добавлением тапсигаргина в концентрации 10 мкМ/л ($n = 5$). Спустя 60 мин после начала воздействия было обнаружено достоверное падение амплитуды изометрического напряжения (на $42,6 \pm 5,5\%$) и кальциевого перехода (на $43,1 \pm 10,7\%$) (рис. 7а). Хотя нормированная величина максимальной скорости развития напряжения в миокарде морской

свинки и крысы к концу 60-минутного интервала перфузии достоверно увеличивалась на $10,9 \pm 4,6\%$, эта же характеристика у CaT не отличалась от контрольного значения (рис. 7б). Время достижения максимума изометрического напряжения спустя 60 мин уменьшалось на $10,4 \pm 3,3\%$ ($P < 0,05$, рис. 7в), хотя полная длительность сокращения оставалась неизменной (рис. 7е). Напротив, время достижения максимума и полная длительность CaT в миокарде правого желудочка обоих животных достоверно возрастали относительно контрольных значений: на $25,9 \pm 10,6\%$ и $12,3 \pm 6,1\%$ соответственно, к концу 60-минутного интервала перфузии тапсигаргинсодержащим раствором ($P < 0,05$, рис. 7в и 7е). Значение максимальной скорости спада изометрического напряжения/CaT (при нормировании на амплитуду напряжения/CaT) слабо менялось в ходе воздействия ингибитором SERCA2a (рис. 7г). Наконец, к концу 60-минутного периода перфузии время спада от пика до половины амплитуды уменьшалось для изометрического напряжения (на $9,7 \pm 5,8\%$, $P < 0,05$) и увеличивалось для CaT (на $24,2 \pm 5,4\%$, $P < 0,05$) (рис. 7д). Эти данные показывают, что в отличие от ингиби-

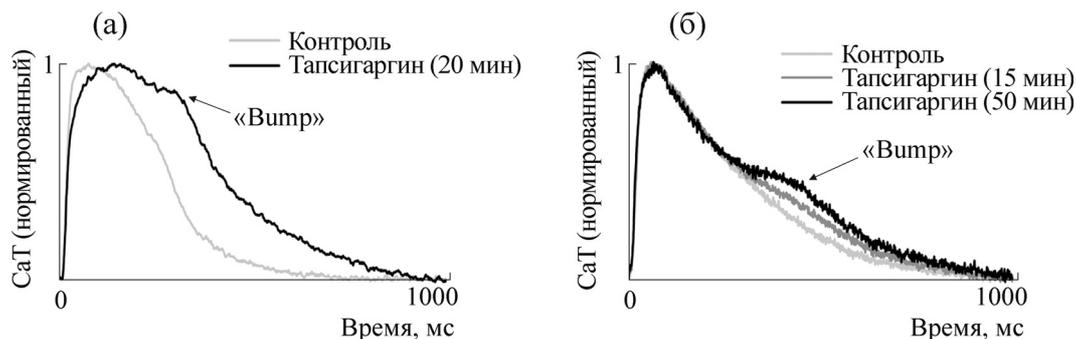


Рис. 8. Влияние времени перфузии раствором, содержащим 10 мкМ/л тапсигаргина (ингибитор SERCA2a), на возникновение фазы «bump» (показано стрелками) в трабекуле правого желудочка сердца морской свинки (а) и крысы (б). Кальциевые переходы нормированы на собственный максимум. Время перфузии отмечено в легенде. Температура раствора 25°C, частота стимуляции 1 Гц, относительная длина 85% L_{max} .

рования Na^+ - Ca^{2+} -обмена, ингибирование SERCA2a в трабекулах правого желудочка крысы и морской свинки существенно влияет на кинетику развития и спада кальциевого перехода.

При ингибировании функции SERCA2a (в ходе длительной перфузии раствором с тапсигаргином в концентрации 10 мкМ/л) одновременно с ожидаемым эффектом общего замедления спада кальциевого перехода наблюдалось возникновение или более сильное проявление фазы «bump» в мышце, удерживаемой при малой преднагрузке (рис. 8). Интересно, что этот эффект наблюдался как в миокарде правого желудочка крысы (рис. 8б), так и морской свинки (рис. 8а). Мы полагаем, что это связано с постепенным снижением уровня загрузки кальция в саркоплазматическом ретикулуме и, как следствие, снижением амплитуды кальциевого перехода. На этом фоне становится более выраженной доля кальция, поступающего в цитозоль при диссоциации с тропонина С. Таким образом, в миокарде этих животных задействованы одни и те же механизмы регуляции кинетики внутриклеточного кальция (кальций-тропонинное взаимодействие и выведение кальция из цитозоля) в фазу расслабления сердечной мышцы. При этом, несмотря на качественно подобные эффекты, количественные характеристики (скорость функционирования насоса, сродство регуляторного белка тропонина С к кальцию) или долю вклада того или иного механизма в формирование кальциевого перехода различаются у крыс и морских свинок. Например, ингибирование SERCA2a приводит к более сильному замедлению спада кальциевого перехода в миокарде морской свинки, нежели чем в миокарде крысы (ср. рис. 8а и 8б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследовано влияние внешних факторов (температура, преднагрузка) и ингибиторов Ca^{2+} -АТФ-зависимого кальциевого насоса саркоплазматического ретикулума (SERCA2a) и Na^+ - Ca^{2+} -обмена на кинетику кальциевого перехода в трабекулах правого желудочка морской свинки и крысы. Установлено, что повышение температуры оказывает выраженное влияние на характер спада CaT в миокарде морской свинки (при температуре 25°C – монотонный спад, при температуре 30°C – фаза «bump» на участке спада, при температуре 35°C – фаза «плато» кальциевого перехода), но не в миокарде крысы. При этом рост температуры ускоряет спад CaT как в миокарде морской свинки, так и в миокарде крысы. Напротив, рост степени растяжения мышцы (преднагрузки) оказывает выраженное влияние на характер спада CaT в миокарде крысы (фаза «bump» выражена тем сильнее, чем больше преднагрузка), но не в миокарде морской свинки (фаза «bump» не меняет своей выраженности при увеличении преднагрузки). Ингибирование реверсного режима работы Na^+ - Ca^{2+} -обмена не влияет на характеристики спада CaT, в то время как ингибирование функции SERCA2a существенно меняет характер спада кальциевого перехода в миокарде морской свинки и крысы.

Температура не является избирательным воздействием на функцию Na^+ - Ca^{2+} -обмена или SERCA2a. В миокарде морской свинки относительный вклад SERCA2a в выведение несвязанного кальция из цитозоля растет при снижении температуры; обратная связь показана в отношении Na^+ - Ca^{2+} -обмена [13]. В миокарде крысы соотношение вкладов SERCA2a и Na^+ - Ca^{2+} -обмена в выведение кальция из цитозоля не обладает выраженной температурной зави-

симостью [13]. Скорее всего, это связано с тем, что у крысы подавляющий вклад в выведение кальция при расслаблении миокарда оказывает именно SERCA2a [12].

Для избирательного воздействия на функцию SERCA2a мы использовали тапсигаргин, который избирательно подавляет SERCA2a, не влияя при этом на сарколеммальный транспорт кальция или на кальцийвысвобождающие каналы саркоплазматического ретикулаума [21–23]. В наших экспериментах выраженность фазы «bump» на кривой спада кальциевого перехода возрастала с увеличением времени перфузии в растворе с добавлением тапсигаргина не только в миокарде правого желудочка крысы, но и у морской свинки. Мы полагаем, что это связано с постепенным снижением уровня загрузки кальция в саркоплазматическом ретикулауме и, как следствие, снижением амплитуды кальциевого перехода. На этом фоне доля кальция, поступающего в цитозоль при диссоциации с тропонина С, возрастает и становится выраженной.

С другой стороны, KB-R7943 и SN-6 блокируют реверсный режим работы Na^+ - Ca^{2+} -обмена (поступление кальция в клетку) в кардиомиоцитах и не влияют на натрий-зависимый транспорт и натриевые ионные каналы [19], причем SN-6 является более селективным, чем KB-R7943 [20]. При этом показано, что в желудочковом миокарде крысы Na^+ - Ca^{2+} -обмен выражен слабо [12], поэтому мы не тестировали эффект этих ингибиторов в трабекулах правого желудочка крысы. При действии этих ингибиторов в правом желудочке морской свинки мы показали достоверное падение амплитуды изометрического напряжения и кальциевого перехода, что является следствием блокады Na^+ - Ca^{2+} -обмена в реверсном режиме. При этом отсутствовало влияние на максимальную скорость развития и время достижения максимума, а также на полную длительность силы/СаТ. Эти результаты согласуются с данными о том, что в физиологических условиях вклад Na^+ - Ca^{2+} -обмена при работе в реверсном режиме в регуляцию выведения кальция из цитозоля невелик [24,25]. С другой стороны, имеются данные о существенном влиянии функции Na^+ - Ca^{2+} -обмена в прямом режиме, т.е. когда кальций выводится из клетки, на кинетику внутриклеточного несвязанного кальция [26]. Эти данные позволяют считать незначительным влияние реверсного режима Na^+ - Ca^{2+} -обмена на характеристики спада кальциевого перехода.

Необходимо подчеркнуть, что SERCA2a и Na^+ - Ca^{2+} -обмен функционально взаимосвязаны независимо от того, избирательно или неизби-

рательно подавляется функция любого из этих механизмов. Например, повышение температуры увеличивает как скорость поглощения кальция в саркоплазматический ретикулум, так и скорость выведения кальция из клетки посредством Na^+ - Ca^{2+} -обмена [13], но это не означает, что активность каждого механизма изменилась только в ответ на повышение температуры. Так, подавление функции Na^+ - Ca^{2+} -обмена, который при нормальных условиях обеспечивает выведение кальция из клетки, приводит к накоплению кальция внутри клетки и, как следствие, к повышению уровня кальция в саркоплазматическом ретикулауме [27,28]. Поэтому интерпретация результатов при неизбирательном и избирательном воздействии на SERCA2a или Na^+ - Ca^{2+} -обмен должна учитывать это обстоятельство.

Использование нокаутных животных, у которых снижена или увеличена экспрессия соответствующего механизма трансмембранного переноса кальция, позволяет частично решить эту проблему. Показано, что избыточная экспрессия Na^+ - Ca^{2+} -обмена компенсирует снижение функции SERCA2a (например, при нокаутном выключении этого механизма), так что кальциевый гомеостаз поддерживается на нормальном уровне [29,30]. Однако даже в условиях нокаутного выключения какого-то определенного механизма выведения кальция из цитозоля остальные (внутри)клеточные механизмы также подвергаются функциональным изменениям. Поэтому вряд ли возможно обеспечить условия, при которых «выключение» одного из механизмов экструзии кальция из межмиофиламентарного пространства не повлияет на функцию других механизмов, вовлеченных в процесс кальциевой регуляции при расслаблении сердечной мышцы интактного животного.

Хотя опосредованное (температура) или прямое (специфические ингибиторы) влияние на функцию SERCA2a имеет одинаковые последствия на сократимость миокарда морской свинки и крысы, яркие длинозависимые изменения кинетики спада кальциевого перехода выражены только в миокарде крысы. В данной работе мы показали, что при последовательном увеличении преднагрузки возникает и далее градуально увеличивается выраженность фазы кратковременного замедления спада кальциевого перехода или фазы «bump» (амплитуда, интегральная интенсивность, время достижения максимума) только у крыс, но не у морских свинок. Считается, что возникновение фазы «bump» связано с диссоциацией кальция с тропонина С (TnC) [31,32]. Увеличение степени растяжения сердечной клетки усиливает коопе-

ративный эффект активации контрактильных белков, увеличивает сродство TnC к Ca^{2+} и приводит к замедлению диссоциации комплекса Ca^{2+} -TnC. Наши исследования подтверждают эту гипотезу, поскольку амплитуда, интегральная интенсивность, ВДМ (а также полная длительность) фазы «bump» градуально возрастают с увеличением степени растяжения сердечной мышцы правого желудочка крысы (см. рис. 1а и 1б, [18,33,34]). Кроме того, в миокарде правого желудочка крысы выраженность фазы «bump» существенно возрастает при снижении концентрации внеклеточного кальция [18]. Этот фактор можно рассматривать как неизбежное воздействие не только на функцию SERCA2a и Na^+ - Ca^{2+} -обмена, но и на кинетику образования и распада кальций-тропонинных комплексов, что и приводит к усилению фазы «bump». Этот эффект до сих пор был описан только в препаратах миокарда крысы, но не наблюдался у других теплокровных животных (морская свинка, кролик, собака).

Таким образом, принципиально различное поведение характеристик фазы «bump» в зависимости от величины преднагрузки в миокарде правого желудочка морской свинки и крысы может по крайней мере частично объяснять разную выраженность электромеханического и механоэлектрического сопряжения в миокарде этих двух видов теплокровных. Из полученных нами данных можно заключить, что длинозависимая регуляция сродства TnC к Ca^{2+} в миокарде правого желудочка крысы выражена значительно сильнее, чем в миокарде правого желудочка морской свинки. Кроме того, в вентрикулярных миоцитах крыс кальциевый переход развивается быстрее, чем у морских свинок. На фоне быстрого поглощения кальция в саркоплазматическом ретикулуме или при пониженном уровне кальция в саркоплазматическом ретикулуме при низкой концентрации внеклеточного кальция эффект, связанный с высвобождением кальция с TnC в ходе расслабления, проявляется отчетливо. Относительно более медленное выведение кальция из цитозоля в миокарде морской свинки (кролика, собаки) может маскировать эффект преднагрузки на кинетические характеристики процесса высвобождения Ca^{2+} с TnC (фаза «bump»). Тем не менее нами найдены условия, при которых в миокарде правого желудочка морской свинки наблюдается фаза «bump» на участке спада кальциевого перехода. Так, мы впервые показали, что при высокой температуре (35°C) начальная фаза спада кальциевого перехода представляет собой фазу «bump», которая трансформируется в фазу «плато». Молекулярной

основой этого эффекта может быть связанное с ростом температуры ускорение работы SERCA2a, что соответствует данным других исследователей [11,13]. В свою очередь, изменение баланса буферной по отношению к Ca^{2+} активности SERCA2a и TnC играет важную физиологическую роль в регуляции сократимости миокарда [35].

Итак, подтверждается общность механизмов регуляции кинетики кальция в цитоплазме вентрикулярных кардиомиоцитов крыс и морских свинок. Видовые различия выражаются в количественном вкладе этих механизмов в процесс выведения кальция из цитозоля в фазу расслабления, а также неодинаковой чувствительности к длине саркомера. Так, принципиально различное поведение фазы «bump» от степени растяжения в миокарде правого желудочка крысы и морской свинки может являться важным фактором, объясняющим особенности их механокальциевого сопряжения.

Авторы благодарят А.А. Балакина (ИИФ УрО РАН) за проведение ряда экспериментальных измерений и получение данных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-00085) и Программы фундаментальных исследований УрО РАН 2015–2017 гг. (проект № 15-5-4-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. G. Allen and J. C. Kentish, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **17** (9), 821 (1985).
2. D. P. Dobesh, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **282** (3), H1055 (2002).
3. K. L. Kreutziger, et al., *J. Physiol.* **586** (Pt 15), 3683 (2008).
4. B. V. Alvarez, et al., *Circ. Res.* **85** (8), 716 (1999).
5. N. G. Pйrez, et al., *Circ. Res.* **88** (4), 376 (2001).
6. N. Milani-Nejad, et al., *J. Gen. Physiol.* **141** (1), 133 (2013).
7. B. J. Biesiadecki, et al., *Biophys. Rev.* **6**, 273 (2014).
8. G. P. Farman, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **300**, H2155 (2011).
9. N. Fukuda, et al., *Circulation* **104** (14), 1639 (2001).
10. T. Wannenburg, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **279** (2), H779 (2000).
11. J. W. Bassani, et al., *J. Physiol.* **476**, 279 (1994).
12. D. M. Bers, *Circ. Res.* **87** (4), 275 (2000).
13. U. Mackiewicz and B. Lewartowski, *J. Physiol. Pharmacol.* **57** (1), 3 (2006).
14. D. M. Bers, et al., *J. Physiol.* **417**, 537 (1989).
15. J. L. Puglisi, et al., *Am. J. Physiol.* **270**, H1772 (1996).
16. D. G. Allen, et al., *J. Physiol.* **406**, 359 (1988).

17. M.-L. Ward et al., *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **97**, 232 (2008).
18. O. Lookin and Yu. Protsenko, *Cent. Eur. J. Biol.* **6** (5), 730 (2011).
19. C. L. Elias, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **281** (3), H1334 (2001).
20. T. Iwamoto, et al., *Mol. Pharmacol.* **66** (1), 45 (2004).
21. M. S. Kirby, et al., *J. Biol. Chem.* **267** (18), 12545 (1992).
22. J. W. Bassani, et al., *Am. J. Physiol.* **265** (2, Pt 1), C533 (1993).
23. R. A. Bassani and J. W. Bassani, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **36** (12), 1717 (2003).
24. M. P. Blaustein and W. J. Lederer, *Physiol. Rev.* **79** (3), 763 (1999).
25. D. M. Bers, et al., *Cardiovasc. Res.* **57**, 897 (2003).
26. H. Reuter, et al., *Cardiovasc. Res.* **67**, 198 (2005).
27. S. Ozdemir, et al., *Circ. Res.* **102**, 1398 (2008).
28. W. E. Louch, et al., *Physiology* **27**, 308 (2012).
29. C. M. Terracciano, et al., *Cardiovasc. Res.* **49** (1), 38 (2001).
30. M. Seth, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** (47), 16683 (2004).
31. J. C. Kentish and A. Wrzosek, *J. Physiol.* **506** (Pt 2), 431 (1998).
32. Y. Jiang, et al., *Am. J. Physiol.* **274** (5 Pt 1), C1273 (1998).
33. O. Lookin, et al., *J. Physiol. Sci.* **65**, 89 (2015).
34. O. Lookin, et al., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **42** (11), 1198 (2015).
35. S. J. Briston, et al., *Cardiovasc. Res.* **104** (2), 347 (2014).

The Kinetics of Cytosolic Calcium in Right Ventricular Myocardium of Guinea Pigs and Rats

O.N. Lookin and Yu.L. Protsenko

*Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
ul. Pervomayskaya 106, Yekaterinburg, 620049 Russia*

The characteristics of tension and Ca^{2+} transient rise and decay were compared in guinea pig and rat right ventricular trabeculae isometrically contracting under different preloads. The measurements were performed at different temperatures of saline solution as well as after inhibition of the main mechanisms of Ca^{2+} removal from cytosol during cardiac relaxation – $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ exchanger and ATP-dependent Ca^{2+} -pump of sarcoplasmic reticulum (SERCA2a). For the first time it was shown that the increase in temperature from 25 to 30°C results in the appearance of brief deceleration of Ca^{2+} transient decay (“bump”) in guinea pig myocardium; this effect was previously observed only in rat myocardium. Further increase in temperature (up to 35°C) forced the “bump” to be transformed to the “plateau” phase of Ca^{2+} transient in guinea pigs. In the rat myocardium the effect of temperature on the shape of Ca^{2+} transient decay was negligible. In contrast, the gradual stretch of rat trabecula (i.e. increase in preload) was accompanied by the appearance and further enhancement of the “bump” (i.e. amplitude, integral intensity, duration) whereas this effect of preload was not observed in the guinea pig trabeculae. The selective inhibition of the reverse mode of $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ exchanger did not affect the characteristics of Ca^{2+} transient in the myocardium of guinea pigs, but selective inhibition of SERCA2a in rats and guinea pigs significantly modified the decay phase of Ca^{2+} transient and resulted in the appearance or further enhancement of the “bump” in the myocardium of these animal species. The characteristics of the “bump” might be used for quantitative evaluation of the length-dependent activation of cardiac contraction.

Key words: myocardium, Ca^{2+} transient, temperature, preload, sodium-calcium exchanger, ATP-dependent Ca^{2+} -pump of sarcoplasmic reticulum