

ВЛИЯНИЕ КВ-R7943, ИНГИБИТОРА ОБРАТНОЙ ФОРМЫ $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ОБМЕННОГО МЕХАНИЗМА, НА СИЛУ СОКРАЩЕНИЯ ПАПИЛЛЯРНЫХ МЫШЦ СЕРДЦА СУСЛИКА *Spermophilus undulatus*

© 2017 г. А.С. Аверин*, Л.С. Косарский*, С.В. Тарлачков** ***, В.А. Вехник****, И.В. Аверина*, А.Е. Алексеев***** ***, Е.Е. Фесенко*, О.В. Накипова*

*Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пуцино Московской области, ул. Институтская, 3;

**Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, 142290, Пуцино Московской области, просп. Науки, 5;

***Филиал Института биорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Пуцино Московской области, просп. Науки, 6;

****Жигулевский государственный природный биосферный заповедник им. И.И. Спрыгина, 445362, Жигулёвск Самарской области, с. Бахилова Поляна, ул. Жигулёвская, 1;

*****Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пуцино Московской области, ул. Институтская, 3;

*****Department of Molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics, Stabile 5, Mayo Clinic, 200 1st Street SW, Rochester, MN 55905, USA

E-mail: averin.icb@gmail.com

Поступила в редакцию 12.09.16 г.

Исследовано влияние КВ-R7943, ингибитора обратной формы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма, на силу изометрических сокращений, их зависимость от частоты стимуляции и эффект паузы (качественный показатель содержания Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме) в папиллярных мышцах правого желудочка сердца сусликов в периоды летней (июнь, $n = 4$) и осенней (октябрь, $n = 4$) активности. Длительная (1,0–1,5 ч) аппликация КВ-R7943 при 36°C в присутствии 1,8 мМ Ca^{2+} не оказывала выраженного влияния на исследуемые параметры в папиллярных мышцах сердца сусликов летнего периода активности при большинстве частот стимуляции. У животных осеннего периода активности КВ-R7943 уменьшал силу сокращения на 40–50% (отрицательный инотропный эффект) в области низких частот стимуляции (0,1–0,3 Гц), не оказывая значимого влияния в области частот 0,4–3,0 Гц. Кроме того, КВ-R7943 снижал величину эффекта паузы на $50 \pm 21\%$ при длительности свыше 120 с. Полученные данные свидетельствуют о влиянии КВ-R7943 на уровень Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме и возможном вкладе $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма в процессы физиологического ремоделирования Ca^{2+} -гомеостаза миокарда зимоспящих животных в период их подготовки к сезону спячки.

Ключевые слова: сердце, сократимость, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменный механизм, КВ-R7943; гибернация, суслики.

Роль натрий-кальциевого обменника ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, NCX), белка цитоплазматической мембраны, участвующего в регуляции Ca^{2+} гомеостаза миокардиальных клеток, сложна и недостаточно изучена, что во многом обусловлено его способностью функционировать в двух режимах – прямом и обратном [1–5]. Направление работы NCX зависит от

градиента ионов Na^+ и Ca^{2+} и мембранного потенциала [6–9]. Действуя в прямом режиме, обменник использует энергию, накопленную в электрохимическом градиенте Na^+ , транспортируя три иона Na^+ в цитоплазму в обмен на удаление одного иона Ca^{2+} наружу клетки. В обратном режиме функционирования (NCX reverse, NCX_{rev}) NCX перемещает один ион Ca^{2+} в цитоплазму в обмен на удаление трех ионов Na^+ на ранних стадиях возбуждения [6,7,10,11]. В нормальных физиологических условиях NCX функционирует главным образом в прямом режиме, способствуя диастолическому расслабле-

Сокращения: NCX – $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменный механизм ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger); NCX_{rev} – $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменный механизм, работающий в обратном режиме ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger reverse).

нию миокардиальных клеток. Длительность активности NCX_{rev} в нормальном миокарде слишком коротка, чтобы дать существенное увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), и заключается, по-видимому, в тонкой регуляции его уровня в примембранном пространстве [10]. Обратный режим функционирования в большей степени характерен для миокарда крыс и мышей, отличающихся повышенным уровнем внутриклеточного Na^+ [9]. Вопрос о физиологических последствиях увеличения активности NCX_{rev} в сердце высших млекопитающих и человека является спорным, но чаще всего рассматривается в негативном аспекте [12–15]. Существуют экспериментальные доказательства того, что NCX_{rev} приводит к развитию кальциевых перегрузок, что предрасполагает к возникновению поздних постдеполяризаций и желудочковых аритмий. Показано, что NCX_{rev} играет важную роль в патофизиологии ишемии-реперфузии, поэтому его подавление является мишенью для профилактики и лечения реперфузионных аритмий [16–18]. Однако существует ряд на первый взгляд парадоксальных экспериментальных фактов, указывающих на то, что повышение активности NCX_{rev} может при определенных условиях играть защитную роль, в частности, в реализации эффектов ишемического preconditionирования [19–21] – «закаливания» клеток короткими периодами ишемии, снижающими риск возникновения инфарктов и аритмий при ишемии-реперфузии [22–24]. Таким образом, соединения, модулирующие вклад NCX_{rev} в регуляцию Ca^{2+} -гомеостаза разных типов клеток (миокардиальных, гладкомышечных, нервных), вызывают большой интерес не только в качестве исследовательских инструментов, но и потенциально ценных терапевтических агентов [25–30].

Производное изотиомочевинны 2-[2-[4-(4-nitrobenzyloxy)phenyl]ethyl]isothiourea methanesulfonate (KB-R7943) было введено в использование в 1996 г. в качестве селективного ингибитора NCX_{rev} [31]. Несмотря на открытие ряда новых ингибиторов (SEA0400, SN-6, YM-244769) [32–36], KB-R7943 продолжает оставаться одним из наиболее используемых фармакологических агентов для подавления активности NCX_{rev} в различных экспериментальных условиях [37–40]. Интересно, что KB-R7943 практически не оказывает влияния на здоровый миокард, однако может предотвращать Ca^{2+} -перегрузки в патологических условиях [37,38].

Роль NCX_{rev} в сезонных изменениях кальциевого гомеостаза миокарда зимоспящих (гибернарующих) животных до настоящего времени остается неясной. Известно, что в период

гибернации в сердце зимоспящих снижается активность потенциалочувствительных Ca^{2+} -каналов. Высказывались предположения, что в этот период NCX_{rev} становится основным поставщиком ионов Ca^{2+} из внеклеточного пространства, которые осуществляют запуск сокращения [41,42]. Однако эта гипотеза до сих пор не получила подтверждения.

В настоящей работе исследовано влияние KB-R7943 на силу сокращения, ее зависимость от частоты стимуляции и эффект паузы в миокарде суслика летнего и осеннего периодов. Осенний период в жизни зимоспящих вызывает повышенный интерес исследователей. Именно в этот период у данных животных происходит ремоделирование основных физиологических процессов, которое обеспечивает их выживание в условиях действия факторов, губительных для большинства млекопитающих и человека, таких как глубокая гипотермия, голодание, ишемия-реперфузия и ожирение [43,44]. Цель работы заключалась в установлении возможной роли NCX_{rev} в процессах физиологического ремоделирования кальциевого гомеостаза сердца зимоспящих животных в период их подготовки к сезону спячки, механизмы которого до сих пор остаются невыясненными.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились (в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных 1986, 86/609/ЕЕС) на папиллярных мышцах правого желудочка сердца якутских сусликов *Spermophilus undulatus* в период летней активности (июнь–июль, $n = 4$) и подготовки к спячке (октябрь, $n = 4$). У предварительно наркотизированных эфиром животных быстро выделяли сердце и помещали его в раствор Тироде (20°C) следующего состава: 150 мМ Na^+ ; 4,0 мМ K^+ ; 1,8 мМ Ca^{2+} ; 1,0 мМ Mg^{2+} ; 12,0 мМ HCO_3^- ; 1,8 мМ HPO_4^- ; 148,4 мМ Cl^- ; 11,0 мМ глюкозы, рН 7,4. Раствор аэрировали газовой смесью, содержащей 95% O_2 + 5% CO_2 . Выделение папиллярных мышц, стимуляцию и измерение амплитуды сокращения в изометрическом режиме проводили по ранее описанной методике [45] при температуре $36 \pm 0,1^\circ C$. Диаметр папиллярных мышц варьировал от 0,6 до 1,0 мм, а длина – от 1,0 до 3,0 мм. Для исследования их механической активности использовали стандартную автоматизированную установку на основе персонального компьютера и плат аналого-цифрового и цифро-аналоговых преобразователей (L-Card 154 и L-Card E14-440 соответственно, «Л-Кард», Россия). Механическую активность мышц регист-

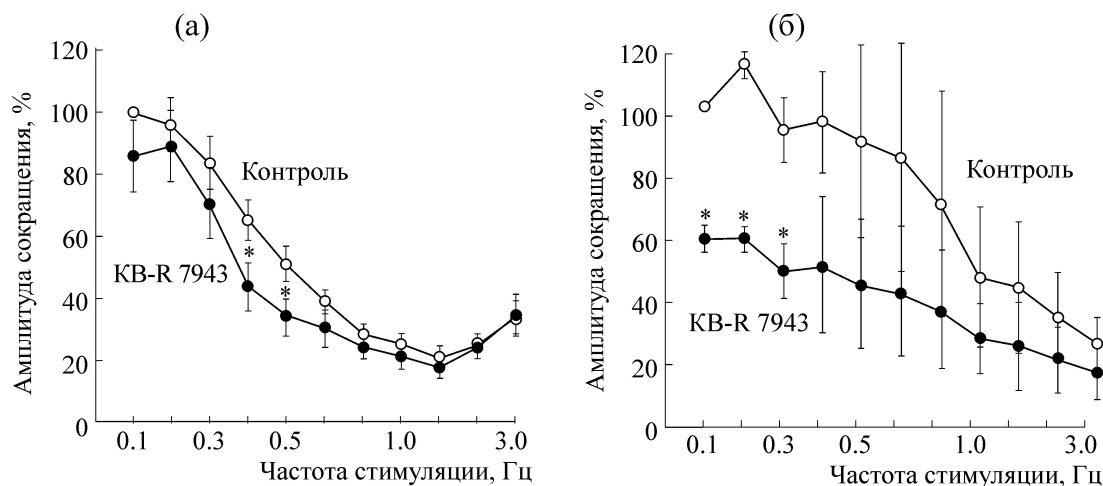


Рис. 1. Роль обратной формы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма в регуляции силы сокращения сердца суслика в период подготовки к сезону спячки. Влияние KB-R7943 (10 мкМ), специфического ингибитора NCX_{rev} , на зависимость силы сокращения от частоты стимуляции в папиллярных мышцах летних (а) и осенних (б) сусликов (36°C). По оси абсцисс – частота стимуляции, Гц; по оси ординат – амплитуда стационарного изометрического сокращения. За 100% принимали значение амплитуды сокращения при частоте стимуляции 0,1 Гц. Данные представлены как средние значения \pm стандартная ошибка среднего; * – достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$).

рировали с помощью механотрона 6X-2M. В начале каждого опыта препарат стимулировали прямоугольными импульсами частотой 0,3 Гц в течение 1 ч.

Стационарную зависимость «частота–сила» в изометрическом режиме определяли в интервале частот от 0,1 до 3,0 Гц. Силу сокращения F папиллярной мышцы определяли как отношение силы изометрического сокращения к поперечному сечению несокращающейся мышцы. По силе изометрического сокращения оценивали следующие характеристики ритмоинотропных отношений: стационарную зависимость «частота–сила» и эффект потенциации паузой (в диапазоне от 2 до 120 с) на фоне стимуляции постоянной частотой (1 Гц) [45]. При построении зависимости «частота–сила» величину стационарной амплитуды для каждой из частот стимуляции в исследуемом диапазоне выражали в процентах по отношению к ее величине на частоте стимуляции 0,1 Гц, принимаемой за 100%. Эффект паузы оценивали как отношение максимальной величины амплитуды первого сокращения после периода покоя (тестовое сокращение, F_1) к амплитуде ритмического сокращения на частоте стимуляции 1,0 Гц (F_0). Тестируемые параметры практически не изменялись в течение трех часов при трехкратном повторении протокола эксперимента. Кроме амплитуды стационарных сокращений, анализировали временные характеристики развития сокращения (в мс): время достижения максимума сокращения и время расслабления на

уровне, соответствующем спаду изометрического напряжения до 50% от своей максимальной величины.

KB-R7943 (Tocris Bioscience, Великобритания) растворяли в диметилсульфоксиде до концентрации 10 мкМ/л и хранили при температуре -20°C . Автоматическое управление ходом эксперимента и регистрацию тестируемых параметров осуществляли с помощью компьютерной программы (автор Н. Карпук). Достоверность полученных результатов оценивали с помощью программ Statistica 6.0 и ANOVA (по уровню значимости $p < 0,05$). Данные представлены как средние значения \pm стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 в сравнительном плане представлено влияние KB-R7943 на силу изометрического сокращения папиллярных мышц сердца активных летних и осенних сусликов. В выбранных условиях при температуре 36°C и концентрации Ca^{2+} 1,8 мМ данный блокатор (10 мкМ/л) в группе летних сусликов (рис. 1а) при длительной аппликации (1,0–1,5 ч) не вызывал заметных изменений силы сокращения и ее зависимости от частоты стимуляции. В группе животных осеннего периода (рис. 1б) KB-R7943 оказывал выраженное ингибирующее действие (отрицательный инотропный эффект) в области низких частот стимуляции (0,1–0,3 Гц). В частности, на частоте стимуляции

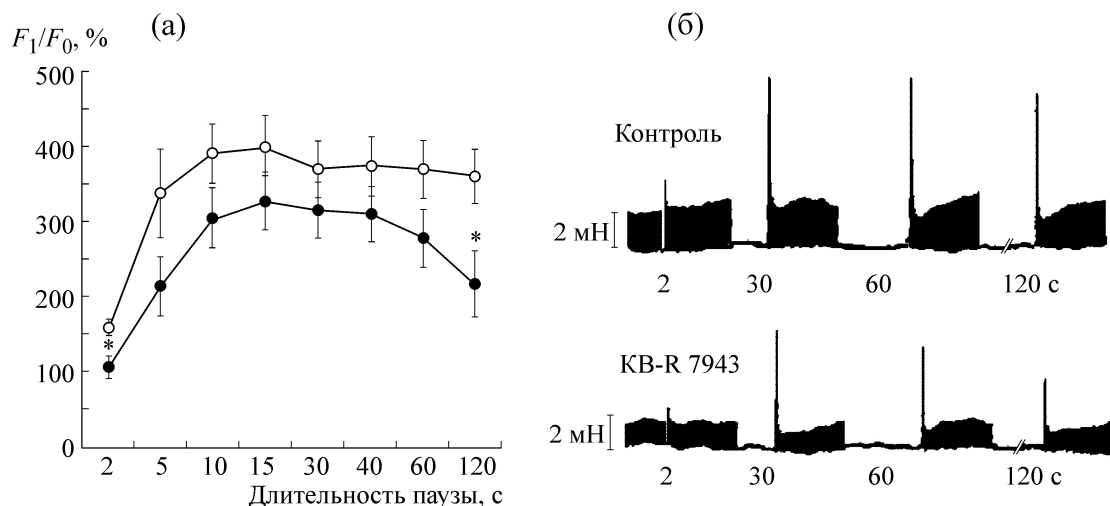


Рис. 2. Влияние KB-R7943 (10 мкМ) на потенцирующий эффект паузы в папиллярных мышцах сердца сусликов осеннего периода. (а) – Статистический график, контроль (светлые кружки) и после воздействия KB-R7943 (темные кружки). Данные представлены как средние значения \pm стандартная ошибка среднего; * – достоверность отличия потенцирующего эффекта паузы в контроле от его величины после действия KB-R7943 ($p < 0,05$) при частоте стимуляции 1 Гц и температуре среды 36°C. По оси абсцисс – продолжительность паузы, с; по оси ординат – отношение силы первого сокращения после паузы (F_1) к значению силы сокращений папиллярных мышц при базовой частоте стимуляции 1,0 Гц (F_0). (б) – Оригинальные записи с ленты самописца типичного примера действия KB-R7943 на эффект паузы.

0,1 Гц эффект KB-R7943 составлял $41 \pm 4\%$ ($n = 4$, $p < 0,05$). Как видно из рисунка, достоверное снижение силы сокращения в результате действия KB-R7943 наблюдалось также при частотах стимуляции 0,2–0,3 Гц (54 ± 2 и $44 \pm 9\%$ соответственно, $n = 4$, $p < 0,05$). При более высоких частотах стимуляции KB-R7943 не оказывал достоверного инотропного эффекта.

При исследовании влияния KB-R7943 на величину потенцирующего эффекта паузы в группе летних животных значимых отличий не обнаружено, хотя в отдельных экспериментах наблюдалось незначительное снижение эффекта паузы на больших длительностях (60–120 с) (данные не приводятся). В группе осенних животных влияние KB-R7943 на величину эффекта паузы проявлялось более отчетливо. Из данных, представленных на рис. 2а, можно видеть, что KB-R7943 меняет характер зависимости эффекта паузы от ее длительности (механическая релаксация), вызывая снижение амплитуды первого сокращения после паузы при длительностях порядка 60–120 с (рис. 2б). В среднем относительная величина эффекта паузы снижалась на 25 ± 10 и $40 \pm 12\%$ ($n = 4$, $p < 0,05$).

Влияние KB-R7943 на временные параметры цикла «сокращение–расслабление» в изучаемых нами группах сусликов представлены в таблице. Можно видеть, что в обеих группах значимых отличий от контроля не наблюдается.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенных исследований впервые показано, что KB-R7943, ингибитор NCX_{rev} , оказывает сезонно-зависимое влияние на силу сокращения и ритмоинотропные характеристики папиллярных мышц сердца сусликов. В группе летних животных аппликация KB-R7943 в концентрации 10 мкМ, специфической для подавления NCX_{rev} ($IC_{50} = 5,7 \pm 2,1$ мкМ) [31,32], не вызывала достоверных изменений регистрируемых параметров, указывая на то, что NCX_{rev} не играет существенной роли в регуляции сократительной активности миокарда суслика в период летней активности. В группе осенних сусликов воздействие ингибитора приводило к существенному снижению силы сокращения (40–50%) в области низких частот стимуляции, ассоциирующееся с уменьшением потенцирующего эффекта паузы.

Известно, что в процессе перехода от летней активности к сезону спячки в осенний период наблюдаются наиболее значительные изменения характера функционирования Ca^{2+} -транспортирующих систем, осуществляющих процесс поддержания кальциевого гомеостаза миокардиальных клеток, среди которых наиболее важными являются эндогенная регуляция активности потенциалочувствительных Ca^{2+} -каналов L-типа клеточной мембраны и способности саркоплазматического ретикулума поглощать и накапливать кальций [47,48]. Считается, что сни-

Влияние KB-R7943 на временные характеристики цикла «сокращение–расслабление» в папиллярных мышцах активных летних и осенних сусликов

		ВДМ, мс		BP ₅₀ , мс	
		0,1 Гц	0,1 Гц	0,1 Гц	0,1 Гц
Лето	Контроль	87 ± 2	75 ± 2	35 ± 2	33 ± 4
	KB-R7943	87 ± 2	73 ± 1	35 ± 3	36 ± 4
Осень	Контроль	84 ± 3	74 ± 4	36 ± 4	35 ± 3
	KB-R7943	82 ± 3	71 ± 3	35 ± 3	35 ± 3

Примечание. ВДМ – время достижения максимума сокращения; BP₅₀ – время расслабления на уровне, соответствующем спаду изометрического напряжения до 50% от своей максимальной величины.

жение активности данных каналов является ключевым механизмом в сезонных перестройках кальциевого гомеостаза и защищает сердце гибернантов во время спячки от кальциевой перегрузки [49,50]. Мы предположили, что в этих условиях у животных осеннего периода роль триггера сокращения может принимать на себя NCX_{rev}, что частично подтверждает обнаруженное нами снижение силы сокращения в ответ на аппликацию KB-R7943.

Интересно, что в здоровом миокарде крысы KB-R7943 не оказывает заметного влияния на силу сокращения, но существенно снижает ее в условиях патологии. В частности, показано, что KB-R7943 вызывает подавление аритмогенеза, индуцированного оуабаином в кардиомиоцитах крысы [37]. Известно, что KB-R7943 противодействует повышению уровня Ca²⁺ в цитоплазме ([Ca²⁺]_c) и гибели нейронов и кардиомиоцитов при ишемии, механических травмах головного мозга, кислородном голодании и в условиях гипоглекимии [32,51–53]. Тем не менее точные механизмы кардио- и нейропротекторного действия KB-R7943 не совсем понятны. Не исключено, что эффективность данного соединения обусловлена его интегральным влиянием на ключевые компоненты системы поддержания внутриклеточного гомеостаза ионов Ca²⁺. Как показано в ряде экспериментальных работ, KB-R7943 способен помимо подавления активности NCX_{rev} взаимодействовать с различными типами ионных каналов. Среди них – Ca²⁺-каналы L-типа, K⁺ и Na⁺-каналы [54], RyR-каналы [55], TRP-каналы [56], депо-зависимый вход Ca²⁺ в культуре нейронов и астроцитов [57], а также митохондриальные унипортеры [58]. Поскольку индуцируемое KB-R7943 снижение силы сокращения в области низких частот стимуляции связано с одновременным подавлением потенцирующего эффекта паузы, можно предположить, что данный блокатор может понижать уровень Ca²⁺ в саркоплазматическом ретикулуме [45,46]. Одной из

возможных причин этого эффекта может быть его способность подавлять активность TRP-каналов [56] и депо-зависимый вход Ca²⁺ [57]. Существование данного типа каналов пока не показано в сердце зимоспящих животных, тем не менее есть основания предполагать, что они могут вносить определенный вклад в процесс пополнения уровня Ca²⁺ в саркоплазматическом ретикулуме. В частности, ранее нами показано, что блокатор данного типа каналов 2-аминоэтоксидифенилборат ингибирует силу сокращения в области низких частот стимуляции [59]. Учитывая широкий спектр действия KB-R7943, к интерпретации результатов, полученных с его использованием, следует подходить с определенной степенью осторожности.

Таким образом, на основании полученных нами данных можно говорить о возможном увеличении роли NCX_{rev} в регуляции силы сокращения сердца сусликов в период их подготовки к сезону спячки. Следует подчеркнуть, что в этот период (октябрь–середина ноября) суслики входят в состояние так называемой «пробной спячки» (периодически впадают в оцепенение на двое–трое суток при незначительном снижении температуры тела). Считается, что эти кратковременные погружения в сонное состояние – необходимый этап для формирования механизмов, обеспечивающих выживание гибернантов в зимний период при условиях, опасных реперфузионными повреждениями для большинства негибернирующих животных [43,44,60,61]. Фактически зимоспящие животные осеннего периода переживают состояния, сходные с ишемическим прекодиционированием, при котором, по ряду данных, также происходит повышение активности NCX_{rev} [62–65]. Это позволяет предположить наличие общности адаптационных механизмов спячки и ишемического прекодиционирования, а также делает актуальным их сравнительное изучение для открытия способов повышения стресс-ус-

ТОЙЧИВОСТИ ОБЫЧНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ЧЕЛОВЕКА.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. W. J. Lederer, E. Niggli, and R. W. Hadley, *Science* **248**, 283 (1990).
2. M. P. Blaustein and W. J. Lederer, *Physiol. Rev.* **79**, 763 (1999).
3. H. Reuter, C. Pott, J. I. Goldhaber, et al., *Cardiovasc. Res.* **67**, 198 (2005).
4. M. C. Jordan, S. A. Henderson, T. Han, et al., *J. Card. Fail.* **16**, 786 (2010).
5. M. Ottolia, N. Torres, J. H. Bridge, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.* **61**, 28–33. (2013).
6. D. M. Bers, S. Despa, and J. Bossuyt, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1080**, 165 (2006).
7. D. M. Bers and Y. Chen-Izu, *J. Physiol.* **593** (6), 1327 (2015).
8. G. T. Lines, J. B. Sande, W. E. Louch, et al., *Biophys. J.* **91**, 779 (2006).
9. P. Neco, B. Rose, N. Huynh, et al., *Biophys. J.* **99** (3), 755 (2010).
10. K. R. Sipido, M. Maes, and F. Van de Werf, *Circ. Res.* **81**, 1034 (1997).
11. M. Kohlhaas and C. Maack, *Circulation* **122** (22), 2273 (2010).
12. B. Pieske, L. S. Maier, V. Piacentino, 3rd, et al., *Circulation* **106**, 447 (2002).
13. S. M. Pogwizd and D. M. Bers, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **976**, 454 (2002).
14. J. Weisser-Thomas, V. Piacentino, 3rd, J. P. Gaughan, et al., *Cardiovasc. Res.* **57** (4), 974 (2003).
15. N. Bogeholz, L. Eckardt, and C. Pott, *Curr. Med. Chem.* **21** (11), 1330 (2014).
16. H. Hagihara, Y. Yoshikawa, Y. Ohga, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**, H1699 (2005).
17. K. Imahashi, C. Pott, J. I. Goldhaber, et al., *Circ. Res.* **97**, 916 (2005).
18. E. Murphy, H. R. Cross, and C. Steenbergen, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **976**, 421 (2002).
19. J. Zhang, K. Cheng, D. Lai, et al., *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8** (9), 10239 (2015).
20. S. Z. Li, F. Wu, B. Wang, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **561**, 14 (2007).
21. R. A. Bouwman, K. Salic, F. G. Padding, et al., *Circulation* **4**, 114 (2006).
22. C. E. Murry, R. B. Jennings, and K. A. Reimer, *Circulation* **74**, 1124 (1986).
23. С. А. Афанасьев, Е. Д. Алексеева, И. Б. Бардамова и С. А. Богомаз, *Экспериментальная и клиническая фармакология* **57** (4), 26 (1994).
24. D. M. Yellon and J. M. Downey, *Physiol. Rev.* **83**, 1113 (2003).
25. P. Birinyi, K. Acsai, T. Banyasz, et al., *Arch. Pharmacol.* **372**, 63 (2005).
26. Y. Watanabe, Y. Koide, and J. Kimura, *J. Pharmacol. Sci.* **102**, 7 (2006).
27. V. J. Bourgonje, M. A. Vos, S. Ozdemir, et al., *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* **6** (2), 371 (2013).
28. C. Pott, L. Eckardt, and J. Goldhaber, *Curr. Drug Targets* **12** (5), 737 (2011).
29. H. Reuter, M. P. Blaustein, and G. Haeusler, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **265**, 87 (1973).
30. M. P. Blaustein and C. J. Oborn, *J. Physiol.* **247**, 657 (1975).
31. T. Iwamoto, T. Watano, M. Shigekawa, *J. Biol. Chem.* **271**, 22391 (1996).
32. T. Brustovetsky, M. K. Brittain, P. L. Sheets, et al., *Br. J. Pharmacol.* **162** (1), 255 (2011).
33. C. F. Niu, Y. Watanabe, K. Ono, et al. *Eur. J. Pharmacol.* **573**, 161 (2007)
34. T. Matsuda, N. Arakawa, K. Takuma, et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **298**, 249 (2001)
35. H. Tanaka, K. Nishimaru, T. Aikawa, et al., *Br. J. Pharmacol.* **135**, 1096 (2002).
36. P. Birinyi, A. Tóth, I. Jóna, et al., *Cardiovasc. Res.* **78** (3), 476 (2008).
37. H. Satoh, K. S. Ginsburg, K. Qing, et al., *Circulation* **101** (12), 1441 (2000).
38. O. Yoshitomi, D. Akiyama, T. Hara, et al., *J. Anesth.* **19** (2), 124 (2005).
39. H. Cheng, G. L. Smith, J. C. Hancox, and C. H. Orchard, *Cell Calcium* **49**, 56 (2011).
40. M. S. Amran, N. Homma, and K. Hashimoto, *Cardiovasc. Drug Rev.* **21**, 255 (2003).
41. *Hibernation and Torpor in Mammals and Birds*, Ed. by C. P. Lyman, J. S. Willis, A. Malan, and L. C. H. Wang (Acad. Press., N.Y.–L., 1982).
42. L. C. H. Wang, in *Advances in Comparative and Environmental Physiology* (Springer-Verlag., Berlin, 1988), pp. 1–45.
43. M. J. Sheriff, C. T. Williams, G. J. Kenagy, et al., *J. Comp. Physiol. B. Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **182**, 841 (2012).
44. Y. Chayama, L. Ando, Y. Tamura, et al., *Roy. Soc. Open Sci.* **3** (4), 160002 (2016).
45. O. V. Nakipova, N. M. Zakharova, L. A. Andreeva, et al., *Cryobiology* **55**, 173 (2007).
46. S. Afanasiev, D. Kondratyeva, S. Popov, and R. Batalov, *Pharmacology & Pharmacy* **3** (3), 342 (2012).
47. A. Yatani, S. J. Kim, R. K. Kudej, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **286** (6), H2219 (2004).
48. X. C. Li, L. Wei, G. Q. Zhang, et al., *PLoS One* **6** (9), e24787 (2011).
49. A. E. Alekseev, N. I. Markevich, A. F. Korystova, et al., *Biophys. J.* **70**, 786 (1996)
50. Y. M. Kokoz, A. S. Grichenko, A. F. Korystova, et al., *Membr Cell Biol.* **14** (2), 277 (2000).
51. U. H. Schroder, J. Breder, C. F. Sabelhaus, et al., *Neuropharmacology* **38**, 319 (1999).
52. J. Breder, C. F. Sabelhaus, T. Opitz, et al., *Neuropharmacology* **39**, 1779 (2000).

53. J. Luo, Y. Wang, X. Chen, et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1099**, 292 (2007).
54. M. Ouardouz, G. W. Zamponi, W. Barr, et al., *Neuropharmacology* **48**, 566 (2005).
55. G. Barrientos, D. D. Bose, W. Feng, et al., *Mol. Pharmacol.* **76**, 560 (2009).
56. R. Kraft, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **361**, 230 (2007).
57. N. Arakawa, M. Sakaue, I. Yokoyama, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 354 (2000).
58. J. Santo-Domingo, L. Vay, E. Hernandez-SanMiguel, et al., *Br. J. Pharmacol.* **151**, 647 (2007).
59. О. В. Накипова, А. С. Аверин, С. В. Тарлачков и др., *Докл. РАН* **451** (5), 581 (2013).
60. M. T. Andrews, *Bioassays* **29**, 431 (2007).
61. R. L. Russell, P. H. O'Neill, L. E. Epperson, et al., *J. Comp. Physiol.* **180** (8), 1165 (2010).
62. C. C. Kurtz, S. L. Lindell, M. J. Mangino, and H. V. Carey, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **291** (5), G895 (2006).
63. K. R. Grabek, A. Karimpour-Fard, L. E. Epperson, et al., *Physiol. Genomics* **43**, 1263 (2011).
64. K. Drew, *J. Exp. Biol.* **216** (Pt 6), 927 (2013).
65. L. Yan, R. K. Kudej, D. E. Vatner, and F. Stephen, *110* (2), 9 (2015).

Effects of KB-R7943, an Inhibitor of Reverse $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchange, on the Force of Contraction of Papillary Muscles in the Heart of Ground Squirrel *Spermophilus undulatus*

A.S. Averin*, L.S. Kosarsky*, S.V. Tarlachkov ***, V.A. Vekhnik****, I.V. Averina*, A.E. Alekseev***** *****, E.E. Fesenko*, and O.V. Nakipova***

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

***Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences,
prosp. Nauki 5, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

****Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
prosp. Nauki 6, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

*****Sprygin Zhiguli State Natural Reserve,
Zhigulevskaya ul. 1, Bakhilova Polyana, Zhigulyovsk, Samara Region, 445362 Russia*

******Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region 142290, Russia;*

******Department of Molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics,
Stabile 5, Mayo Clinic, 200 1st Street SW, Rochester, MN 55905, USA*

We investigated the effect of KB-R7943, an inhibitor of the reverse mode of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, on the force of isometric contractions, the dependence of the force of these contractions on stimulation frequency and the effect of a pause (a qualitative parameter of Ca^{2+} levels in sarcoplasmic reticulum) in papillary muscles of the right ventricle in the heart of a ground squirrel during summer (June, $n = 4$) and autumn (October, $n = 4$) activity. Long-term (1.0 to 1.5 hours) application of KB-R7943 at 36°C in the presence of 1.8 mM Ca^{2+} produced no significant effects on the tested parameters in the heart papillary muscles of ground squirrels during summer activity at most stimulation frequencies. In animals during autumn activity KB-R7943 induced a 40–50% decrease in the force of contraction (negative inotropic effect) across a range of low stimulation frequencies (0.1–0.3 Hz), without having any significant effect in the 0.4–3.0 Hz frequency range. Furthermore, KB-R7943 caused a decline in the value of the pause effect by $50 \pm 21\%$ if the pause lasted longer than 120 s. The evidence obtained points to the effect of KB-R7943 on Ca^{2+} levels in sarcoplasmic reticulum and possible contribution of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange to the processes of physiological remodeling of Ca^{2+} homeostasis in myocardial cells of hibernating animals during the period preceding the transition to hibernation state.

Key words: heart, contractility, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, KB-R7943, hibernation, ground squirrels