

ГЛУБОКАЯ ГИПОТЕРМИЯ ИНВЕРТИРУЕТ ИНОТРОПНЫЙ ЭФФЕКТ ИЗОПРОТЕРЕНОЛА В МИОКАРДЕ КРЫСЫ

© 2023 г. К.В. Самодурова*, **, Ф.В. Тюрин*, А.С. Аверин*, #

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

**Санкт-Петербургский государственный технологический институт, Санкт-Петербург, Московский просп., 24-26/49, 190013, Россия

#E-mail: averinas82@gmail.com

Поступила в редакцию 10.08.2023 г.

После доработки 10.08.2023 г.

Принята к публикации 28.08.2023 г.

Проведено исследование эффектов агониста β -адренорецепторов изопротеренола на сократительную активность папиллярной мышцы правого желудочка сердца крысы как при температуре близкой к физиологической (30°C), так и в условиях глубокой гипотермии (10°C). При 30°C изопротеренол оказывает выраженный положительный инотропный эффект, сила сокращения увеличивается с 1.2 ± 0.1 мН в контроле до 2.4 ± 0.4 мН после добавления агониста, при этом происходит достоверное ускорение временных параметров сокращения, так, время достижения максимума сокращения уменьшалось с 101 ± 6 мс до 85 ± 4 мс; время расслабления до 50% — с 55 ± 3 мс до 36 ± 1 мс. В условиях гипотермии изопротеренол вызывал мощный отрицательный инотропный эффект, снижая силу сокращения с 2.2 ± 0.4 мН до 1.2 ± 0.4 мН. Как и при 30°C , сохранялась тенденция ускорения сокращения: время достижения максимума сокращения уменьшалось с 717 ± 52 мс до 624 ± 50 мс, а время расслабления до 50% — с 667 ± 86 мс до 450 ± 40 мс. Таким образом, в условиях глубокой гипотермии при 10°C направленность инотропного ответа на изопротеренол меняется с положительного на отрицательный, в то время как лузитропный эффект сохраняет негативный характер.

Ключевые слова: миокард, гипотермия, изопротеренол.

DOI: 10.31857/S0006302923050216, EDN: NALZOY

В настоящее время гипотермия широко используется в медицинских целях для минимизации ишемических повреждений [1, 2], в то же время гипотермия может нести существенную угрозу здоровью и вызывать множественные рассогласования в работе различных органов и систем [3, 4]. Одним из таких последствий может быть недостаточное кровоснабжение органов вызванное падением сердечного выброса [5], в связи с этим изучение инотропных эффектов различных соединений в условиях гипотермии остается крайне актуальной задачей. Широко известна значимость адренергической регуляции сердечно-сосудистой системы которая осуществляется через β , $\alpha 1$ и $\alpha 2$ типы адренорецепторов (АР), внутри каждого из которых существуют подтипы, различающиеся по своей функции и представленности

в различных тканях [6], при этом традиционно ведущая роль в регуляции сократительной активности сердца отводится именно β -АР [7], хотя конечно нельзя игнорировать и роль $\alpha 1$ -АР [8] и $\alpha 2$ -АР [9].

$\beta 1$ -АР являются преобладающей формой в сердце и обеспечивают большую часть инотропного ответа миокарда в норме, в то время как при сердечной недостаточности значимость $\beta 1$ -рецепторов заметно снижается и $\beta 2$ -рецепторы играют компенсаторную роль [10]. При этом гиперактивация $\beta 1$ -АР в большинстве случаев расценивается как кардиотоксическая, в то время как активация $\beta 2$ -АР выполняет кардиопротективную роль [11–13]. Примечательно, что $\beta 2$ -АР участвуют в кардиопротекторных эффектах холодной акклиматизации [14], что делает изучение этого сигнального пути особенно интересным в контексте гипотермии. $\beta 3$ -АР весьма малочисленны в здоровом миокарде, но их количество

Сокращения: АР — адренергические рецепторы, сАРМ — циклический аденозинмонофосфат.

возрастает при застойной кардиомиопатии [15], при этом инотропный ответ может носить разнонаправленный характер [15–17]. Этому типу рецепторов также отводится кардиопротекторная роль и их активация рассматривается как возможная терапевтическая стратегия при ишемии сердца и сердечной недостаточности [18–21].

Несмотря на столь широкий выбор потенциальных мишеней для фармакологических исследований в состоянии гипотермии, считается, что преимущественно срабатывает каскад, связанный с активацией β_1 -АР, причем традиционно используют малоселективные соединения, такие как изопротеренол или адреналин [22]. Следует отметить, что большинство исследований ограничивается снижением температуры до 20°C, при этом имеются свидетельства как позитивного так и отрицательного инотропного эффектов изопротеренола [23, 24]. Дополнительный интерес к действию изопротеренола в условиях глубокой гипотермии вызван еще и тем, что в клинической практике изопротеренол может восстанавливать нормальное функционирование сердца в случаях нарушения электрической активности сердца, вызванного переохлаждением организма [25, 26]. Таким образом, однозначного понимания эффектов изопротеренола в условиях гипотермии нет, и целью нашего исследования было выявить эти эффекты изопротеренола в условиях, близких физиологическим (30°C), и в условиях глубокой гипотермии (10°C).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на папиллярных мышцах правого желудочка лабораторных крыс породы Wistar с массой тела 200–250 г.

Животных предварительно наркотизировали диэтиловым эфиром. Выделенное сердце помещали в раствор Тироде (20°C) следующего состава (в мМ): NaCl – 135, KCl – 4, MgCl₂ – 1, CaCl₂ – 1.8, NaHCO₃ – 13.2, NaH₂PO₄ – 1.8, глюкоза – 11 (рН 7.4). Раствор аэрировали газовой смесью: O₂ (95%) + CO₂ (5%). Выделение папиллярных мышц, стимуляцию и измерение силы сокращения в изометрическом режиме проводили по ранее описанной методике [27] при температуре перфузирующего раствора 30±0.1 и 10±0.1°C. Для исследования их механической активности использовали автоматизированную установку на основе персонального компьютера и плат АЦП–ЦАП (L-Card 154 и L-Card E14-440). Механическую активность мышц регистрировали с помощью механотрона 6X-2М. В начале каждого опыта препарат стимулировали прямоугольными им-

пульсами (напряжение 5 В; длительность 5 мс; сила тока, в 2 раза превышающую пороговую) частотой 0.3 Гц в течение 1 ч для стабилизации силы сокращения. После адаптационного периода в случае экспериментов при 30°C в перфузионный раствор добавляли изопротеренол в концентрации 1 мкМ на протяжении 30 мин; в случае экспериментов при 10°C температуру в камере в течение 20 мин снижали с 30°C до 10°C, после чего папиллярные мышцы дополнительно адаптировали еще 10 мин и уже после этого проводили добавку изопротеренола, как описано ранее.

Достоверность полученных результатов оценивали с помощью парного теста Стьюдента (по уровню значимости $p < 0.05$). Данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка среднего. Статистический анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2019 и GraphPad Prism 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В работе проведено исследование эффектов агониста β -адренорецепторов изопротеренола в концентрации 1 мкМ на сократительную активность папиллярной мышцы правого желудочка сердца крысы как при температуре, близкой к физиологической (30°C), так и в условиях гипотермии (10°C). Как видно из рис. 1а,б, при 30°C изопротеренол оказывает выраженный положительный инотропный эффект, сила сокращения увеличивается на $95 \pm 23\%$: с 1.2 ± 0.1 мН в контроле до 2.4 ± 0.4 мН после добавления агониста. Такое увеличение силы сокращений хорошо описано в литературе как для нормотермных животных, таких как хорек [28] и мышь [29], так и для гибернаторов в сезоны летней активности [30, 31].

В то же время при 10°C изопротеренол вызывал мощный отрицательный инотропный эффект, снижая силу сокращения на $54 \pm 3\%$: с 2.2 ± 0.4 мН до 1.2 ± 0.4 мН (рис 1в,г). Сопоставимые данные описаны в литературе: в предсердиях крысы снижение температуры до 28°C уменьшало положительный инотропный эффект изопротеренола, и при 20°C эффект становился отрицательным [23], также схожий эффект обнаруживался и при перфузии целого сердца крысы [32].

Однако в желудочковом миокарде кролика изопротеренол вызывает мощный рост силы сокращений при 30°C [33], который сохраняется даже при 22°C [24]. В то же время в предсердиях кролика охлаждение до 20°C значительно снижает эффект изопротеренола [34]. В предсердии морской свинки в условиях гипотермии изопротеренол также вызывал мощный рост силы сокра-

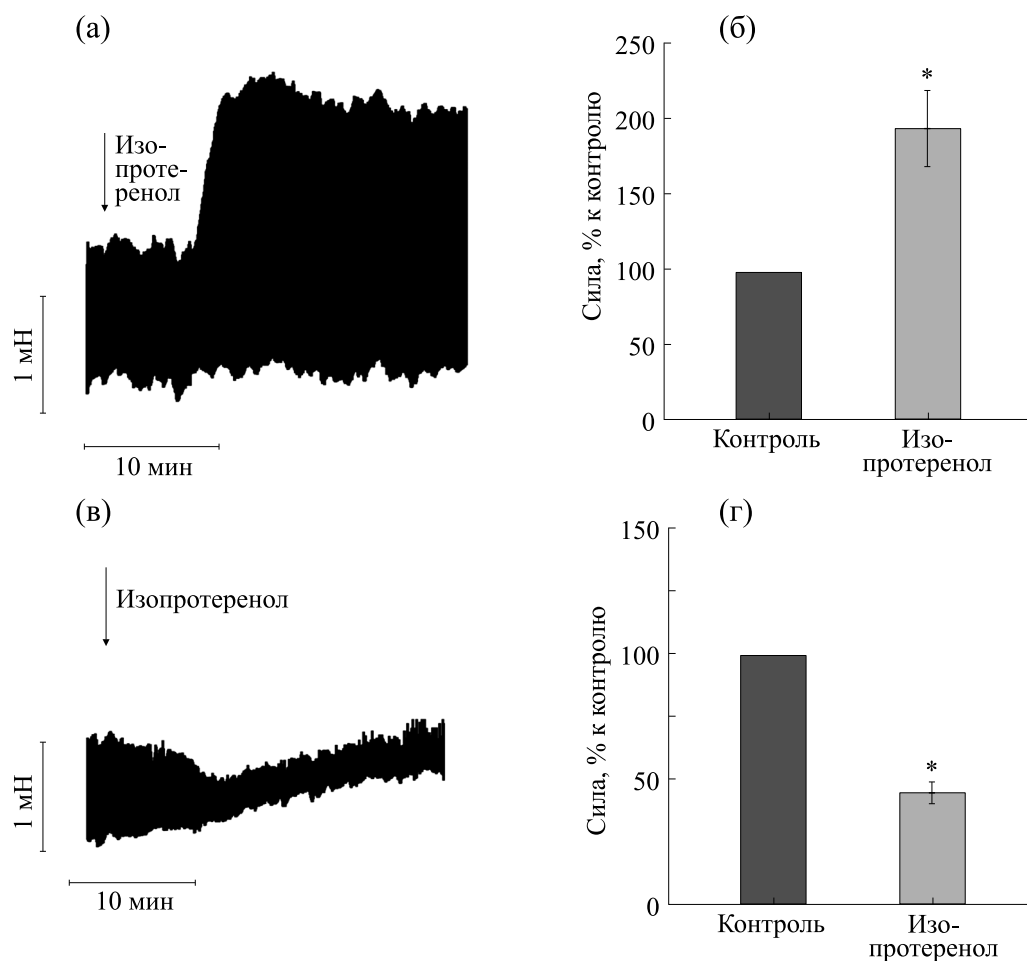


Рис. 1. Влияние изопротеренола (1 мкМ) на силу сокращений папиллярной мышцы сердца крысы при температуре, близкой к физиологической (30°C, рис. (а) и (б)), и в условиях глубокой гипотермии (10°C, рис. (в) и (г)): (а) и (в) — примеры оригинальных записей при 30°C и 10°C соответственно; (б) и (г) — соответствующие статистические данные, представленные как средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего (* — $p < 0.05$).

щений [35], в некоторых случаях чувствительность к изопротеренолу даже возрастала в условиях гипотермии [36–38]. Данные факты, по-видимому, иллюстрируют межвидовые различия в физиологии миокарда. Известно, что сокращения желудочкового миокарда кролика значительно больше зависят от входа внеклеточного Ca^{2+} , чем сокращения миокарда желудочков крысы [39], возможно, именно в этом и кроется основная причина различия. Однако для точного установления причинно-следственных связей необходимы дальнейшие исследования.

Следующим фактором, способным повлиять на направление инотропного эффекта, является чувствительность миофиламентов к Ca^{2+} . В работе [38] было показано увеличение чувствительно-

сти миофиламентов к Ca^{2+} в условиях гипотермии (27°C) в миокарде морской свинки, что ожидаемо должно было бы привести к росту силы сокращения. Однако полученные нами данные не согласуются с увеличением чувствительности миофиламентов к Ca^{2+} в условиях гипотермии в миокарде морской свинки и, напротив, хорошо согласуются с данными работы, где для миокарда крысы было показано снижение чувствительности миофиламентов в состоянии гипотермии. Примечательно что в этой же работе миокард морской свинки демонстрировал отсутствие изменений чувствительности миофиламентов к Ca^{2+} как при 24°C так и при 30°C [40].

Отрицательный инотропный эффект изопротеренола может быть связан с нарушением транс-

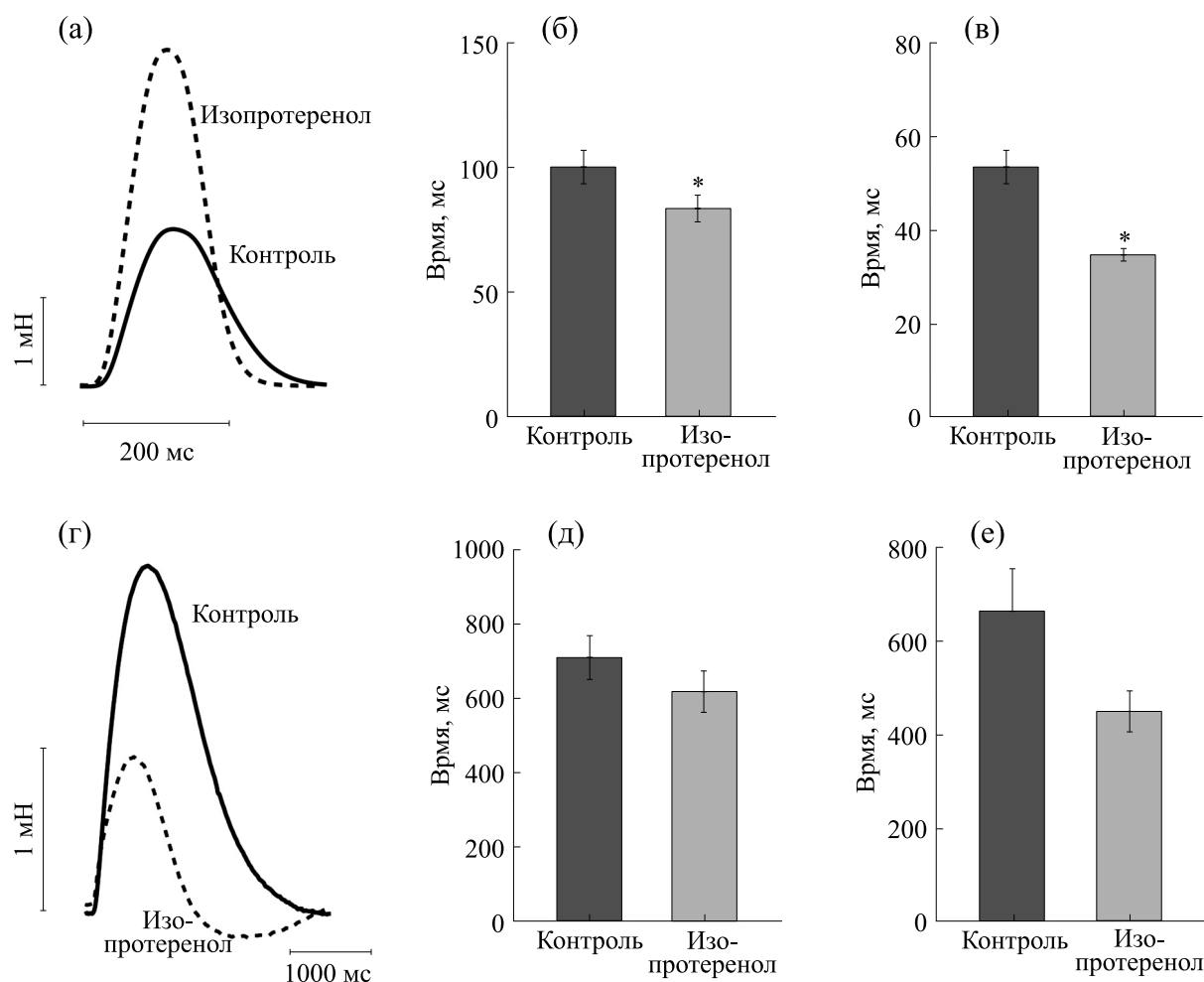


Рис. 2. Влияние изопротеренола (1 мкМ) на временные параметры сокращений папиллярной мышцы сердца крысы при температуре, близкой к физиологической (30°C, рис. (а)–(в)), и в условиях глубокой гипотермии (10°C, рис. (г)–(е)): (а) и (г) – примеры оригинальных записей сокращений при 30°C и 10°C соответственно; (б) и (д) – соответствующие статистические данные по времени достижения максимума сокращения; (в) и (е) – соответствующие статистические данные по времени расслабления до 50%. Данные представлены как средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего (* – $p < 0,05$).

мембранного ионного баланса в условиях гипотермии, что может привести к частичной деполяризации мембраны [41, 42] и, как следствие, к падению входящего Ca^{2+} -тока (как было показано на кардиомиоцитах крысы [43]).

Как видно из рис. 2а–в, при 30°C изопротеренол вызывает выраженный отрицательный лузитропный эффект, так, время достижения максимума сокращения уменьшалось с 101 ± 6 мс до 85 ± 4 мс; время расслабления до 50% – с 55 ± 3 мс до 36 ± 1 мс. При 10°C тенденция снижения времени достижения максимума сокращения сохраняется: с 717 ± 52 мс до 624 ± 50 мс, а время расслабления до 50% – с 667 ± 86 мс до 450 ± 40 мс, но достоверность эффекта исчезает

(рис. 2г–е). Следует отметить, что в основе вызываемого β -адренергической стимуляцией лузитропного эффекта лежит увеличение сАМР, что ведет к фосфорилированию множества компонентов электромеханического сопряжения [22]. При этом гипотермия сама по себе значительно увеличивает уровень сАМР [44], что может маскировать лузитропный эффект изопротеренола. В то же время литературные данные показывают, что в состоянии гипотермии образование сАМР в ответ на β -адренергическую стимуляцию может быть даже увеличено. Тогда причина подобного снижения отрицательного лузитропного эффекта изопротеренола связана не с ограничением про-

дукции cAMP, а с Ca^{2+} -перегрузкой кардиомиоцитов [45].

ВЫВОДЫ

В условиях глубокой гипотермии при 10°C изопротеренол вызывает отрицательный инотропный ответ, в тоже время сохраняет тенденцию к проявлению негативного лизитропного ответа. Данные факты свидетельствуют о существенном изменении реакции компонентов электрохимического сопряжения миокарда в ответ на β -адренергическую стимуляцию, что и привело к наблюдаемому обращению эффекта изопротеренола.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 23-25-00204.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных 1986, 86/609/ЕЕС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Arrich, N. Schütz, J. Oppenauer, et al., *Cochrane Database Syst. Rev.*, **5**, CD004128 (2023).
2. T. P. Grazioso and N. Djouder, *iScience*, **26**, 107010 (2023).
3. A. F. Aslam, A. K. Aslam, B. C. Vasavada, et al., *Am. J. Med.*, **119**, 297 (2006).
4. K. C. Wong, *West J. Med.*, **138**, 227 (1983).
5. T. Wood and M. Thoresen, *Semin. Fetal Neonatal Med.*, **20**, 87 (2015).
6. L. Matušková and M. Javorka, *Physiol. Res.*, **70**, S495 (2021).
7. G. Wallukat, *Herz*, **27**, 683 (2002).
8. T. D. O'Connell, B. C. Jensen, A. J. Baker, et al., *Pharmacol. Rev.*, **66**, 308 (2014).
9. O. Yu. Pimenov, M. H. Galimova, E. V. Evdokimovskii, et al., *Biophysics*, **64** (5), 738 (2019).
10. M. Khamssi and O. E. Brodde, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **16** (Suppl 5), S1337 (1990).
11. A. J. Baker, *Pflugers Arch.: Eur. J. Physiol.*, **466**, 1139 (2014).
12. G. Fajardo, M. Zhao, G. Berry, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **51**, 781 (2011).
13. Y. Song, C. Xu, J. Liu, et al., *Circ. Res.*, **128**, 262 (2021).
14. V. Tibenska, A. Marvanova, B. Elsnicova, et al., *J. Appl. Physiol.*, **130**, 746 (2021).
15. S. Moniotte, L. Kobzik, O. Feron, et al., *Circulation*, **103**, 1649 (2001).
16. T. Angelone, E. Filice, A. M. Quintieri, et al., *Acta Physiol. (Oxford)*, **193**, 229 (2008).
17. R. Treinys, D. Zablockaitė, V. Gendvilienė, et al., *J. Membr. Biol.*, **247**, 309 (2014).
18. J. García-Prieto, J. M. García-Ruiz, D. Sanz-Rosa, et al., *Basic Res. Cardiol.*, **109**, 422 (2014).
19. G. Kayki-Mutlu, I. Karaomerlioglu, E. Arioglu-Inan, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **858**, 172468 (2019).
20. C. Pott, K. Brixius, W. Bloch, et al., *Pharmazie*, **61**, 255 (2006).
21. R. Salie, A. Kh. H. Alsahlin, E. Marais, et al., *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **33**, 163 (2019).
22. E. S. Dietrichs, G. Sager, and T. Tveita, *Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med.*, **24**, 143 (2016).
23. A. L. Melnikov, J. E. Løkebo, D. A. Lathrop, et al., *Gen. Pharmacol.*, **27**, 665 (1996).
24. L. Riishede, F. Nielsen-Kudsk, *Pharmacol. Toxicol.*, **66**, 354 (1990).
25. P. Badertscher, M. Kuehne, B. Schaer, et al., *BMC Cardiovasc. Disord.*, **17**, 277 (2017).
26. T. Takahiro, S. Kou, Y. Toshinobu, et al., *Heart Rhythm*, **12**, 644 (2015).
27. A. S. Averin, M. N. Nenov, V. G. Starkov, et al., *Toxins (Basel)*, **14** (2022).
28. O. Okazaki, N. Suda, K. Hongo, et al., *J. Physiol.*, **423**, 221 (1990).
29. D. B. Hoover, T. R. Ozment, R. Wondergem, et al., *Shock*, **43**, 185 (2015).
30. A. S. Averin, N. M. Zakharova, D. A. Ignat'ev, et al., *Biophysics*, **55** (5), 910 (2010).
31. N. Kondo, *Circ. Res.*, **59**, 221 (1986).
32. K. J. Broadley, *Br. J. Pharmacol.*, **45**, 123 (1972).
33. M. Mattheussen, K. Mubagwa, H. van Aken, et al., *Anest. and Analg.*, **82**, 975 (1996).
34. S. A. Omar, D. Hammad, and S. Varma, *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, **23**, 199 (1979).
35. T. E. Tenner and J. H. McNeill, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **56**, 926 (1978).
36. K. J. Broadley and J. H. McNeill, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **61**, 572 (1983).
37. R. G. Chess-Williams and K. J. Broadley, *Eur. J. Pharmacol.*, **108**, 25 (1985).
38. Y. Nakae, S. Fujita, and A. Namiki, *Anest. and Analg.*, **93**, 846 (2001).
39. D. M. Bers, *Circ. Res.*, **87**, 275 (2000).
40. S. Miyamoto, M. Hori, M. Izumi, et al., *Jpn. J. Pharmacol.*, **85**, 75 (2001).
41. R. Carpentier and M. Vassalle, *Circ. Res.*, **31**, 507 (1972).
42. J. Deleze, *Circ. Res.*, **8**, 553 (1960).
43. Y. Kokoz, A. S. Grichenko, A. F. Korystova, et al., *Biosci. Rep.*, **19**, 17 (1999).
44. D. Reinhardt, R. Butzheim, O. E. Brodde, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **48**, 107 (1978).
45. E. S. Dietrichs, T. Schanche, T. Kondratiev, et al., *Cryobiology*, **70**, 9 (2015).

The Inversion of the Inotropic Effect of Isoproterenol in the Rat Myocardium during Deep Hypothermia

C.V. Samodurova*, **, F.V. Turin*, and A.S. Averin*

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 1422290 Russia*

***St. Petersburg State Institute of Technology, Moskovskii prosp. 24-26/49, St. Petersburg, 190013 Russia*

The present study examined the effects of the β -adrenergic receptor agonist, isoproterenol, on contractile activity of right ventricle papillary muscles in the rat heart at near-physiological temperature (30°C) and under conditions of deep hypothermia (10°C). Isoproterenol exerts a pronounced positive inotropic effect at 30°C. After agonist addition, the force of contraction increases from 1.2 ± 0.1 mN in control to 2.4 ± 0.4 mN that leads to a reliable acceleration of time parameters of contraction. So, time-to-maximum contraction decreased from 101 ± 6 ms to 85 ± 4 ms; time-to-50% relaxation declined from 55 ± 3 ms to 36 ± 1 ms. Under hypothermic conditions, isoproterenol produced a powerful negative inotropic effect, reducing the force of contraction from 2.2 ± 0.4 mN to 1.2 ± 0.4 mN. Similarly as at 30°C, there was a tendency for increase in contraction speed, so time-to-maximum contraction decreased from 717 ± 52 ms to 624 ± 50 ms, and time-to-50% relaxation was shortened from 667 ± 86 ms to 450 ± 40 ms. Thus, under conditions of deep hypothermia at 10°C, the isoproterenol-induced inotropy changes from positive to negative, while negative lusitropic effect remains clear.

Keywords: myocardium, hypothermia, isoproterenol