

УДК 612.172.2, 612.172.3, 612.178.2

**УСТОЙЧИВОСТЬ ПРЕДСЕРДНОГО МИОКАРДА
ЯКУТСКОГО СУСЛИКА *Citellus undulatus*
К ХОЛОДОВЫМ НАРУШЕНИЯМ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ ОБУСЛОВЛЕНА
ПОСТРЕПОЛЯРИЗАЦИОННОЙ РЕФРАКТЕРНОСТЬЮ**

В. С. Кузьмин^{1,2,*}, А. А. Абрамов³, Ю. В. Егоров³, академик РАН Л. В. Розенштраух³

Поступило 18.03.2019 г

Желудочковый и предсердный миокард зимоспящих животных демонстрирует устойчивость к холодоиндуцированным аритмиям. Электрофизиологические механизмы, лежащие в основе этого феномена, не изучены. Данная работа направлена на изучение биоэлектрической активности предсердного миокарда зимоспящих животных – якутских сусликов *Citellus undulatus* при гипотермии. Для этого регистрировали потенциалы действия с помощью микроэлектродной техники в изолированных многоклеточных препаратах предсердного миокарда зимних гибернарующих и летних активных сусликов при 37, 27 и 17 °С. Оценивали длительность потенциалов действия и рефрактерного периода. Гипотермия вызывает увеличение длительности потенциалов действия и длительности рефрактерного периода в предсердном миокарде как у гибернарующих, так и у летних активных животных. Длительность рефрактерности в предсердном миокарде как у зимних гибернарующих, так и у летних активных сусликов при гипотермии, но не при 37 °С, превышает длительность потенциалов действия, что позволяет говорить о существовании постреполяризационной рефрактерности, которая, возможно, играет существенную роль в обеспечении устойчивости предсердного миокарда зимоспящих животных к холодным аритмиям.

Ключевые слова: гибернация, гипотермия, аритмия, потенциал действия, постреполяризационная рефрактерность, холодные аритмии.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524865631-637>

ВВЕДЕНИЕ

Сердце зимоспящих (гибернантов) животных рассматривается в настоящее время как природная модель, демонстрирующая устойчивость миокарда к ишемическому повреждению и аритмиям. Якутские суслики (*Citellus undulatus*) являются одними из самых ярких представителей зимоспящих гетеротермных животных. Для этих гибернантов характерны наиболее продолжительные периоды гипотермической гипометаболической спячки, в ходе которых температура их тела может снижаться от

37 °С до –1 °С. Во время гипотермической спячки у них сохраняется координированная ритмическая сердечная деятельность. У всех незимоспящих млекопитающих при снижении температуры тела до 30–17 °С возникают так называемые холодоиндуцированные аритмии, фибрилляция предсердий и желудочков, в результате чего организованная активность сердца прекращается [1–3].

Установлено, что сердце гибернарующего животного отличается от сердца незимоспящего животного по огромному числу параметров на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях. Однако, несмотря на более чем вековую историю изучения физиологии гибернантов и феномена гибернации, электрофизиологические механизмы устойчивости сердца этих животных к нарушениям ритма полностью не выяснены.

подавляющая часть работ, касающихся электрофизиологии сердца зимоспящих животных, направлена на изучение особенностей желудочкового миокарда [4–6]. Биоэлектрическая активность предсер-

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Москва

³Институт экспериментальной кардиологии “РКНПК”
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Москва

*E-mail: ku290381@mail.ru

дного миокарда гибернантов в различных состояниях практически полностью не исследована. Известны только две публикации, характеризующие биоэлектрическую активность [7, 8], и одна работа, характеризующая сократимость [9] предсердий зимоспящих животных при гипотермии. Цель настоящей работы заключалась в изучении особенностей потенциалов действия и рефрактерности при средней гипотермии в предсердном миокарде сусликов в период летней активности, а также у гибернирующих животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на изолированных многоклеточных перфузируемых препаратах предсердий зимних гибернирующих (ЗГ) и летних активных (ЛА) якутских сусликов (*Citellus undulatus*). Сусликов, отловленных в Якутии, содержали в тёмной комнате, при температуре +2 °С, где они впадали в спячку. В декабре-январе животных брали в момент времени, соответствующий середине периода спячки, для чего контролировали активность и температуру тела. Эксперименты с активными животными проводили в середине лета; их содержали в виварии при 12-часовом световом дне в обычных условиях.

Перед экспериментом животных декапитировали, осуществляли выделение предсердного миокарда. В экспериментах с ЛА выделение проводили при 20 °С; в случае ЗГ — при 2–4 °С, после препараты фиксировали в перфузионной камере, температуру раствора в которой постепенно (1 °С за 3 мин) повышали до 37 °С. Перфузию осуществляли в камере объемом 5 мл со скоростью протока 15 мл/мин оксигенированным (95% O₂ и 5% CO₂) раствором следующего состава (мМ): NaCl 130; KCl 4,7; NaH₂PO₄·2H₂O 1,2; NaHCO₃ 18; MgCl₂ 1,05; CaCl₂ 3; глюкоза 11. Значение pH 7,2–7,4. Ритм работы многоклеточных препаратов задавали при помощи серебряных электродов, соединённых со стимулятором ЭСЛ-2. Длительность стимула составляла 2 мс при 37 °С, 3–4 мс при 27–17 °С; амплитуда стимула устанавливалась в два раза больше порога возбуждения.

Потенциалы действия (ПД) регистрировали при 37, 27 и 17 °С с помощью стандартной микроэлектродной техники с использованием стеклянных микроэлектродов ($\Omega = 10\text{--}20$ МОм), заполненных 3М KCl, усилителя WPI701 (“WPI Instruments”, США), АЦП L-card E-154 (Россия) и ПК с программой Power Graph 3.3 (Россия). В ходе обработки измеряли длительность ПД на уровне 50 и 90% реполяризации

(ДПД50 и ДПД90) с помощью ПО MiniAnalysis 6.0.7. (Synaptosoft, США) [1, 7].

Оценку рефрактерного периода (РП) предсердий выполняли с использованием стандартного “экстрасистолического” протокола, согласно которому после 20 “прекондиционирующих” стимулов S, следовавших с постоянными интервалами (500, 300, 250 или 200 мс), подавали внеочередной стимул S1. Интервал времени между 20-м прекодиционирующим и внеочередным стимулом S1 постепенно снижали (с шагом 4–20 мс) до тех пор, когда в ответ на внеочередной стимул развития ПД не наблюдали. Интервал времени от прекодиционирующего стимула до того внеочередного стимула, который не вызывал ПД, считали длительностью РП. Оцениваемый таким образом РП приблизительно соответствует длительности эффективного рефрактерного периода, определяемого *in vivo*. Длительность РП определяли при 37, 27 и 17 °С. Для того, чтобы выявить постреполяризационную рефрактерность (ПРР), нормализовали РП на ДПД90.

Для статистической обработки результатов использовали программу Statistica 6.0 (StatSoft Inc.). Статистически значимые различия между группами выявляли с помощью двухфакторной ANOVA (с последующим применением тестов для множественных сравнений в группах с повторными или независимыми *post-hoc* измерениями, а также последующим внесением поправки Даннета) после предварительной проверки нормальности распределения в группах с помощью теста Шапиро–Вилка. Различия считались значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гипотермия вызывает увеличение длительности ПД (ДПД) в предсердном миокарде гибернирующих и активных сусликов. Такое влияние гипотермии на ДПД характерно практически млекопитающих животных. На рис. 1а приведён характерный пример, отражающий изменение ПД у гибернирующего суслика при снижении температуры от 37 до 17 °С. Увеличение длительности ПД как у ЗГ, так и у ЛА животных при охлаждении происходит преимущественно за счёт роста ДПД90, в то время как длительность ПД на уровне 50% реполяризации меняется слабо (рис. 1а, б, в дальнейшем данные по ДПД50 не приведены). Холодоиндуцированные изменения ПД у сусликов выражаются в замедлении фазы окончательной реполяризации ПД, которое, вероятно, обусловлено изменением характеристик

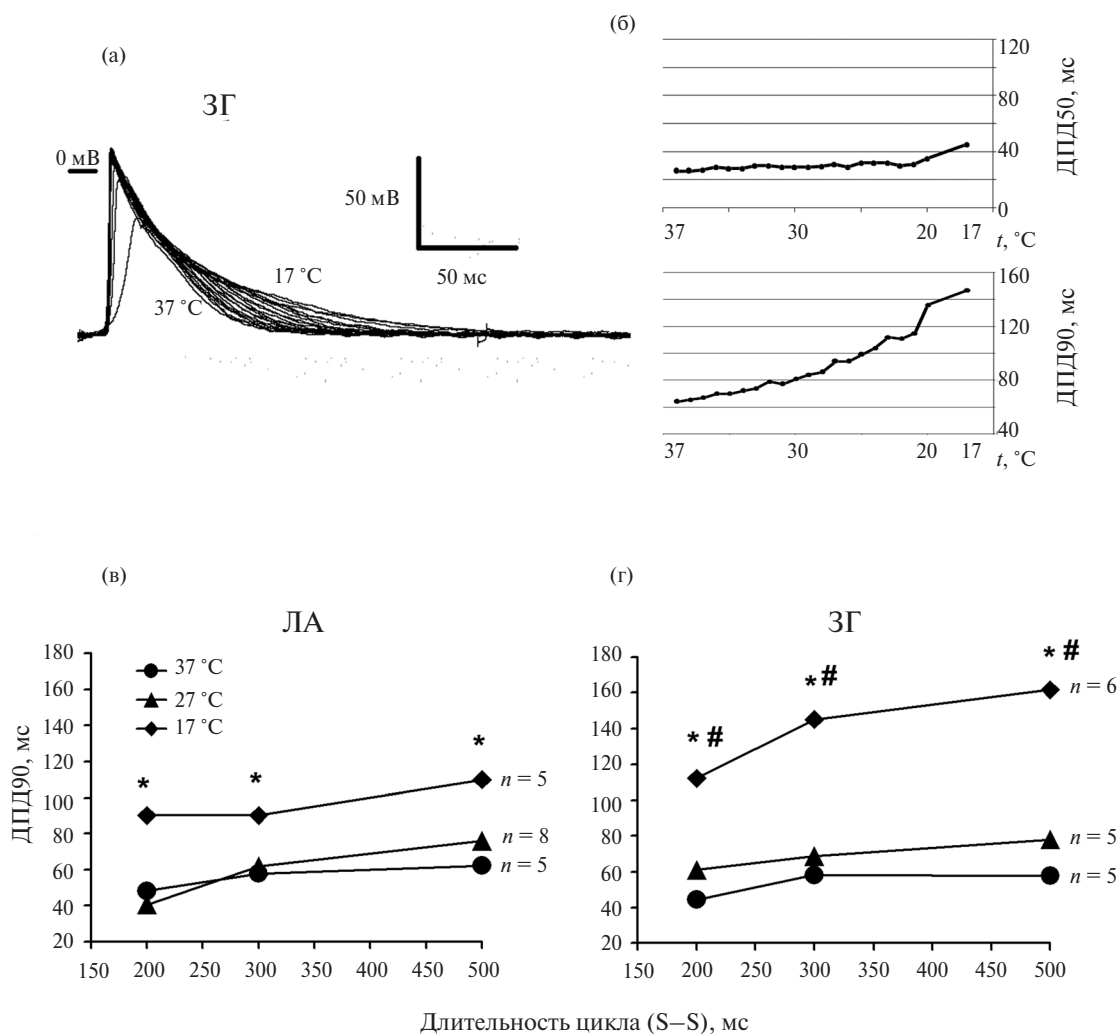


Рис. 1. Влияние гипотермии на потенциалы действия (ПД) предсердного миокарда якутских сусликов. а — репрезентативный пример изменения конфигурации предсердного ПД зимнего гибернирующего (ЗГ) суслика при снижении температуры от 37 до 17 °С. б — снижение температуры слабо влияет на длительность предсердного ПД на уровне 50% реполяризации (ДПД50), но приводит к увеличению длительности на уровне 90% реполяризации (ДПД90). в, г — зависимость длительности ПД (ДПД90) в предсердии гибернирующего (ЗГ) и летнего активного суслика (ЛА) от длительности цикла (интервала между стимулами) при 37 °С и гипотермии. * — $p < 0,05$ (от значения при 37 °С). # — $p < 0,05$ (от значения при 27 °С). Здесь и на рис. 2: n — количество животных и многоклеточных препаратов.

калиевых реполяризующих токов. Так как ДПД50 коррелирует с величиной кальциевого деполяризующего трансмембранного тока, можно предположить, что кальциевые токи в предсердном миокарде гибернантов менее чувствительны к температуре, чем калиевые.

Как и у ЗГ, так и у ЛА длительность предсердных ПД растёт при увеличении длительности цикла (рис. 1в, г). Эта зависимость сохраняется при гипотермии, хотя у гибернирующих животных при наименьшей протестированной температуре (17 °С) зависимость ДПД от ритма оказывается наиболее выраженной (рис. 1г): у гибернирующих животных ДПД90 менялась от 112 ± 11 мс до

162 ± 18 мс ($n = 6$) при стимуляции с интервалами 200 и 500 мс соответственно. В целом характер изменения длительности ПД в зависимости от ритма и при охлаждении у сусликов схож с таковым, наблюдаемым у незимоспящих мелких грызунов, например крыс.

Как и в случае с длительностью ПД, гипотермия в предсердном миокарде летних активных и гибернирующих сусликов вызывает типичный для млекопитающих животных эффект — увеличение длительности рефрактерности (рис. 2а, б). Длительность РП у ЗГ и ЛА зависит от ритма возбуждения предсердного миокарда: в целом, увеличение интервала между стимулами приводит к росту длительности

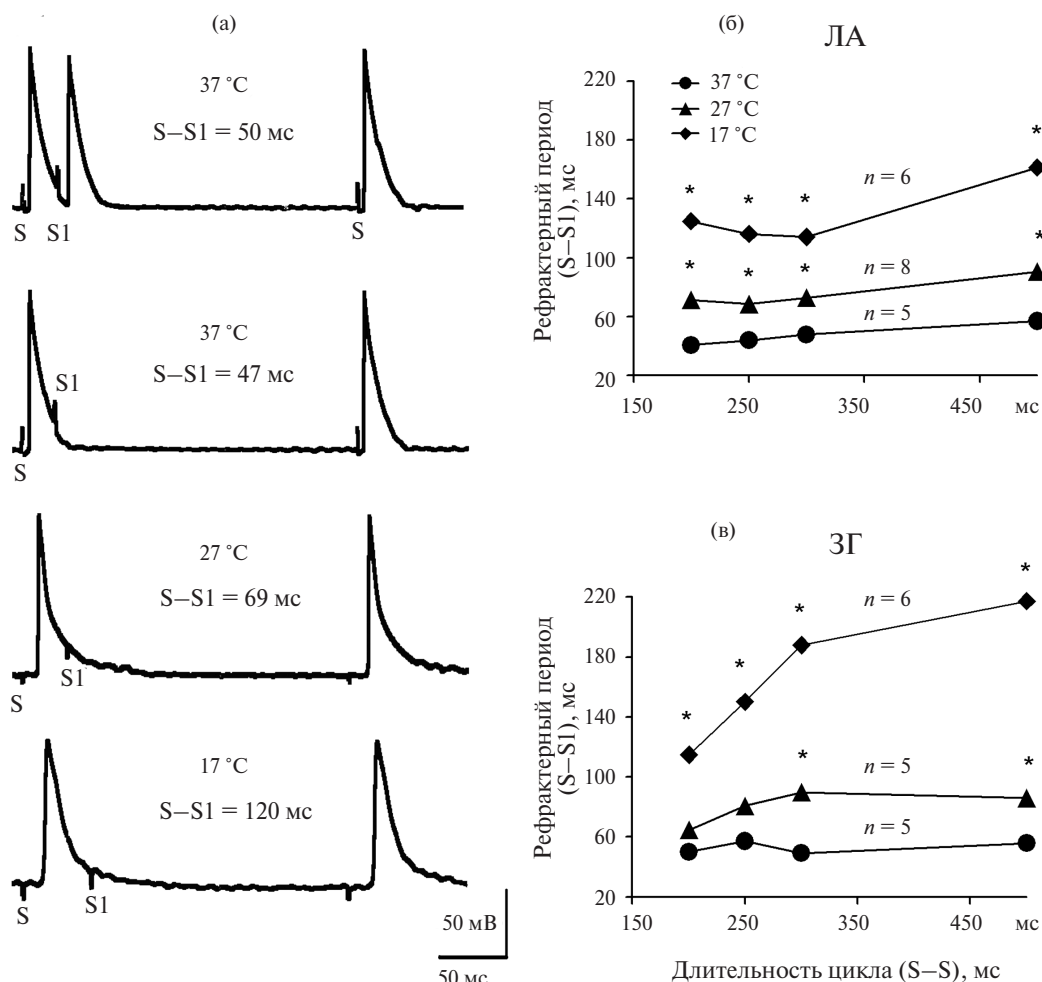


Рис. 2. Влияние гипотермии на длительность рефрактерности в предсердном миокарде якутских сусликов. а — репрезентативные примеры, отражающие момент предшествующий наступлению рефрактерности (сверху); соответствующие моментам наступления рефрактерности при 37, 27, 17 °С в предсердии гибернирующего суслика. б, в — зависимость длительности рефрактерного периода в предсердии гибернирующего (ЗГ) и летнего активного суслика (ЛА) от длительности цикла (интервала между стимулами) при 37 °С и гипотермии. * — $p < 0,05$ (от значения при 37 °С).

рефрактерности у сусликов, что является характерным также для желудочкового и предсердного миокарда незимоспящих животных. Наиболее выраженной зависимостью длительности РП от интервала между стимулами оказывается у гибернирующих сусликов при наименьшей протестированной температуре: длительность рефрактерности менялась от 115 ± 16 до 217 ± 20 мс ($n = 6$) при стимуляции с интервалами 200 и 500 мс соответственно (рис. 2в).

Величина рефрактерного периода, нормализованная на длительность ПД при 37 °С оказывается существенно меньше единицы у активных сусликов в диапазоне длительностей цикла 200–500 мс (рис. 3а). Такое соотношение характерно незимоспящим животным, для которых установлено, что величина рефрактерности (величина эффективного рефрактерного периода) составляет 66–85% от дли-

тельности ПД. У ЗГ сусликов при 37 °С нормализованная рефрактерность также приближается к единице, либо незначительно превышает это значение (рис. 3б). Однако при гипотермии (27 и 17 °С) величина нормализованной рефрактерности в предсердном миокарде при длительностях цикла 500 и 200 мс у ЛА, 500 и 300 мс у ЗГ статистически значимо больше, чем при 37 °С, а также существенно больше единицы (рис. 3). Таким образом, гипотермия вызывает появление в предсердном миокарде сусликов постреполяризационной рефрактерности, т.е. нетипичного состояния, когда длительность РП (иначе, время, необходимое для восстановления возбудимости) значительно превышает длительность потенциалов действия и время реполяризации (в наших экспериментах — на значения, близкие к 30%).

В данной работе впервые прямо продемонстрировано существование постреполяризационной рефрактерности в предсердном миокарде зимоспящих животных. Ранее нами было установлено, что в желудочковом миокарде сусликов длительность рефрактерного периода при охлаждении до 17 °С увеличивается и практически достигает длительности ПД [1]. В предсердном миокарде, в отличие от желудочкового, ПРР наблюдается уже при слабой гипотермии (27 °С) как у гибернарующих, так и у активных животных, и достигает большей величины, чем в желудочковом миокарде. В предсердном миокарде сусликов ПРР слабо зависит от ритма, так как сходные значения наблюдали как при стимуляции с интервалами 200, так и 500 мс.

Постреполяризационная рефрактерность может наблюдаться не только у гибернантов, но также может возникать и при нормотермии в миокарде незимоспящих животных. У незимоспящих животных ПРР может играть двоякую роль в зависимости от условий. Показано, что ПРР формируется в желудочках сердца в центральных областях ишемических очагов [10]. В таком случае ПРР является негативным физиологическим феноменом, способствуя возникновению re-entry и фибрилляции за счёт снижения скорости проведения внеочередных импульсов. Точные механизмы ишемической “постреполяризационной рефрактерности” остаются невыясненными. Тем не менее возникновение ПРР в ишемизированном миокарде связывают с накоплением калия во внеклеточной среде и значительным снижением длительности ПД [10].

В нормальных физиологических условиях ПРР возникает при действии целого ряда антиаритми-

ческих фармакологических препаратов (ААП) первого и третьего классов. Более того, ПРР рассматривается как один из важных механизмов антиаритмического действия ААП. Например, ПРР вызывают такие ААП класса I, как пропafenон, прокаинамид, ранолазин; ААП класса III — амиодарон, дронедазон, вернакалант [11–13]. Антиаритмический эффект ПРР при действии указанных ААП связывают с подавлением постдеполяризаций, являющихся триггерами внеочередных импульсов, а также с увеличением длины волны возбуждения в миокарде и предотвращением re-entry.

При гипотермии у незимоспящих животных возникают так называемые “холодовые постдеполяризации”, обусловленные разной степенью холодого ингибирования деполяризующих и реполяризующих ионных токов. Следует отметить, что у незимоспящих животных нарушения ритма возникают наиболее часто именно при средней гипотермии. У гибернантов же при средней гипотермии, возникающей, например, *in vivo* в период погружения или выхода из спячки, нарушений ритма не наблюдается практически никогда. Можно предположить, что ПРР, за счёт подавления постдеполяризаций, является одним из механизмов, обуславливающих устойчивость предсердного миокарда гибернантов к аритмиям.

Предполагается, что формирование ПРР под влиянием ААП первого класса происходит за счёт действия на кинетику натриевых потенциалчувствительных ионных каналов Nav1,5, в частности за счёт увеличения времени восстановления ионных каналов от инактивации. Механизм индукции ПРР препаратами III класса также связывают с их спо-

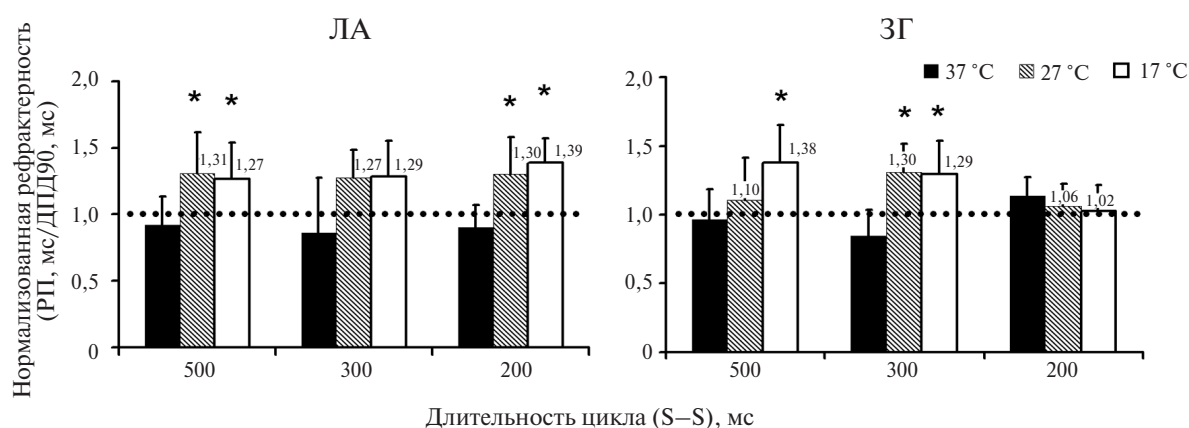


Рис. 3. Нормализованная длительность рефрактерности в предсердном миокарде гибернарующего (ЗГ) и активного (ЛА) суслика при 37 °С и гипотермии. РП — рефрактерный период. * — $p < 0,05$ (от значения при 37 °С). Значения, расположенные выше уровня, отмеченного пунктиром, указывают на наличие постреполяризационной рефрактерности.

способностью действовать, помимо калиевых, на натриевые каналы. Возможно, что сходный механизм формирования ПРР имеет место в предсердном миокарде гибернирующих животных.

Известно, что во время гибернации в сердце гибернантов происходит множество изменений: наблюдается увеличение экспрессии щелевых контактов Cx43, Cx45 [2], Na–K-АТФазы устойчивой к гипотермии [14]. Также для гибернантов характерно усиление экспрессии холодоустойчивой изоформы саркоплазматической Са-АТФазы, снижение входящего кальциевого тока $I_{Ca,L}$ [3, 15]. Можно было бы предположить, что при наступлении спячки у гибернирующих животных экспрессируются специфические формы натриевых потенциалчувствительных или иных каналов. Однако ПРР в наших экспериментах наблюдали как у гибернирующих, так и у активных сусликов в середине лета при “остром” охлаждении предсердных препаратов. То есть способность формировать ПРР, вероятно, не связана с изменением экспрессии генов ионных каналов. Возможно, что сердечные каналы $Na_v1,5$ у якутских сусликов обладают специфической чувствительностью к температуре, либо гипотермия активизирует некие внутриклеточные регуляторные механизмы, приводящие к пролонгации инактивированного состояния $Na_v1,5$.

Интересно, что некоторые ААП (ранолазин, вернакалант) способны индуцировать ПРР только в предсердном миокарде. Возможно, предсердные изоформы $Na_v1,5$ и/или дополнительные регуляторные субъединицы канала более склонны к формированию постреполяризационной рефрактерности, чем желудочковые, и эта особенность наиболее сильно проявляется у гибернантов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ряде исследований показано, что гибернанты выработали приспособления, которые помогают сохранить работу сердца при гипотермии. К таковым относятся: способность предотвращать чрезмерное увеличение ПД при гипотермии; способность предотвращать кальциевую перегрузку кардиомиоцитов и поддерживать на необходимом уровне круговорот кальция, способность проводить возбуждение и поддерживать возбудимость миокарда. В наших экспериментах показано, что ещё одной особенностью зимоспящих животных является способность поддерживать “баланс” рефрактерности, когда длительность рефрактерного состояния миокарда достаточно велика, чтобы предотвращать преждевременное возбуждение миокарда, но не настолько велика,

чтобы делать ткань сердца невозбудимой при низких температурах.

Источник финансирования. Данное исследование поддержано грантом РФФИ 17–04–01634.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузьмин В.С., Абрамов А.А., Егоров Ю.В., Розенштраух Л.В. // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2014. Т. 100. № 12. С. 1399–1408.
2. Fedorov V.V., Glukhov A.V., Sudharshan S., Egorov Y., Rosenshtraukh L.V., Efimov I.R. // Heart. Rhythm. 2008. V. 5. № 11. P. 1587–1596.
3. Yatani A, Kim S.J., Kudej R.K., Wang Q., Depre C., Irie K., Kranias E.G., Vatner S.F., Vatner D.E. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2004. V. 286. P. 2219–2228.
4. Аверин А.С., Косарский Л.С., Тарлачков С.В., Вехник В.А., Аверина И.В., Алексеев А.Е., Фесенко Е.Е., Накипова О.В. // Биофизика. 2017. Т. 62. С. 127–133.
5. Захарова Н.М., Накипова О.В., Аверин А.С., Тихонов К.Г., Соломонов Н.Г. // ДАН. 2009. Т. 424. № 5. С. 696–699.
6. Nakipova O.V., Averin A.S., Evdokimovskii E.V., Pimenov O.Y., Kosarski L., Ignat'ev D., Anufriev A., Kokoz Y.M., Reyes S., Terzic A., Alekseev A.E. // PLoS One. 2017. V. 12. № 5. P. 1–20.
7. Кузьмин В.С., Абрамочкин Д.В., Сухова Г.С., Розенштраух Л.В. // Кардиология. 2008. Т. 48. № 11. С. 53–60.
8. Marshall J.M., Willis J.S. // J. Physiol. 1962. V. 164. № 1. P. 64–76.
9. Charnock J.S., Dryden W.F., Marshall R.J. // Brit. J. Pharmacol. 1983. V. 78. № 1. P. 151–158.
10. Coronel R., Janse M.J., Opthof T., Wilde A.A., Taggart P. // Heart Rhythm. 2012. V. 9 № 6. P. 977–982.
11. Kirchhof P., Degen H., Franz M.R., Eckardt L., Fabritz L., Milberg P., L  er S., Neumann J., Breithardt G., Haverkamp W. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2003. V. 305. № 1. P. 257–263.
12. van Hunnik A., Lau D.H., Zeemering S., Kuiper M., Verheule S., Schotten U. // Heart Rhythm. 2016. V. 13. № 4. P. 964–972.
13. Frommeyer G., Rajamani S., Grundmann F., Stypmann J., Osada N., Breithardt G., Belardinelli L., Eckardt L., Milberg P. // J. Card. Fail. 2012. V. 18. № 12. P. 939–949.
14. Liu B., Arlock P., Wohlfart B., Johansson B.W. // Cryobiology. 1991. V. 28 P. 96–104.
15. Wang S.Q., Lakatta E.G., Cheng H., Zhou Z.Q. // J. Exp. Biol. 2002. V. 205. P. 2957–2962.

HYPOTHERMIA INDUCES POSTREPOLARIZATION REFRACTORINESS IN THE ATRIAL MYOCARDIUM OF THE HIBERNATING AND ACTIVE GROUND SQUIRREL *Citellus undulatus*

V. S. Kuzmin^{1,2}, A. A. Abramov³, Ju. V. Egorov³, Academician of the RAS L. V. Rosenshtraukh³

¹*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

²*The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation*

³*Institute of Experimental Cardiology, National Medical Cardiological Research Center, Moscow, Russian Federation*

Received March 18, 2019

The heart of the hibernating mammals demonstrates tolerance to the cold-induced arrhythmias and the electrophysiological mechanisms that underlie this phenomenon especially in the atrial myocardium is still not elucidated. This study is aimed to the investigation of the hypothermia-induced changes of the atrial action potentials (AP) and refractoriness of the hibernating ground squirrel *Citellus undulatus*. APs were recorded with usage of standard sharp-electrode technique in the isolated, perfused multicellular continuously paced atrial myocardium preparations obtained from hibernating (HS) and summer active (SAS) squirrels. Action potentials duration (APD) and refractoriness duration (RD) were estimated at 37–17 °C and at various pacing cycle length (200–500 ms). It has been demonstrated that hypothermia causes prolongation of both APD and RD similarly in HS and SAS animals. However, the duration of the refractoriness in the atrial myocardium significantly exceeds the duration of the APs during hypothermia (27–17 °C). Revealed phenomenon may be considered as postrepolarization refractoriness (PRR). Proposed hypothermia-induced PRR probably substantially contributes to the unsusceptibility of the hibernators to the cold induced arrhythmias by preventing the afterdepolarizations.

Keywords: hibernation, hypothermia, arrhythmia, postrepolarization refractoriness, cold induced arrhythmia, action potential.