УДК 577.3

КАРДИОТОКСИНЫ КОБРЫ *Naja oxiana* ИЗМЕНЯЮТ
СИЛУ СОКРАЩЕНИЯ И ХАРАКТЕР РИТМОИНОТРОПНЫХ
ЯВЛЕНИЙ В МИОКАРДЕ КРЫСЫА. С. Аверин^{1,*}, М. Е. Асташев¹, Т. В. Андреева²,
член-корреспондент РАН В. И. Цетлин², Ю. Н. Уткин^{2,**}

Поступило 15.05.2019 г.

Исследование влияния кардиотоксинов кобры *Naja oxiana* на сократимость папиллярной мышцы крысы и её ритмоинотропные характеристики показало, что присутствие токсинов вызывает незначительное снижение сократимости в области частот стимуляции до 0,1 Гц, а от 0,1 до 0,5 Гц обнаруживается положительный инотропный эффект, который при дальнейшем увеличении частоты до 3 Гц сменяется отрицательным инотропным эффектом. В присутствии кардиотоксинов зависимость частота—сила имеет полностью отрицательную направленность, при этом пропадает положительная зависимость в области 1–3 Гц, характерная для здорового миокарда крысы. Блокатор кальциевых каналов L-типа нифедипин не оказывает влияния на изменения, вызываемые токсинами, в то время как высокая концентрация (10 мМ) кальция предотвращает воздействие кардиотоксинов на мышцу. Полученные результаты показывают, что нарушение зависимости частота—сила происходит задолго до развития необратимых повреждений в миокарде и может служить первым признаком патологического действия кардиотоксинов.

Ключевые слова: кардиотоксин, яд кобры, миокард, ионный канал, сократимость, ритмоинотропия.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524875578-583>

Кардиотоксины (КТ) ядов кобр представляют собой β -структурированные белки, состоящие из 59–61 аминокислотного остатка с четырьмя дисульфидными связями. При попадании в организм КТ в первую очередь оказывают поражающее влияние на сердечно-сосудистую систему, вызывая систолическую остановку сердца. На препаратах сердечной мышцы было установлено, что КТ вызывали снижение сократимости, деполяризацию и контрактуру [1, 2]. Большинство КТ действует напрямую на сердечную ткань как в желудочках, так и в предсердиях. Вместе с тем имеются тканеспецифические особенности развития эффектов, и большинство исследователей сообщают о сильно выраженном воздействии на вентрикулярную ткань [1]. Влияние КТ на изолированную папиллярную мышцу морской свинки характеризовалось преходящим положительным инотропным действием, сопровождаю-

щимся постепенным развитием тонического сокращения [3].

Одним из важнейших внутренних регуляторных механизмов сердечной сократимости является зависимость частота—сила (ЗЧС) [4]. ЗЧС в желудочках миокарда большинства млекопитающих является положительной, т.е. увеличение частоты стимуляции вызывает увеличение силы сокращений, ассоциированное с возрастанием амплитуды выброса Ca^{2+} (Ca^{2+} transients), и это отображает сократительный резерв сердца. Интегрированный динамический баланс внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} является основным клеточным механизмом, ответственным за ЗЧС. Наклон и форма ЗЧС являются ключевыми факторами, определяющими клинический результат при заболеваниях сердца. На зависимость влияют диапазон частоты и вид животного. У крыс в низкочастотном диапазоне до ~1 Гц ЗЧС имеет отрицательный характер, но в диапазоне частот, близком к физиологической частоте сердечных сокращений, является положительной. В литературе имеются данные о влиянии КТ на концентрацию ионов кальция в кардиомицитах [5, 6], однако влияние токсинов на ЗЧС не исследовалось. В представленной работе проведено изучение влияния КТ на ЗЧС. Исследование данной характеристики позволит установить, какие именно компоненты электромеханического сопряжения в сер-

¹ Институт биофизики клетки Российской Академии наук
Федерального исследовательского центра
“Пушкинский научный центр биологических исследований
Российской Академии наук”, Пушкино Московской обл.

² Институт биоорганической химии
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской Академии наук, Москва

*E-mail: averin.icb@gmail.ru

**E-mail: yutkin@yandex.ru; yutkin@ibch.ru

дечной мышце нарушаются в первую очередь. Кроме того, изменения ЗЧС могут служить хорошими показателями для оценки степени выраженности сократительной дисфункции сердца, сердечного резерва и эффективности терапевтических средств при хронической сердечной недостаточности.

Проведённые ранее исследования механизма действия КТ показали, что в кардиомиоцитах токсины вызывают увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция, изменение формы, гиперконтрактуру и гибель клеток [5]. КТ могут убивать различные типы клеток, разрушая их плазматические мембраны. Механизм взаимодействия КТ с липидными мембранами зависит от типа токсина Р или S [7]. Р-тип включает КТ с остатком пролина в положении 30 аминокислотной последовательности, а S-тип — токсины с остатком серина в положении 28. Имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что токсины обоих типов дестабилизируют липидный бислой анионных фосфолипидсодержащих мембран, но с разной эффективностью. Вместе с тем нам не удалось найти данных о действии разных типов токсинов на сердечную мышцу. Следует отметить, что не во всех случаях исследователи приводили точные данные об аминокислотной последовательности используемых КТ. Однако в тех исследованиях, в которых давались точные указания на структуру КТ, это был в основном КТ из яда кобры *Naja atra* (СТХ А3), относящийся к токсинам Р-типа.

Таким образом, сравнительное исследование активности КТ и механизмов развития их эффектов во времени остаётся нерешённой задачей. С этой целью нами исследовано влияние цитотоксинов I и II (СТХ-1 и СТХ-2) из яда среднеазиатской кобры *Naja oxiana* [8], относящихся к S- и Р-типу соответственно, на силу сокращения и характер ритмоинотропных явлений в миокарде крысы. Ранее было показано, что СТХ-2 в концентрации 10 мкг/мл на изолированном сердце лягушки вызывал уменьшение амплитуды сердечных сокращений, урежение ритма и остановку в систоле, а СТХ-1 вызывал аритмию и при существенно более высоких концентрациях также остановку сердца [8]. Конкретный механизм таких различий не был выявлен.

В данной работе исследования проводили (в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных, 1986, 86/609/ЕЕС) на папиллярных мышцах правого желудочка сердца крысы линии Vistar массой 200–220 г. Выделение папиллярных мышц (ПМ), их стимуляцию и измерение амплитуды сокращения в изометрическом режиме

выполняли по ранее описанной методике [9] при температуре $30 \pm 0,1$ °С в растворе Тироде следующего состава (мМ): 150 Na^+ ; $4,0 \text{ K}^+$; $1,8 \text{ Ca}^{2+}$; $1,0 \text{ Mg}^{2+}$; $12,0 \text{ HCO}_3^-$; $1,8 \text{ HPO}_4^-$; $148,4 \text{ Cl}^-$ и $11,0$ глюкозы ($\text{pH} = 7,4$). Раствор аэрировали газовой смесью $\text{O}_2(96\%) + \text{CO}_2(4\%)$. Стационарную зависимость частота—сила определяли в интервале частот от 0,003 до 3,0 Гц. Значение амплитуды сокращения ПМ на частоте стимуляции 0,1 Гц принимали за 100%.

При исследовании влияния токсинов на сократимость мышцы было обнаружено, что в концентрации 1 мкг/мл оба токсина достоверно не отличаются по своему эффекту и при увеличении концентрации вдвое СТХ-2 практически полностью подавляет сократимость, в то время как в присутствии СТХ-1 сила сокращений составляет около 50% от контроля (рис. 1). Напряжение покоя ведёт себя сходным образом, при 1 мкг/мл воздействие минимально и одинаково для обоих токсинов, при повышении концентрации СТХ-2 вызывает значительно более сильную контрактуру, достоверно превышающую таковую, вызванную СТХ-1. Таким образом, СТХ-1, относящийся к S-типу, обладает меньшей активностью, чем СТХ-2, относящийся к Р-типу.

Учитывая тот факт, что развитие во времени эффекта значительной части КТ зависит от концентрации и не имеет тенденции к стабилизации до полного развития контрактуры, интерес представляет подбор концентраций, при которых уже проявляется физиологический эффект и вместе с тем сократимость сохраняется в течение нескольких часов. При исследовании концентрационной зависимости нами было выявлено, что для СТХ-1 минимальная концентрация, способная вызвать контрактуру в течение 30–60 мин, составляет 2 мкг/мл. В представленных далее исследованиях использовалась в два раза меньшая концентрация (1 мкг/мл), для СТХ-2 эти значения составили 1 и 0,5 мкг/мл соответственно.

Следует отметить, что в большинстве экспериментов с обоими токсинами отрицательной фазе инотропного эффекта предшествовал кратковременный рост сократимости. Сообщения о положительном инотропном эффекте при действии КТ встречаются редко, что не удивительно, так как эффект регистрируется в достаточно узком диапазоне концентраций и при дальнейшем повышении развивается контрактура с подавлением сократительной активности [10]. Тем не менее описаны КТ, дающие положительный инотропный ответ и в дозе до 100 мкг/мл не вызывающие контрактуры [2], хотя для большинства КТ концентрация, вызывающая

Рис. 1. Влияние СТХ-1 и СТХ-2 на силу изометрического сокращения и напряжение покоя. а — статистические данные по воздействию на силу изометрического сокращения при частоте стимуляции 0,3 Гц ($n = 5$), б — статистические данные по воздействию на напряжение покоя ($n = 5$). Светлые столбцы — СТХ-1, тёмные — СТХ-2. По оси ординат — сила сокращения, нормированная к полученной на 0,3 Гц в контроле; по оси абсцисс — концентрация токсина. Данные представлены как средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего (* $p < 0,05$).

контрактуру, находится в пределах от 1 до 10 мкг/мл [2].

При исследовании концентраций, не вызывающих контрактуру, характер действия КТ был схожим. В области низких частот наблюдалось небольшое снижение сократимости до $15 \pm 4\%$ на частоте 0,003 Гц в экспериментах с СТХ-1 (рис. 2а). В опытах с СТХ-2 этот эффект был несколько менее выражен. Далее в области средних частот от 0,1 и до 0,5 Гц наблюдался положительный инотропный эффект. Хотя на усреднённых кривых, полученных при суммировании результатов на нескольких препаратах, данный эффект недостоверен, в отдельных экспериментах прирост сократимости составлял более 40% (рис. 2б). По-видимому, у индивидуальных животных имеются довольно сильные различия в ЗЧС. С увеличением частоты стимуляции рост сократимости сменялся её угнетением, так, при частоте стимуляции 3 Гц падение сократимости составляло $30 \pm 4\%$ под воздействием СТХ-1 (рис. 2) и $38 \pm 23\%$ под воздействием СТХ-2. Далее с течением времени характер ЗЧС уже не менялся и происходило постепенное снижение сократимости, как правило, через 3–4 часа сокращения сохранялись только на самых низких частотах стимуляции 0,003–0,1 Гц и составляли не более 10–20% от исходного уровня.

Следует отметить, что небольшое снижение сократимости в области низких частот может быть обусловлено снижением содержания кальция в саркоплазматическом ретикулуме (СР), так как сократимость на низких частотах стимуляции обеспечи-

вается преимущественно выбросом из СР [11]. При этом рост сократимости в области частот 0,1–0,5 Гц, где для ЗЧС крысы характерна отрицательная направленность, вызываемая снижением содержания кальция в СР, может объясняться тем, что при воздействии КТ и повышении частоты стимуляции в цитозоле повышается содержание ионов натрия, тем самым давая возможность увеличить закачку кальция во внутриклеточные депо посредством Са-АТФазы СР [12]. Также дополнительным фактором, способствующим увеличению внутриклеточной концентрации ионов натрия, может служить ингибирование Na^+/K^+ -АТФазы, которое может происходить под воздействием КТ [13]. Для миокарда крысы характерна положительная ЗЧС в области физиологических частот (1–3 Гц), в формировании которой ведущую роль играет частотно-зависимая активация кальциевого тока L-типа [11]. Под воздействием обоих КТ полностью исчезает положительная направленность ЗЧС в области частот 1–3 Гц. Кроме того, с течением времени происходит снижение силы сокращения при всех частотах стимуляции (рис. 2б). Эти факты свидетельствуют о том, что данный механизм регуляции сократимости миокарда является наиболее чувствительным к нарушению кальциевого гомеостаза.

Одним из ключевых факторов в патологическом действии КТ является перегрузка клеток кальцием [6]. Однако существуют разночтения относительно источника повышенного содержания внутриклеточного кальция. В части работ было показано,

Рис. 2. Влияние СТХ-1 (1 мкг/мл) на ритмоинотропные характеристики папиллярных мышц крысы. а — усреднённые кривые зависимости частота—сила ($n = 4$), полученные в результате четырёх экспериментов, б — типичный пример развития эффекта во времени. Чёрные треугольники соответствуют величинам, зарегистрированным через 1 ч действия СТХ-1, чёрные квадраты — 2 ч, чёрные ромбы — 3 ч. По оси ординат отложена сила сокращения в относительных величинах, за единицу принята сила сокращения при частоте стимуляции 0,1 Гц; по оси абсцисс — частота стимуляции. Данные представлены как средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего (* $p < 0,05$).

что использование блокаторов кальциевых каналов L-типа позволяет предотвратить развитие контрактуры на таких объектах, как неонатальные кардиомиоциты крысы и кольца аорты взрослой крысы [14]. Эти данные могут свидетельствовать о том, что действие КТ яда кобры *Naja atra* на клетки связано с активацией кальциевых каналов L-типа. В то же время встречаются сообщения о сохранении контрактуры на предсердиях морской свинки в условиях предварительной обработки блокаторами кальциевых каналов [2]. В наших экспериментах оба КТ сохраняли способность к инициации контрактуры в условиях предварительной обработки 2 мкМ нифедипина — блокатора кальциевых каналов L-типа. Эти данные согласуются с гипотезой о том, что КТ не влияют на кальциевые каналы L-типа, а формируют неселективный ионный канал [15], через который в клетку поступают ионы натрия и кальция, и уже их совместное действие приводит к контрактуры. В пользу этой теории свидетельствуют данные о том, что контрактуру может предотвратить использование раствора, не содержащего ионов натрия, но при этом блокаторы натриевого канала не могут предотвратить её развитие [2].

В наших экспериментах, подобно литературным данным [2], высокая концентрация кальция (10 мМ) предотвращала развитие контрактуры, однако инвертировать уже развившуюся контрактуру повышением концентрации кальция либо отмыжкой КТ было невозможно. Эти результаты свидетельствуют

о том, что кальциевая перегрузка клеток миокарда, развившаяся вследствие выброса кальция из СР, ведёт к необратимым повреждениям клеток.

Таким образом, сравнение активности КТ двух типов показало, что более высокой активностью обладает токсин Р-типа (СТХ-2). Оба токсина показали сходный профиль действия как относительно частотно-зависимых особенностей миокарда, так и относительно развития эффектов в условиях блокирования кальциевого тока или повышения концентрации внеклеточного кальция. Самой чувствительной к токсинам компонентой регуляции кальциевого гомеостаза миокарда крысы оказалась положительная ветвь ЗЧС в области физиологических частот стимуляции.

Как отмечалось выше, у большинства видов млекопитающих, включая человека, в норме ЗЧС в области физиологических частот стимуляции имеет положительную направленность, т.е. сила сокращений увеличивается с повышением частоты стимуляции. Однако на начальных стадиях патологических процессов в сердце ЗЧС приобретает полифазную форму (положительно-отрицательную), а с развитием патологии становится полностью отрицательной. Под действием КТ ЗЧС приобретает полностью отрицательную направленность. Следовательно, КТ могут быть использованы для моделирования патологических процессов в сердечной мышце.

Изложенные выше данные позволяют сделать вывод о том, что нарушение зависимости частота—

сила, представляющей собой важнейший внутрений регуляторный механизм сердечной сократимости, происходит задолго до развития необратимых повреждений в миокарде и может служить первым признаком патологического действия кардиотоксинов.

Источник финансирования. Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18–54–54006.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sun J.J., Walker M.J. Actions of Cardiotoxins from the Southern Chinese Cobra (*Naja naja atra*) on Rat Cardiac Tissue // *Toxicon*. 1986. V. 24. № 3. P. 233–245.
2. Harvey A.L., Marshall R.J., Karlsson E. Effects of Purified Cardiotoxins from the Thailand Cobra (*Naja naja siamensis*) on Isolated Skeletal and Cardiac Muscle Preparations // *Toxicon*. 1982. V. 20. № 2. P. 379–396.
3. Huang S.J., Kwan C.Y. Inhibition by Multivalent Cations of Contraction Induced by Chinese Cobra Venom Cardiotoxin in Guinea Pig Papillary Muscle // *Life Sci*. 1996. V. 59. № 4. P. PL55–60. DOI: 10.1016/0024-3205(96)00305-0.
4. Gattoni S., Roe A.T., Frisk M., Louch W.E., Niederer S.A., Smith N.P. The Calcium-Frequency Response in the Rat Ventricular Myocyte: an Experimental and Modelling Study // *J. Physiol*. 2016. V. 594. № 15. P. 4193–4224. DOI: 10.1113/JP272011.
5. Wang H.X., Lau S.Y., Huang S.J., Kwan C.Y., Wong T.M. Cobra Venom Cardiotoxin Induces Perturbations of Cytosolic Calcium Homeostasis and Hypercontracture in Adult Rat Ventricular Myocytes // *J. Mol. Cell. Cardiol*. 1997. V. 29. № 10. P. 2759–2770. DOI: 10.1006/jmcc.1997.0511.
6. Wang C.H., Monette R., Lee S.C., Morley P., Wu W.G. Cobra Cardiotoxin-Induced Cell Death in Fetal Rat Cardiomyocytes and Cortical Neurons: Different Pathway but Similar Cell Surface Target // *Toxicon*. 2005. V. 46. № 4. P. 430–440. DOI: 10.1016/j.toxic.2005.06.012.
7. Dubovskii P.V., Lesovoy D.M., Dubinnyi M.A., Konshina A.G., Utkin Y.N., Efremov R.G., Arseniev A.S. Interaction of Three-Finger Toxins with Phospholipid Membranes: Comparison of S- and P-Type Cytotoxins // *Biochem. J*. 2005. V. 387. P. 807–815. DOI: 10.1042/BJ20041814.
8. Гришин Е.В., Сухих А.П., Адамович Т.Б., Овчинников Ю.А. Выделение, свойства и аминокислотная последовательность двух цитотоксинов из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* // *Биоорганическая химия*. 1976. Т. 2. № 8. С. 1018–1034.
9. 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. Store-Operated Ca^{2+} Entry Supports Contractile Function in Hearts of Hibernators // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 5. P. e0177469. DOI: 10.1371/journal.pone.0177469.
10. Huang S.J., Wu C.K., Sun J.J. Positive Inotropic and Toxic Action of Direct Lytic Factor on Isolated Working Guinea Pig Hearts // *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1991. V. 12. № 2. P. 125–131.
11. Stuyvers B.D., McCulloch A.D., Guo J., Duff H.J., ter Keurs H.E. Effect of Stimulation Rate, Sarcomere Length and Ca^{2+} On Force Generation by Mouse Cardiac Muscle // *J. Physiol*. 2002. V. 544. № 3. P. 817–830. DOI: 10.1113/jphysiol.2002.024430
12. Li S., Huang H., Zhang M., Wang W., Xue S., Gao Y., Xie M., Chen K., Liu F., Chen L. Liguzinediol Enhances the Inotropic Effect of Rat Hearts via Inhibition of Protein Phosphatase (PP1 and PP2A) Activities // *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 2017. V. 69. № 4. P. 236–244. DOI: 10.1097/FJC.0000000000000467.
13. Bougis P.E., Khelif A., Rochat H. On the Inhibition of $[\text{Na}^+, \text{K}^+]$ -ATPases by the Components of *Naja mossambica mossambica* Venom: Evidence for Two Distinct Rat Brain $[\text{Na}^+, \text{K}^+]$ -ATPase Activities // *Biochemistry*. 1989. V. 28. № 7. P. 3037–3043.
14. Kwan C.Y., Kwan T.K., Huang S.J. Effect of Calcium on the Vascular Contraction Induced by Cobra Venom Cardiotoxin // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 2002. V. 29. № 9. P. 823–828. DOI: 10.1046/j.1440-1681.2002.03723.x.
15. Wu P.L., Chiu C.R., Huang W.N., Wu W.G. The Role of Sulfatide Lipid Domains in the Membrane Pore-Forming Activity of Cobra Cardiotoxin // *Biochim. Biophys. Acta*. 2012. V. 1818. № 5. P. 1378–1385. DOI: 10.1016/j.bbame.2012.02.018.

CARDIOTOXINS FROM COBRA *Naja oxiana* CHANGE THE FORCE OF CONTRACTION AND THE CHARACTER OF RHYTHMOINOTROPIC PHENOMENA IN THE RAT MYOCARDIUM

A. S. Averin¹, M. E. Astashev¹, T. V. Andreeva²,
Corresponding Member of the RAS V. I. Tsetlin², Yu. N. Utkin²

¹*Institute of Cell Biophysics, Federal Research Center "Pushchino Scientific Center of Biological Research", Pushchino Branch, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation*

²*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

Received May 15, 2019

The study of the influence of cobra *Naja oxiana* cardiotoxins on the contractility of the rat papillary muscles and its rhythm-inotropic characteristics has that the presence of toxins induces a slight contractility decrease in the stimulation frequency range up to 0,1 Hz. In the stimulation frequency range from 0,1 to 0,5 Hz a positive inotropic effect is found. However, the positive inotropic effect is replaced by a negative one with further increase in the frequency up to 3 Hz. In the presence of cardiotoxins, the positive force-frequency relationship in the region of 1–3 Hz, characteristic of healthy rat myocardium, disappears and relationship becomes completely negative. L-type calcium channel blocker nifedipine does not affect the changes induced by toxins, while a high concentration (10 mM) of calcium prevents the effects of cardiotoxins on the muscle. The results obtained show that the impairment of the force-frequency relationship occurs long before the development of irreversible damage in the myocardium and may be the first sign of the pathological action of cardiotoxins.

Keywords: cardiotoxins, papillary muscle, rhythmoinotropic characteristic, inotropic effect, contracture, force-frequency relationship.