DOI: 10.18087/cardio.2019.3.10240

Кузьмин В. С.[1], Егоров Ю. В.[2], Розенштраух Л. В.[2]

[1] ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», Москва, Россия

[2] «Институт экспериментальной кардиологии» ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия

Электрофизиологические эффекты спермина и его действие при моделировании ишемии в сердце

Ключевые слова: полиамины, спермин, желудочковый миокард, потенциалы действия, рефрактерность, ишемия, аритмии.

Ссылка для цитирования: Кузьмин В. С., Егоров Ю. В., Розенштраух Л. В. Электрофизиологические эффекты спермина и его действие при моделировании ишемии в сердце. Кардиология. 2019;59(3):43–51.

Резюме

Полиамины присутствуют в цитоплазме практически всех клеток организма и участвуют в регуляции множества внутриклеточных функций, в том числе проводимости ионных каналов, но их роль в регуляции активности сердца изучена мало. *Цель исследования.* Изучение электрофизиологических эффектов в желудочковом миокарде одного из эндогенных полиаминов – спермина. *Материалы и методы.* Исследование проводили с использованием многоклеточных препаратов желудочкового миокарда, а также препаратов перфузируемого по Лангендорфу сердца кролика и крысы. С помощью микроэлектродной техники, оптического картирования определяли влияние спермина на потенциалы действия (ПД) и проведение возбуждения в миокарде. Влияние полиамина на функциональный рефрактерный период (ФРП) оценивали с помощью программной электрической стимуляции желудочкового миокарда. *Результаты.* Внеклеточный спермин вызывал снижение длительности ПД в стенке желудочка сердца крысы в концентрациях 0,1–5 мМ. Однако в желудочковом миокарде кролика спермин только в концентрации 5 мМ вызывал незначительное укорочение ПД (на 4,7%). В перфузируемом сердце кролика спермин в концентрациях 0,1–1 мМ не влиял на желудочковый ФРП. Кроме того, в желудочковом миокарде перфузируемого сердца кролика и крысы спермин (0,1–1 мМ) не оказывал воздействия на скорость проведения и характер распространения возбуждения при нормоксической перфузии. В условиях моделирования ишемии внеклеточный спермин предотвращал снижение скорости проведения в левом желудочке изолированного сердца крысы. *Выводы.* Выявленные эффекты спермина в сердце могут быть связаны с подавлением поступления кальция в цитоплазму, особенно при ишемии. Однако антиишемическое действие спермина может быть видоспецифическим и наблюдаться только у грызунов.

Kuzmin V. S.[1], Egorov Yu. V.[2], Rozenshtraukh L. V.[2]

[1] Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

[2] Institute of Experimental Cardiology of National Medical Research Center for Cardiology, Moscow, Russia

Electrhopysiological Effect of the Polyamine Spermine in Normoxic and Ischemic Ventricular Myocardium

Keywords: polyamines; spermine; ventricular myocardium; action potentials; refractoriness; ischemia; arrhythmia.

For citation: Kuzmin V. S., Egorov Yu. V., Rozenshtraukh L. V. Electrhopysiological Effect of the Polyamine Spermine in Normoxic and Ischemic Ventricular Myocardium. Kardiologiia. 2019;59(3):43–51.

Summary

Cytoplasmic polyamines (PA) are involved in control of many cellular functions and are well known as regulators of so called inward-rectifier potassium ion channels. Nevertheless, functional significance of extracellular PA in the heart is poorly elucidated. Aim of this study was to study effects of endogenous PA spermine in the ventricular myocardium. Effects of the extracellular spermine were investigated in isolated multicellular preparations of rabbit and rat ventricular myocardium. Langendorff-perfused isolated rat and rabbit hearts were also used. Action potential (APs) duration and pattern of excitation in ventricular myocardium were estimated using standard microelectrode technique and optical mapping. Functional refractory periods were assessed in Langendorff perfused hearts with the help of programmed electrical stimulation of the ventricle. In this study extracellular PA spermine (0.1–5 mM) induced shortening of the APs in multicellular preparations of rat ventricular myocardium registered using sharp microelectrode technique. However, spermine caused only weak effect in preparations of ventricular myocardium from rabbit heart: highest tested concentration of spermine (5 mM) induced 4.7% APs shortening. Similarly, 0.1–1 mM of spermine was unable to alter substantially ventricular effective refractory periods in isolated perfused rabbit hearts. In two animal species tested (rat and rabbit) 0.1–1 mM of spermine failed to affect conduction velocity and activation pattern in ventricles of isolated Langendorff-perfused hearts under normoxia. However, in the rat no-flow model of ischemia-reperfusion extracellular spermine improved conduction of excitation in ventricles. Our results allow suggesting that extracellular spermine can prevent ischemia-induced proarrhythmic changes in ventricular myocardium probably due to reduction of calcium accumulation, but this effect is significant only when PA is applied in millimolar concentrations. Also, potential anti-ischemic effect of the PA may be species specific.

Полиамины – соединения, относящиеся к классу алифатических аминов. С тех пор как полиамины, имеющие биологическое происхождение, были кристаллизованы А. Левенгуком в 1678 г. [1], исследованию их свойств посвящено огромное количество работ. Полиамины присутствуют в норме в миллимолярных концентрациях в цитоплазме практически всех эукариотических клеток [2] и, скорее всего, имеют множество мишеней, вовлечены в целый спектр клеточных функций [3]. Эндогенные полиамины необходимы для синтеза и стабилизации нуклеиновых кислот, роста, пролиферация и дифференциации клеток [4, 5]. Начиная с середины XX века предпринимаются попытки воздействовать на метаболизмом полиаминов в аспекте антираковой терапии [6]. Полиаминам посвящено множество работ в таких популярных областях науки, как исследование способов продления жизни и предотвращение старения. Предполагается, что повышенное потребление полиаминов способствует увеличению продолжительности жизни у экспериментальных животных и человека, в том числе за счет снижения тяжести сердечно-сосудистых заболеваний [7, 8].

В 90-х годах прошлого века в ряде работ А. Лопатиным и К. Николсом был раскрыт механизм так называемого аномального выпрямления – свойства калиевых ионных каналов семейства KirX.X проводить в определенных условиях трансмембранный ионный ток однонаправленно [9–12]. Было установлено, что указанное свойство реализуется за счет цитоплазматических полиаминов, в основном спермина, которые, благодаря тому, что при физиологических значениях pH имеют положительный заряд, потенциал-зависимо блокируют пору ионных каналов KirX.X. Выяснение роли полиаминов в механизме аномального выпрямления стало крупным достижением в фундаментальной электрофизиологии. Калиевые токи, обладающие «аномальным выпрямлением», – IK1, $I_{Ach/ado}$, крайне важны для нормального функционирования кардиомиоцитов, так как играют основную роль в поддержании потенциала покоя, регуляции длительности потенциалов действия (ПД); опосредуют действие ацетилхолина, высвобождаемого из нервных окончаний при стимуляции парасимпатических нервов; ограничивают аритмогенные изменения электрической активности миокарда [13, 14]. Соответственно нормальная работа сердца невозможна без внутриклеточных полиаминов.

Помимо внутриклеточных функций, полиамины выполняют роль важных внеклеточных регуляторных соединений. Внеклеточные полиамины выступают в роли нейромодуляторов в мозге, накапливаются и высвобождаются глиальными клетками, поэтому их называют «глиотрансмиттеры» [15–17]. Внеклеточные полиамины могут регулировать проводимость потенциалзависимых ионных кальциевых и натриевых каналов, являются агонистами кальцийчувствительных рецепторов в нейронах и гладкой мускулатуре [18–20].

В настоящее время множество работ направлено на исследование потенциальных антиаритмических свойств соединений, влияющих на ионные реполяризующие токи IK1 (каналы семейства Kir) и IK. Антиаритмическое действие таких соединений обусловлено увеличением длительности ПД и рефрактерности. Хлорохин – соединение, сходное с хинидином (антиаритмическим препаратом IA класса), но являющееся блокатором IK1, т. е. обладающее свойствами полиаминов, проявляет антифибрилляторное действие в желудочках [21]. Антиаритмические эффекты отечественных антиаритмических средств нибентана и рефралона связаны с блокированием ионных токов IK [22]. Тем не менее роль именно внеклеточных полиаминов в регуляции биоэлектрической активности миокарда изучена крайне слабо, хотя в ряде стран полиамины применяются как биологически активные добавки к пище; на их основе разработано несколько фармакологических средств [23].

Цель настоящей работы заключалась в изучении электрофизиологических эффектов и потенциального антиаритмического или антиишемического действия одного из полиаминов – спермина – в желудочковом миокарде.

Материалы и методы

Исследование действия спермина проводили с использованием препаратов стенки правого желудочка (ПЖ) крысы, папиллярной мышцы кролика; на препаратах изолированного сердца кролика и крысы, перфузируемых по Лангендорфу, в норме и при ишемии/реоксигенации. В ходе экспериментов были соблюдены все требования этических норм работы с лабораторными животными. Источником экспериментальных животных служили сертифицированные питомники. Для экспериментов использовали половозрелых самцов кроликов породы шиншилла (2,5 кг) и крыс линии Wistar (200–250 г). Животных содержали в виварии в стандартных условиях, при световом режиме 12:12 с доступом к воде и пище *ad libitum*.

Регистрация ПД в стенке правого желудочка сердца крысы

Всего использовано 20 препаратов от 20 животных, которых наркотизировали уретаном (4 г/кг), забивали, вскрывали грудную клетку и извлекали сердце. Участок стенки ПЖ сердца изолировали, а затем помещали в перфузионную камеру. Нормоксическую перфузию многоклеточного препарата осуществляли раствором Кребса–Хензеляйта следующего состава: NaCl – 118,0 мМ, KCl – 4,7 мМ, $NaHCO_3$ – 25,0 мМ, $MgSO_4$ – 1,2 мМ, $CaCl_2$ – 2,5 мМ, KH_2PO_4 – 1,2 мМ, глюкоза – 5,5 мМ,

ISSN 0022-9040. Кардиология. 2019;59(3).

при pH 7,3–7,4, температуре 37°C и постоянной оксигенации карбогеном (95% O_2 + 5% CO_2). Многоклеточные препараты стимулировали прямоугольными импульсами тока с амплитудой 2–3 В и частотой 6 Гц.

Электрически вызванные ПД отводили от эндокардиальной поверхности препаратов желудочков с помощью стандартных стеклянных микроэлектродов, заполненных 3 М KCl (сопротивление кончика 10–30 MΩ), подключенных к усилителю KS-700. Усиленный сигнал поступал на аналого-цифровой преобразователь (E-154, L-card, Россия) и затем обрабатывался на компьютере с помощью программы Power Graph 3.3. Во всех экспериментах с помощью программы MiniAnalysis 6.0.7 оценивали длительность ПД на уровне 50 и 90% реполяризации (ДПД50%, ДПД90%). ПД вызывали нанесением электрических стимулов при помощи серебряных электродов, соединенных со стимулятором ЭЛС-2 (частота стимуляции 6 Гц, длительность прямоугольных импульсов 2 мс, амплитуда импульсов 3–10 В). В контрольных условиях ДПД90% составила 56±7 мс; ДПД50% – 18±2 мс.

После часового периода адаптации в экспериментальную камеру подавали раствор, содержащий спермин («Sigma-Aldrish», США) в концентрациях 10 мкМ – 5 мМ, в течение 5 мин. Отмывка препарата между периодами действия спермина составляла 20 мин.

Регистрация ПД в папиллярной мышце кролика

Всего использовано 6 препаратов от 6 животных. Кроликов наркотизировали кетамин/ксилазиновой смесью (25/4 мг/кг), которую вводили в краевую вену уха. После установления наркоза грудную клетку вскрывали и извлекали сердце. Эффекты спермина исследовали в изолированных препаратах папиллярной мышцы ПЖ. Препараты папиллярной мышцы перфузировали при температуре 37°C раствором Тироде следующего состава (ммоль/л): NaCl – 130,0; KCl – 4,7; $NaHCO_3$ – 18,0; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ – 1,05; $CaCl_2$ – 1,8; NaH_2PO_4 – 1,2; глюкоза – 11. Раствор оксигенировали карбогеном (95% O_2, 5% CO_2), pH 7,4±0,1.

Электрически вызванные ПД регистрировали с помощью стандартной микроэлектродной техники по методике, описанной выше; оценивали ДПД50% и ДПД90% в контроле и при действии 10 мкМ – 5 мМ спермина (5 мин). Частота стимуляции папиллярных мышц кролика составляла 4 Гц. В контрольных условиях ДПД90% составила – 145±15 мс; ДПД50% – 115±10 мс.

Оценка параметров проведения возбуждения в желудочковом миокарде

Влияние спермина на скорость распространения возбуждения, анизотропию проведения возбуждения и дисперсию реполяризации в изолированном сердце исследовали с помощью метода оптического картирования. Использовали препараты сердца кролика (всего 6). Ретроградную перфузию сердца осуществляли по стандартной методике Лангендорфа при температуре 37°C раствором Тироде указанного выше состава и постоянном перфузионном давлении 80 мм рт. ст.

После подключения изолированного сердца к установке и периода адаптации (10 мин) в течение 30 мин проводили насыщение тканей сердца потенциалчувствительным флюоресцентным красителем di-4-ANEPPS (5 мг/мл в 0,1% DMSO). Одновременно изолированное сердце перфузировали раствором Тироде, содержащим разобщитель электромеханического сопряжения BDM (1 г/л, 30 мин). После окончания окрашивания осуществляли перфузию изолированного сердца раствором Тироде, содержащим BDM или BDM и спермин в концентрациях 0,1; 0,3 и 1 мМ. Оценку электрофизиологических параметров проводили при действии спермина и ритме работы препаратов изолированного сердца в диапазоне частот 2,5–5 Гц. Эксперименты проводили при постоянном ритме работы препаратов изолированного сердца. Биполярные серебряные стимулирующие электроды располагали на эпикардиальной поверхности желудочков для формирования фронта волны возбуждения непосредственно в рабочем миокарде.

Регистрацию оптических сигналов, программный контроль оборудования, ввода и анализа данных осуществляли с помощью модифицированной системы визуализации флуоресцентных изображений, разработанной в лаб. проф. И. Р. Ефимова (Сент-Луис, США) на основе системы LabVIEW (National Instruments). Оптические сигналы регистрировали с пространственным разрешением 16×16 пикселей и временны́м разрешением от 460 до 500 кадров/с. Площадь картируемой области поверхности желудочкового миокарда составляла 16×16 мм. На основе оптических сигналов реконструировали изохронные карты активации желудочкового миокарда, определяли направление, характеризующееся максимальным проведением. Рассчитывали скорость проведения возбуждения в данном направлении (θmax), а также скорость в направлении, перпендикулярном данному направлению (θmin). Коэффициент анизотропии проведения рассчитывали как отношение θmax/θmin. Максимальную дисперсию реполяризации рассчитывали как описано ранее [24].

Оценка длительности желудочкового функционального рефрактерного периода желудочков

Желудочковый функциональный рефрактерный период (ЖФРП) оценивали в сердце кролика, перфузируемом по Лангендорфу. Эксперименты выполнены на 6 кроликах. После периода адаптации (10 мин) изолированное серд-

це перфузировали раствором Тироде, содержащим 0,1; 0,3 и 1 мМ спермина (30 мин). ЖФРП оценивали, используя «экстрасистолический» (S1S2) протокол. Для этого с помощью поверхностных электродов регистрировали электрограммы правого предсердия и желудочка, а ритм навязывали стимуляцией центра эпикардиальной поверхности левого желудочка с помощью серебряных электродов (длительность прямоугольных стимулов составляла 2–3 мс, амплитуда равнялась двум порогам).

Согласно протоколу давали 20 «прекондиционирующих» стимулов (S1) в базовом ритме, после чего наносили экстрастимул (S2), который следовал за последним прекондиционирующим стимулом с уменьшающимся интервалом. Длительность ЖФРП определяли как минимальный интервал между последним прекондиционирующим стимулом и экстрастимулом (S1S2), при котором S2-стимул приводил к возбуждению желудочка. Базовый ритм (S1S1) варьировали в диапазоне 2,5–5 Гц. На основе полученных данных строили кривые зависимости ЖФРП от базового ритма в контрольных условиях и при действии спермина.

Оценка параметров проведения возбуждения в желудочках при ишемии/реперфузии

Влияние спермина на скорость проведения возбуждения при ишемии/реоксигенации исследовали с помощью метода оптического картирования на препаратах изолированного по Лангендорфу сердца крысы (всего 13 препаратов). Перфузию осуществляли раствором Тироде по стандартной методике при температуре 37°C и постоянном перфузионном давлении 80 мм рт. ст. Эксперименты проводили при постоянном ритме работы препаратов изолированного сердца, который составлял 6 Гц. Биполярные серебряные стимулирующие электроды располагали на эпикардиальной поверхности левого желудочка.

Животных наркотизировали уретаном (4 г/кг), забивали, вскрывали грудную клетку и извлекали сердце. Подготовку (адаптацию, окрашивание) препаратов изолированного сердца крысы, регистрацию и анализ оптических сигналов осуществляли, используя di-4-ANEPPS и BDM.

После подготовки осуществляли перфузию раствором Тироде, содержащим только BDM (в контрольной группе) или BDM и 1 мМ спермина (10 мин, в экспериментальной группе). По окончании периода действия спермина для моделирования ишемических воздействий полностью прекращали проток перфузионного раствора через систему и, соответственно, коронарное русло изолированного сердца на 20 мин, но поддерживали температуру препаратов на уровне 37°C. Период, равный 20 мин, был выбран как интервал, заведомо не приводящий к блокам проведения и потере возбудимости. После окончания 20-минутного периода восстанавливали перфузию изолированного сердца, т. е. осуществляли реперфузию нормоксическим раствором, которая длилась 20 мин. Регистрацию оптических сигналов с поверхности желудочков осуществляли непосредственно до, а также после 20-минутного периода прекращения перфузии. Кроме того, оптические сигналы регистрировали по окончании 20-минутного периода реперфузии. На основе оптических сигналов реконструировали изохронные карты активации желудочкового миокарда и вычисляли скорость проведения возбуждения в левом желудочке.

Для статистической обработки результатов использовали программу Statistica 6.0. Статистически значимые различия между группами выявляли с помощью одно- или двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA (с последующим применением апостериорных тестов для множественных сравнений в группах с повторными или независимыми измерениями и внесением поправки Даннета) после предварительной проверки нормальности распределения в группах с помощью теста Шапиро–Вилка. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего за исключением репрезентативных записей.

Результаты

Влияние внеклеточного спермина на ПД в сердце крысы и кролика

Спермин вызывает статистически значимое ($p<005$) дозозависимое снижение ДПД 50% и ДПД 90% в кардиомиоцитах стенки ПЖ крысы, начиная с концентрации 0,1 мМ. В концентрации 1 мМ спермин вызывает снижение ДПД50% на 23±3%, ДПД90% – на 15±3%. Спермин вызывает немного более выраженное снижение ДПД50%, чем ДПД90%. Пример экспериментальной записи ПД стенки ПЖ крысы в контроле и при действии спермина приведен на рис. 1. Кривые доза–эффект приведены на рис. 2.

В папиллярной мышце кролика спермин не вызывает изменения ДПД50% вплоть до концентрации 5 мМ. Спермин вызывает небольшое, но статистически значимое ($p<0,05$) снижение ДПД90% только в концентрации 5 мМ – на 4,7% (или на 6,8 мс при исходной длительности ПД 145 мс). Примеры экспериментальных записей ПД папиллярной мышцы кролика в контроле и при действии спермина, а также дозозависимость действия спермина показаны на рис. 3 и 4.

Влияние спермина на длительность функционального рефрактерного периода в желудочковом миокарде

На рис. 5 приведены кривые, отражающие длительность желудочкового функционального рефрактерного периода при различном базовом ритме (от 2,5 до

ISSN 0022-9040. Кардиология. 2019;59(3).

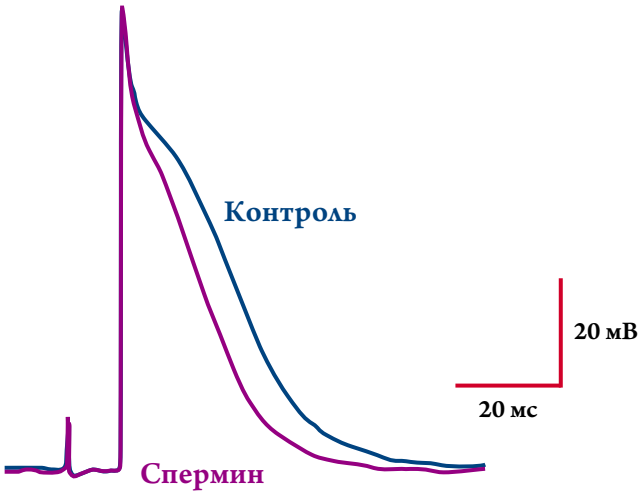

Рис. 1. Влияние 1 мМ спермина на потенциал действия стенки правого желудочка сердца крысы.

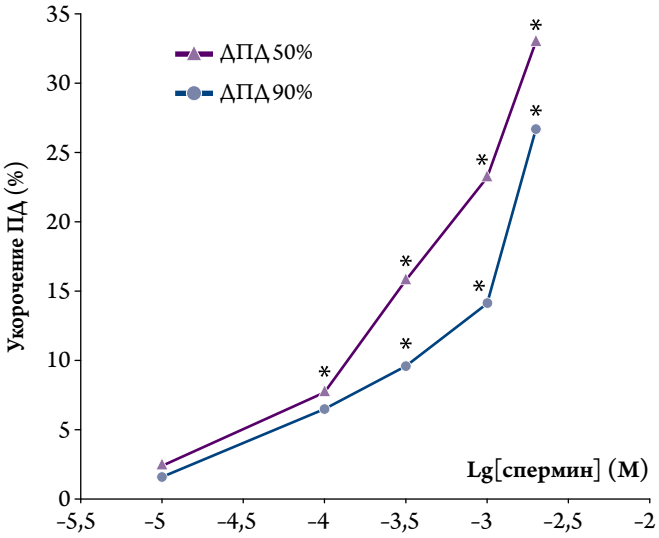

Рис. 2. Кривые доза–эффект для спермина в стенке правого желудочка сердца крысы.

ПД – потенциал действия; ДПД50%, ДПД90% – длительность потенциала действия на уровне соответственно 50 и 90% реполяризации. * – p<0,05 (относительно контроля).

5 Гц) в изолированном сердце кролика. При снижении базового ритма длительность ЖФРП возрастает, что соответствует увеличению длительности желудочковых ПД и рефрактерности. Спермин в диапазоне концентраций 0,1–1 мМ практически не оказывал влияния на ЖФРП у кролика при всех протестированных значениях базового ритма. На рис. 5 видно, что вид контрольной кривой и кривых, соответствующих различным концентрациям спермина, практически совпадает: наклоны контрольной и «экспериментальных» кривых не различаются.

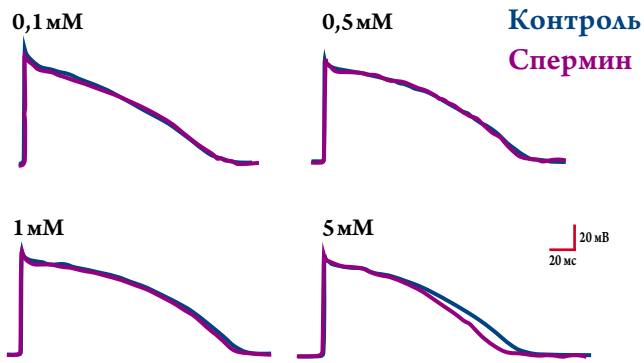

Рис. 3. Влияние 0,5–5 мМ спермина на потенциалы действия папиллярной мышцы кролика.

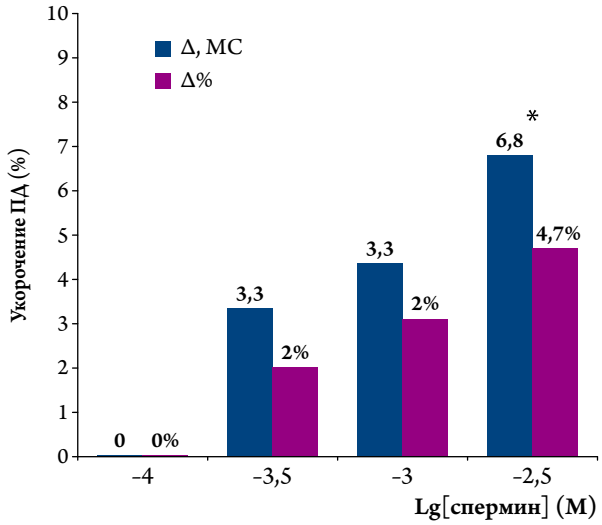

Рис. 4. Снижение длительности потенциалов действия на уровне 90% реполяризации (ДПД90%) в папиллярной мышце кролика, вызываемое внеклеточным спермином.

* – p<0,05.

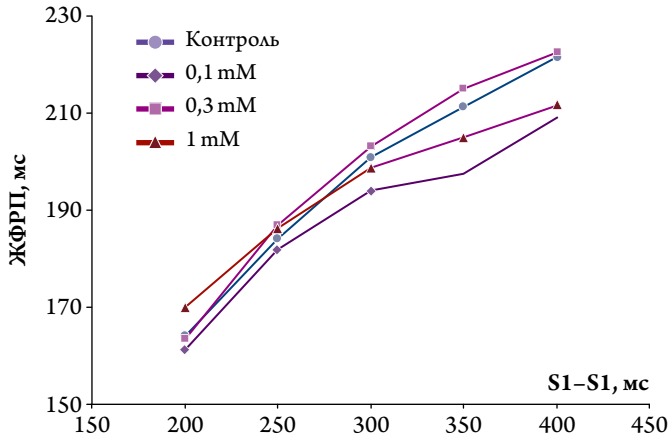

Рис. 5. Влияние спермина на длительность желудочкового функционального рефрактерного периода (ЖФРП) у кролика при разном ритме работы сердца.

По оси абсцисс – интервал между прекондиционирующими стимулами S1–S1.

Влияние спермина на характер проведения возбуждения в желудочковом миокарде при нормоксии

В диапазоне концентраций 0,1–1 мМ при нормоксической перфузии спермин не влиял на скорость проведения возбуждения в сердце кролика. Скорость проведения возбуждения в желудочковом миокарде в контроле составила 0,68±0,11 м/с (n=6), при действии 0,1; 0,3 и 1 мМ спермина – 0,74±0,21; 0,69±0,16 и 0,64±0,13 м/с (везде n=6), соответственно, при частоте следования ПД 2,5 Гц. При более высоком ритме следования ПД в желудочковом миокарде (3; 3,3 и 4 Гц) также не наблюдали статистически значимого изменения скорости проведения при действии 0,1–1 мМ спермина.

В наших экспериментах длительность ЖФРП лежала в диапазоне 170–210 мс. Таким образом, при частоте стимуляции 5 Гц интервалы возбуждения желудочкового миокарда приближались к длительности рефрактерного периода. При такой частоте стимуляции скорость проведения была статистически значимо ниже (0,58±0,09 м/с), чем при стимуляции с частотами 2,5–4 Гц. Однако даже в таких условиях, когда желудочковый миокард находился в состоянии частичной рефрактерности, внеклеточный спермин в концентрациях 0,1–1 мМ был не способен изменить скорость распространения возбуждения. Кроме того, ни в одной из протестированных концентраций спермин не влиял на анизотропию проведения.

На рис. 6 приведен репрезентативный пример изохронных карт активации участка левого желудочка сердца кролика в контроле и при действии 1 мМ спермина.

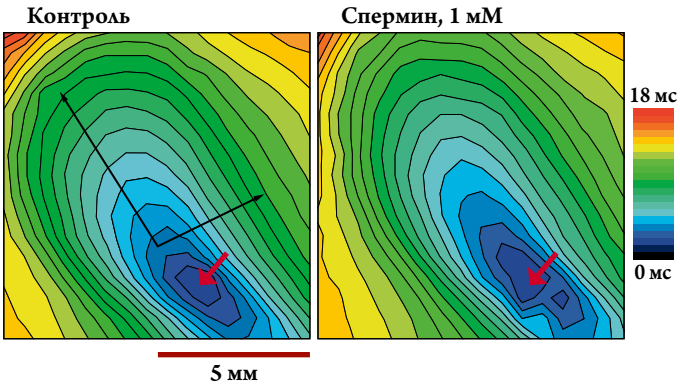

Рис. 6. Изохронные карты активации желудочкового миокарда сердца кролика при нормоксической перфузии в контрольных условиях и при действии спермина в концентрации 1 мМ.

Красная стрелка – место нанесения возбуждающего стимула. Ход времени отражается изменением цвета (синий – начало возбуждения, красный – конец возбуждения). Скорость проведения можно оценить по расстоянию между линиями-изохронами. Анизотропию проведения можно оценить по степени эллипсоидности изохрон. Черные стрелки указывают направления расчета θmax и θmin.

Влияние спермина на характер проведения возбуждения в желудочковом миокарде при моделировании ишемии/реперфузии

Поскольку эффекты спермина, обнаруженные на этапе микроэлектродных исследований, в сердце крысы были значительно более выражены, чем в сердце кролика, то данную часть работы выполняли на препаратах сердца крысы.

В наших экспериментах спермин в желудочковом миокарде сердца крысы, как и в желудочке кролика, не приводил к изменению скорости проведения возбуждения в контрольных условиях. Однако спермин влиял на θmax после периода ишемии и во время реперфузии. В контрольных экспериментах 20-минутный период прекращения перфузии (моделирования ишемии) приводил к снижению θmax на 88±9% от нормы (от 0,61±5 до 0,07±0,01 м/с; n=7). Однако к концу 20-минутного периода реперфузии в этих препаратах наблюдали восстановление θmax, которая достигала 92±10% (56±6 м/с) от исходной. Если препараты изолированного сердца крысы перед моделированием ишемии перфузировали раствором, содержащим 1 мМ спермина, то к концу 20-минутного периода ишемии θmax снижалась статистически значимо (p<0,05) меньше, чем в контрольных условиях: θmax составляла 37±12% от нормы (n=6). К концу 20-минутного периода реперфузии в изолированных сердцах, подвергавшихся предварительному воздействию спермина, наблюдали восстановление скорости проведения (до 89±14%), которое, однако, не отличалось статистически значимо от такового в контрольных экспериментах (рис. 7). Таким образом,

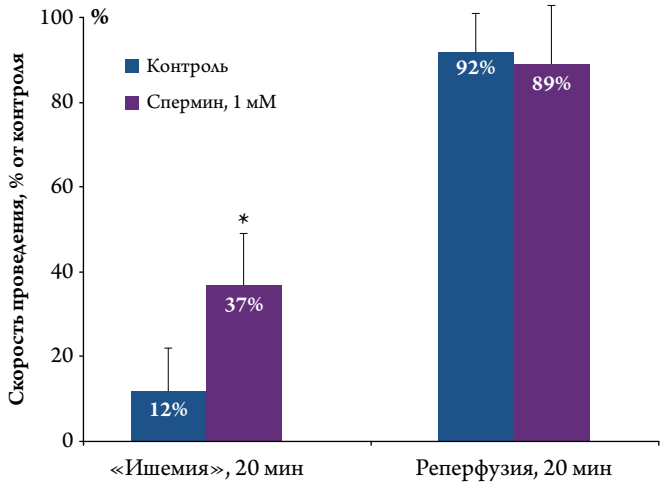

Рис. 7. Скорость проведения возбуждения (θmax) в левом желудочке сердца крысы к концу 20-минутного периода тотального прекращения перфузии, моделирующего ишемию, а также к концу 20-минутного периода реперфузии в контрольных условиях и при действии спермина (1 мМ).

* – p<0,05.

ISSN 0022-9040. Кардиология. 2019;59(3).

внеклеточный спермин способствует сохранению проведения возбуждения в желудочковом миокарде крысы при моделировании ишемии.

Обсуждение

В данной работе впервые исследовано влияние внеклеточного полиамина спермина на электрофизиологические параметры работы желудочкового миокарда сердца двух видов млекопитающих. Среди полиаминов молекулы путресцина, спермидина или спермина несут 2, 3 и 4 положительных заряда соответственно. В данной работе мы использовали спермин как полиамин, имеющий наибольший заряд при физиологических значениях pH и, соответственно, наименьшую трансмембранную проницаемость.

Влияние внеклеточного спермина на потенциалы действия в желудочковом миокарде. Ранее показано, что полиамины влияют на инотропию миокарда. Так, внеклеточный спермин в миллимолярных концентрациях вызывал отрицательный инотропный эффект в сердце крысы, перфузируемом по Лангендорфу. Этот эффект спермина не подавлял глибенкламид, блокатор калиевых ионных АТФ-зависимых каналов, которые относятся к семейству Kir. Влияние спермина на инотропию в данном случае не было связано с регуляцией каналов аномального выпрямления. Эффект спермина также не снимался блокаторами NO-синтаз, хотя установлено, что полиамины влияют на синтез оксида азота. Сделано предположение, что подавление сократимости миокарда при действии спермина является непрямым и связано с увеличением внеклеточного уровня АТФ, аденозина, которые в свою очередь снижают инотропию, активируя метаботропные пуриновые рецепторы P1 и P2Y [25]. В других работах показано, что при отрицательном инотропном эффекте, вызванном спермином в кардиомиоцитах крысы, наблюдалось снижение систолического уровня цитоплазматического кальция $[Ca^{2+}]_i$ [26].

В то же время сообщается о положительном инотропном эффекте полиаминов в сердце. Предполагается, что путресцин увеличивает сократимость миокарда за счет усиления активности аденилатциклазы, повышения уровня cAMP. Высказывается предположение, что внеклеточные полиамины могут являться слабыми агонистами β-адренорецепторов [27].

Реализация как положительного, так и отрицательного инотропного эффекта в миокарде невозможна без изменения биоэлектрической активности. В наших экспериментах внеклеточный спермин в желудочковом миокарде крысы вызывал снижение длительности ПД, хотя в достаточно высоких концентрациях. В желудочковом миокарде кролика спермин практически не влиял на ПД. Можно предположить, что эффекты внеклеточного спермина в желудочковом миокарде являются видоспецифичными. Следует указать, что электрофизиологические механизмы формирования ПД у грызунов и кроликов существенно различаются.

В наших экспериментах спермин в диапазоне концентраций 10 мкМ – 5 мМ снижал длительность ПД преимущественно на уровне 50% реполяризации, т. е. в фазу ПД, соответствующую максимальному кальциевому трансмембранному току ICa (L), который обеспечивает поступление «триггерного» Ca^{2+} в цитоплазму кардиомиоцитов. Показано, что в нейронах мозга внеклеточный спермин, несущий положительные заряды, в миллимолярных концентрациях способен уменьшать проводимость кальциевых каналов, проводящих ICa (L) благодаря снижению локальной (примембранной) концентрации ионов Ca^{2+} [18]. Возможно, что, как и в случае нейронов, в кардиомиоцитах стенки желудочка сердца крысы эффект спермина обусловлен подавлением кальциевого тока, возможно, за счет неспецифического действия – уменьшения локальной концентрации кальция. Подавление ICa (L) должно приводить к снижению $[Ca^{2+}]_i$ и, как следствие, отрицательному инотропному эффекту.

Причина, согласно которой спермин крайне слабо укорачивает ПД у кролика, остается невыясненной. Возможно, что кардиомиоциты кролика менее чувствительны к локальному примембранному изменению заряда и pH. Потенциал фазы плато ПД, т. е. периода, соответствующего току ICa (L), несколько позитивнее у кроликов, чем у крыс. При позитивных значениях мембранного потенциала ингибирующее влияние спермина на кальциевый ток может быть меньше. Однако для подтверждения данного предположения требуются дальнейшие исследования.

Внеклеточный спермин не влияет на рефрактерность желудочкового миокарда кролика. Нами показано, что внеклеточный спермин не оказывает влияния на рефрактерность в желудочках кролика, по крайней мере, в условиях нормоксической перфузии. Анализ кривых желудочковая рефрактерность–ритм позволяет предположить, что внеклеточный спермин не дает ни аритмогенного, ни антиаритмического эффекта в нормальных условиях. Желудочковый миокард кроликов по электрофизиологическим характеристикам гораздо в большей степени, чем миокард крыс, схож с миокардом крупных животных, в том числе желудочковым миокардом человека. Результаты экспериментов с кроликами позволяют предположить, что у человека внеклеточный спермин слабо влияет на рефрактерность желудочков.

Как указывалось ранее, в желудочковом миокарде кролика спермин не влиял на длительность ПД. Эксперименты с оценкой рефрактерности служат допол-

нительным подкреплением того, что в сердце кролика внеклеточный спермин не действует на реполяризацию и, вероятно, калиевые реполяризующие токи, в том числе калиевые каналы аномального выпрямления.

Влияние спермина на проведение возбуждения в желудочковом миокарде в условиях нормоксической перфузии

Щелевые контакты в рабочем миокарде желудочков сформированы коннексинами Cx40 и Cx43, которые обладают высокой проводимостью и обеспечивают быстрое распространение возбуждения в рабочем миокарде.

Ранее показано, что внутриклеточный спермин блокирует ток межклеточных контактов. Степень блокирования щелевых контактов спермином (как и для Kir) является потенциалзависимой: блокирование контактов усиливается при деполяризации, которая, например, сопровождает ишемию. В диапазоне концентраций 0,2–2 мМ спермин блокирует до 90% тока, пропускаемого щелевыми контактами Cx40 при деполяризации на 10–20 мВ. Следует отметить, что спермин не блокирует межклеточный ток через Cx43 и таким образом проявляет селективность в отношении разных типов щелевых контактов [28, 29]. Вероятно, внутриклеточные полиамины могут регулировать межклеточную проводимость, участвовать в «изоляции» поврежденных (деполяризованных) кардиомиоцитов, изменять скорость и надежность проведения возбуждения в миокарде в различных условиях. Однако в наших экспериментах, как в сердце кролика, так и в сердце крысы, в условиях стандартной нормоксической перфузии внеклеточный спермин не влиял на параметры, характеризующие проведение возбуждения. Вероятно, внеклеточный спермин даже в высоких концентрациях не влияет на щелевые контакты.

Влияние внеклеточного спермина на проведение возбуждения в желудочковом миокарде при моделировании ишемии

Известно, что ишемия сопровождается снижением уровня цитоплазматического АТФ, повышением уровня $[Ca^{2+}]_i$, закислением внутриклеточной среды, ингибированием мембранных ферментов, таких как Na/K-АТФазы, и деполяризацией мембранного потенциала. Все эти факторы влияют на проведение возбуждения в миокарде [30, 31]. Ишемия приводит к уменьшению проводимости щелевых контактов, «изоляции кардиомиоцитов» и снижению скорости проведения возбуждения, а также надежности проведения в миокарде [32].

Как указано выше, внутриклеточный спермин, блокируя щелевые контакты, должен усиливать изоляцию кардиомиоцитов и снижать скорость поведения, однако в наших экспериментах наблюдается противоположный эффект. В желудочковом миокарде крысы при ишемии/реперфузии, т. е. в условиях, когда проводимость щелевых контактов снижается, спермин поддерживал скорость проведения возбуждения. Можно предположить, что механизмы действия внутриклеточного и внеклеточного спермина различны или разнонаправлены.

В экспериментах на морских свинках и других лабораторных животных показано, что снижение внеклеточной и цитоплазматической концентрации кальция предотвращает падение скорости проведения возбуждения во время ишемии, увеличивает время ишемии, предшествующее возникновению блоков проведения, укорачивает длительность периода реперфузии, который необходим для восстановления параметров проведения в желудочковом миокарде до «нормального» уровня [33]. Увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах при ишемии является ключевым фактором, обусловливающим возникновение реперфузионных аритмий. В связи с этим один из возможных путей кардиопротекторного действия спермина может заключаться в ограничении проникновения внешнего Ca^{2+} в клетки.

В нашей работе показано, что внеклеточный спермин снижал ДПД50% в многоклеточных препаратах сердца крысы, возможно, за счет подавления ICa (L). Вероятно, спермин в желудочковом миокарде крысы при моделировании ишемии также подавляет ICa (L) и снижает $[Ca^{2+}]_i$, что способствует поддержанию скорости проведения. Является ли этот эффект результатом активации специфических рецепторов спермина на мембране кардиомиоцитов крыс, обусловлен прямым действием на ионные каналы или влияет на кальциевую проводимость опосредованно, через внеклеточные пурины, остается неизвестным. Ранее было показано, что полиамины могут снижать $[Ca^{2+}]_i$ во время ишемии/реперфузии за счет стимуляции продукции NO [34].

Поддерживая скорость проведения возбуждения при ишемии/реперфузии в желудочке, спермин снижает вероятность возникновения циркуляции возбуждения (*re-entry*) и нарушений ритма. Однако внеклеточный спермин был эффективен только у крыс, в отличие от кроликов. Результаты электрофизиологических экспериментов не позволяют сделать вывод, что внеклеточный спермин будет оказывать кардиопротекторное (антиишемическое, антиаритмическое) действие у человека, если только в реализации его эффектов не задействованы NO или внеклеточные пурины. Это предположение требует, однако, экспериментальной проверки.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 17-04-01634, РНФ 14-15-00268.

Information about the author:

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Kuzmin Vladislav S. – PhD of BSc.

E-mail: ku290381@mail.ru

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Lewenhoeck D.A. Observationes D. Anthonii Lewenhoeck, De Natis E Semine Genitali Animalculis. Philosophical Transactions of the Royal Society of London 1677;12:1040–1046.
2. Tabor C.W., Tabor H. Polyamines. Annu Rev Biochem 1984;53:749–790.
3. Russel D.H., Durie B.G.M. Polyamines in various pathological states. Prog Cancer Res Ther 1978;8:157–165.
4. van Dam L., Korolev N., Nordenskiöld L. Polyamine-nucleic acid interactions and the effects on structure in oriented DNA fibers. Nucleic Acids Res 2002;30(2):419–428.
5. Saminathan M., Thomas T., Shirahata A. et al. Polyamine structural effects on the induction and stabilization of liquid crystalline DNA: potential applications to DNA packaging, gene therapy and polyamine therapeutics. Nucleic Acids Res 2002;30(17):3722–3731.
6. Redgate E.S., Boggs S., Grudziak A. et al. Polyamines in brain tumor therapy. J Neurooncol 1995;25:167–179.
7. Eisenberg T., Abdellatif M., Schroeder S. et al. Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. Nat Med 2016;22(12):1428–1438.
8. Soda K. Biological Effects of Polyamines on the Prevention of Aging-associated Diseases and on Lifespan Extension. Food Science and Technology Research 2015;21(2):145–157.
9. Lopatin A.N., Makhina E.N., Nichols C.G. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. Nature 1994;372:366–369.
10. Nichols C.G., Lee S.J. Polyamines and potassium channels: A twenty five year romance. J Biol Chem 2018; pii: jbc.TM118.003344.
11. Lopatin A.N., Nichols C.G. Inward rectifiers in the heart: an update on I(K1). J Mol Cell Cardiol 2001;33(4):625–638.
12. Lopatin A.N., Makhina E.N., Nichols C.G. The mechanism of inward rectification of potassium channels: “long-pore plugging” by cytoplasmic polyamines. J Gen Physiol 1995;106(5):923–955.
13. Nerbonne J.M., Kass R.S. Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. Physiol Rev 2005;85:1205–1253.
14. Yamada M., Kurachi Y. Spermine gates inward-rectifying muscarinic but not ATP-sensitive K1 channels in rabbit atrial myocytes. J Biol Chem 1995;270:9289–9294.
15. Masuko T., Kusama-Eguchi K., Sakata K. et al. Polyamine transport, accumulation, and release in brain. J Neurochem 2003;84(3):610–617.
16. Skatchkov S.N., Antonov S.M., Eaton M.J. Glia and glial polyamines. Role in brain function in health and disease. Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology 2016;10(2):73–98. Russian (Скачков С.Н., Антонов С.М., Итон М.Дж. Глия и глиальные полиамины. Роль в функционировании мозга в норме и патологии. Биол мембр 2016;33(1):3–31.
17. Biedermann B., Skatchkov S.N., Brunk I. et al. Spermine/spermidine is expressed by retinal glial (Müller) cells and controls distinct K+ channels of their membrane. Glia 1998;23(3):209–220.
18. Chen W., Harnett M.T., Smith S.M. Modulation of Neuronal Voltage-Activated Calcium and Sodium Channels by Polyamines and pH. Channels (Austin) 2007;1(4):281–290.
19. Díaz-Soto G., Rocher A., García-Rodríguez C. et al. The Calcium-Sensing Receptor in Health and Disease. Int Rev Cell Mol Biol 2016;327:321–369.
20. Rogers A.C., McDermott F.D., Mohan H.M. et al. The effects of polyamines on human colonic mucosal function. Eur J Pharmacol 2015;764:157–163.
21. Noujaim S.F., Stuckey J.A., Ponce-Balbuena D. et al. Structural bases for the different antifibrillatory effects of chloroquine and quinidine. Cardiovasc Res 2011;89(4):862–869.
22. Fedorov V.V., Sharifov O.F., Rosenshtraukh L.V. et al. Mechanism of antiarrhythmic action of nibentan on experimental model of vagotonic atrial fibrillation in the canine heart. Kardiologiya 1999;39(3):45–56. Russian (Федоров В.В., Шарифов О.Ф., Розенштраух Л.В. и др. Механизм антиаритмического действия нибентана на экспериментальной модели ваготонической фибрилляции предсердий у собак. Кардиология 1999;39(3):45–56.)
23. Senanayake M.D., Amunugama H., Boncher T.D. et al. Design of polyamine-based therapeutic agents: new targets and new directions. Essays Biochem 2009;46:77–94.
24. Glukhov A.V., Reznik A.V., Kovalenko N.V. et al. Effect of Nibentan on Dispersion of Repolarization of Ventricular Myocardium in the Rabbit. Kardiologiya 2008;48(7):40–47. Russian (Глухов А.В., Резник А.В., Коваленко Н.В. и др. Влияние нибентана на дисперсию реполяризации миокарда желудочков кролика. Кардиология 2008;48(7):40–47.)
25. Guevara-Balcazara G., Querejeta-Villagomeza E., Nuevo-Adallaa O. et al. Spermine-induced negative inotropic effect in isolated rat heart, is mediated through the release of ATP. Biochem Pharmacol 2003;66:157–161.
26. Ventura C., Ferroni C., Flamigni F. et al. Polyamine effects on [Ca_2] i homeostasis and contractility in isolate rat ventricular cardiomyocytes. Am J Physiol 1994;267:H587–H592.
27. Bordallo C., Cantabrana B., Velasco L. et al. Manuel Sánchez Putrescine modulation of acute activation of the в-adrenergic system in the left atrium of rat. Eur J Pharmacol 2008;598:68–74.
28. Musa H., Veenstra R.D. Voltage-Dependent Blockade of Connexin40 Gap Junctions by Spermine. Biophys J 2003;84:205–219.
29. Lin X., Fenn E., Veenstra R.D. An amino-terminal lysine residue of rat connexin40 that is required for spermine block. J Physiol 2006;570(2):251–269.
30. Rohr S., Kucera J.P., Kléber A.G. Slow conduction in cardiac tissue, I: effects of a reduction of excitability versus a reduction of electrical coupling on microconduction. Circ Res 1998;83(8):781–794.
31. Kagiyama Y., Hill J.L., Gettes L.S. Interaction of acidosis and increased extracellular potassium on action potential characteristics and conduction in guinea pig ventricular muscle. Circ Res 1982;51(5):614–623.
32. Kléber A.G., Janse M.J., Wilms-Schopmann F.J. et al. Changes in conduction velocity during acute ischemia in ventricular myocardium of the isolated porcine heart. Circulation 1986;73(1):189–198.
33. Hoeker G.S., Poelzing S. Attenuation of conduction slowing during global ischemia in guinea pig hearts through increased extracellular calcium. Biophys J 2017;112, (SPECIAL ISSUE 3): 401a.
34. Zhao Y.J., Xu C.Q., Zhang W.H. et al. Role of polyamines in myocardial ischemia/reperfusion injury and their interactions with nitric oxide. Eur J Pharmacol 2007;562(3):236–246.

Поступила 12.10.18 (Received 12.10.18)