

ЭФФЕКТЫ КАРДИОТОКСИНОВ КОБРЫ НА ПАПИЛЛЯРНОЙ МЫШЦЕ И СЕРДЦЕ КРЫСЫ, ПЕРФУЗИРУЕМОМ ПО ЛАНГЕНДОРФУ, НЕ СВЯЗАНЫ С ВЫБРОСОМ АДРЕНАЛИНА

Аверин А.С.¹, Тюрин Ф.В.², Самодурова К.В.³, Старков В.Г.⁴, Андреева Т.В.⁴, Уткин Ю.Н.⁴

¹ Институт биофизики клетки РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН
ул. Институтская, 3, г. Пущино, Московская обл., 142290, РФ; e-mail: averinas82@gmail.com

² Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого
пр. Ленина, 125, г. Тула, 300026, РФ

³ Санкт-Петербургский государственный технологический институт
Московский пр., 26, г. Санкт-Петербург, 190013, РФ

⁴ Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 117997, РФ

Поступила в редакцию 15.07.2022. DOI: 10.29039/tusjbpс.2022.0515

Аннотация. При исследовании действия кардиотоксинов кобры на миокардиальную ткань оценивалась как сократимость правого желудочка (папиллярная мышца), так и левого (изоволюмическая регистрация пульсового давления в левом желудочке при перфузии сердца по Лангендорфу). На папиллярной мышце оба токсина в концентрации 5 мкг/мл, вызывали краткосрочный рост силы сокращения до $200 \pm 25\%$ и $171 \pm 15\%$ для КТ-1 и КТ-2, соответственно, в точке максимума эффекта. При этом для КТ-1 и КТ-2 время достижения максимума сокращения (ВДМ) увеличивалось с 104 ± 2 до 111 ± 2 и с 96 ± 2 до 104 ± 5 мс, время расслабления до 50% (BP50%) с 64 ± 4 до 70 ± 6 и с 64 ± 6 до 69 ± 7 мс, время расслабления до 95% (BP95%) с 163 ± 10 до 190 ± 22 и с 148 ± 16 до 155 ± 20 мс, соответственно. Это существенно отличается от положительного инотропного эффекта β -адреномиметика изопротеренола ($170 \pm 31\%$) который вызывает ускорение ВДМ со 106 ± 5 до 89 ± 4 мс, BP50% с 58 ± 6 до 43 ± 4 мс и BP95% с 145 ± 15 до 90 ± 14 мс. При воздействии кардиотоксинов на целое сердце также наблюдался рост силы сокращения, который сменялся ее подавлением и контрактурой, в отличие изопротеренола, который вызывал устойчивый рост сократимости, сопряженный с увеличением частоты сердечных сокращений. Предварительная обработка папиллярных мышц β -блокатором пропранололом (10 мкМ), не препятствовала развитию эффектов кардиотоксинов, но полностью блокировала эффекты изопротеренола. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что временный рост сократимости при действии кардиотоксинов не связан с выбросом эндогенного адреналина, а скорее обусловлен изменениями кальциевого гомеостаза в кардиомиоцитах.

Ключевые слова: кардиотоксины, папиллярная мышца, перфузия сердца по Лангендорфу, положительный инотропный эффект.

Кардиотоксины яда кобр представляют собой группу трехпетельных токсинов, общим свойством которых является прямое взаимодействие с клеточной мембраной, ведущее к образованию ионной поры, деполяризации, кальциевой перегрузке и как следствие гибели клетки. Нами проведено исследование кардиотоксинов 1 (КТ-1) и 2 (КТ-2) яда кобры *Naja oxiana* и показано, что КТ-2 заметно превосходит по своей активности КТ-1 при воздействии на препараты папиллярной мышцы и кольца грудной аорты крысы [1], а также на сердце крысы, перфузируемое по Лангендорфу [2]. КТ-1 и КТ-2 подобно другим кардиотоксинам давали временное увеличение силы сокращения [3,4]. Следует отметить, что компоненты животных ядов могут приводить к положительному инотропному эффекту, однако механизмы опосредующие данный эффект могут быть различными, включая взаимодействие с рецепторами [5] и стимулирование выброса эндогенного норадреналина [6]. Также потенциально к положительному инотропному эффекту может приводить блокирование K_v белками семейства CRISP [7,8] и изменение Ca гомеостаза в результате прямого воздействия кардиотоксинов [1]. Поскольку из данных литературы известно что кардиотоксины вызывают изменение уровня внутриклеточного Ca [3] и в тоже время могут стимулировать выброс сигнальных молекул некоторыми типами клеток [9], целью данного исследования явилось установление наличия связи временного роста сократимости при воздействии кардиотоксинов с выбросом эндогенного адреналина в ткани миокарда.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили (в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных, 1986, 86/609/ЕЕС) на сердцах крысы линии Vistar весом 200-250г. Животных анестезировали диэтиловым эфиром. Сердце быстро извлекалось из грудной клетки. Далее осуществлялось выделение папиллярных мышц, либо подключение сердца к стенду для проведения экспериментов с перфузией по Лангендорфу с гидростатическим давлением 70 мм. рт. ст.

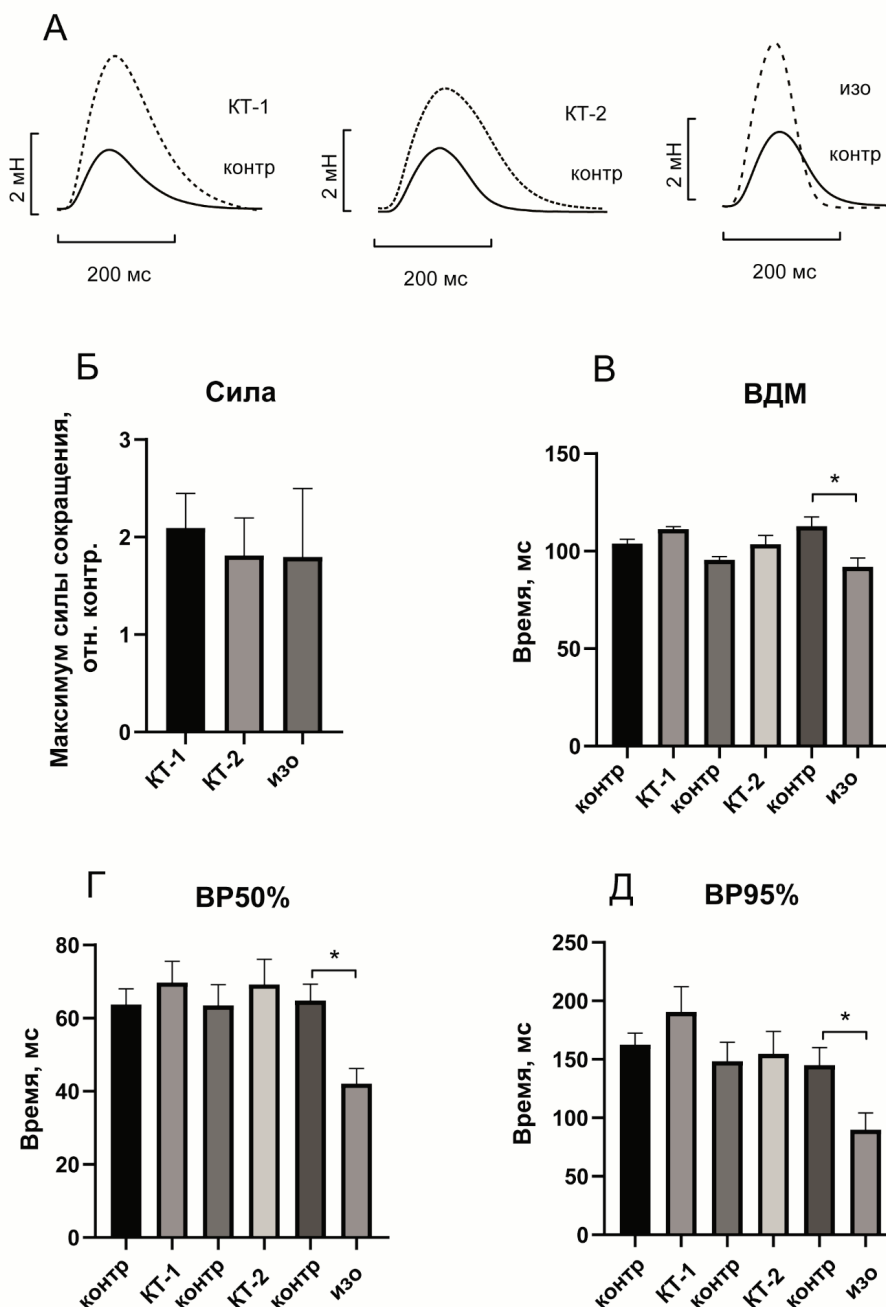


Рисунок 1. Влияние КТ-1, КТ-2 и изопротеренола на силу и временные характеристики сокращения папиллярной мышцы. А - примеры оригинальных записей сокращений в контроле (сплошная линия) и в точке максимального развития положительного инотропного эффекта (пунктирная линия). Б - максимальная величина роста силы сокращений относительно контроля. В, Г, Д - временные параметры сокращения, достоверными отличия были только группе экспериментов с изопротеренолом. Концентрация КТ-1 и КТ-2 - 5мкг/мл, изопротеренола - 1мкМ. Данные представлены как средние значения ± ошибка среднего (*-достоверное отличие от контроля $p < 0,05$)

Механическую активность папиллярных мышц регистрировали с помощью механотрона 6Х-2М. В начале каждого опыта препарат стимулировали прямоугольными импульсами с напряжением 5 В, длительностью 5 мс, силой тока в 2 раза превышающую пороговую и частотой 0,3 Гц в течение 1 часа для стабилизации силы сокращения. Анализировалась сила сокращения, время достижения максимума сокращения (ВДМ), время расслабления до 50% (BP50%), время расслабления до 95% (BP95%).

Для измерения внутрижелудочкового давления в левый желудочек вставлялся небольшой латексный баллончик, соединенный катетером с датчиком давления PhysExp (Cardioprotect Ltd., Санкт-Петербург). Температура поддерживалась на уровне $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Использовался раствор 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 (pH=7,4). Раствор аэрировали газовой смесью: O_2 (95%) + CO_2 (5%). Перед исследованием активности токсинов сердца проходили 30 минутный период стабилизации.

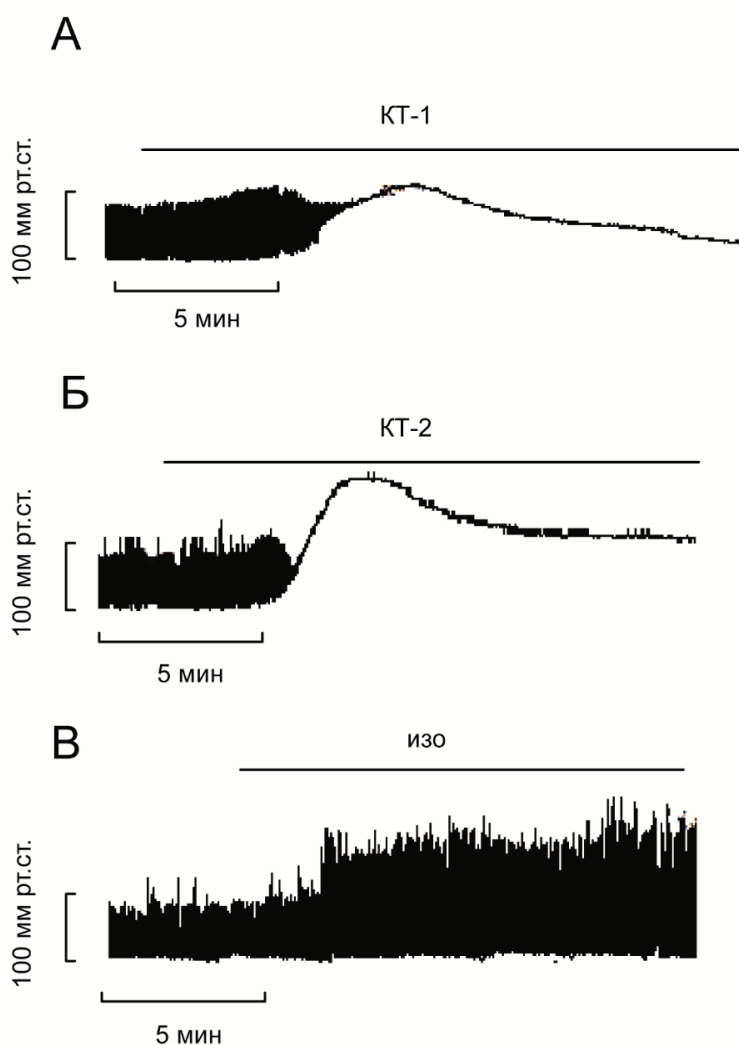


Рисунок 2. Влияние КТ-1, КТ-2 и изопротеренола на сократительную активность левого желудочка при ретроградной перфузии по Лангендорфу. Приведены примеры оригинальных записей эффектов КТ-1 (А), КТ-2 (Б) и изопротеренола (В). Концентрация КТ-1 и КТ-2 - 5мкг/мл, изопротеренола - 1мкМ

Кардиотоксины выделяли из яда кобры *Naja oxiana* как описано ранее [1]. Кардиотоксины либо изопротеренол добавляли в перфузионный раствор сразу после периода адаптации, либо после 30 минут предварительной обработки пропранололом.

Данные проверяли на нормальность распределения при помощи теста Шапиро-Уилка. Достоверность полученных результатов оценивали с помощью парного теста Стьюдента (по уровню значимости $p < 0,05$). Данные представлены как средние значения \pm стандартная ошибка среднего. Статистический анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2019 и GraphPad Prism 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из рисунка 1 при воздействии на папиллярную мышцу оба токсина в концентрации 5 мкг/мл, вызывали краткосрочный рост сократимости до $200 \pm 25\%$ и $171 \pm 15\%$ для КТ-1 и КТ-2 соответственно в точке максимума эффекта (рис. 1А, Б). β -адреносиметик изопротеренол в концентрации 1 мкМ оказывал схожий по величине эффект в $170 \pm 31\%$ (рис. 1А, Б). При этом для КТ-1 и КТ-2 время достижения максимума сокращения (ВДМ) увеличивалось с 104 ± 2 до 111 ± 2 и с 96 ± 2 до 104 ± 5 мс (рис. 1В), время расслабления до 50% (ВР50%) с 64 ± 4 до 70 ± 6 и с 64 ± 6 до 69 ± 7 мс (рис. 1Г); время расслабления до 95% (ВР95%) с 163 ± 10 до 190 ± 22 и с 148 ± 16 до 155 ± 20 мс (рис. 1Д), соответственно, что существенно отличается от эффекта изопротеренола, который вызывает ускорение ВДМ со 106 ± 5 до 89 ± 4 мс, ВР50% с 58 ± 6 до 43 ± 4 мс и ВР95% с 145 ± 15 до 90 ± 14 мс. Известно, что большую часть адренорецепторов в сердце составляет β подтип, активация которого ведет к положительному инотропному и хронотропному эффектам, а также к отрицательному луситропному эффекту [10]. Поскольку в нашей работе частота сокращений задается стимуляцией, то можно сопоставить эффекты по силе и временным параметрам сокращения. Отсутствие ускорения кинетики сокращения свидетельствует в пользу того, что в данном случае адренорецепторный путь не задействован. Альтернативной причиной роста сократимости может

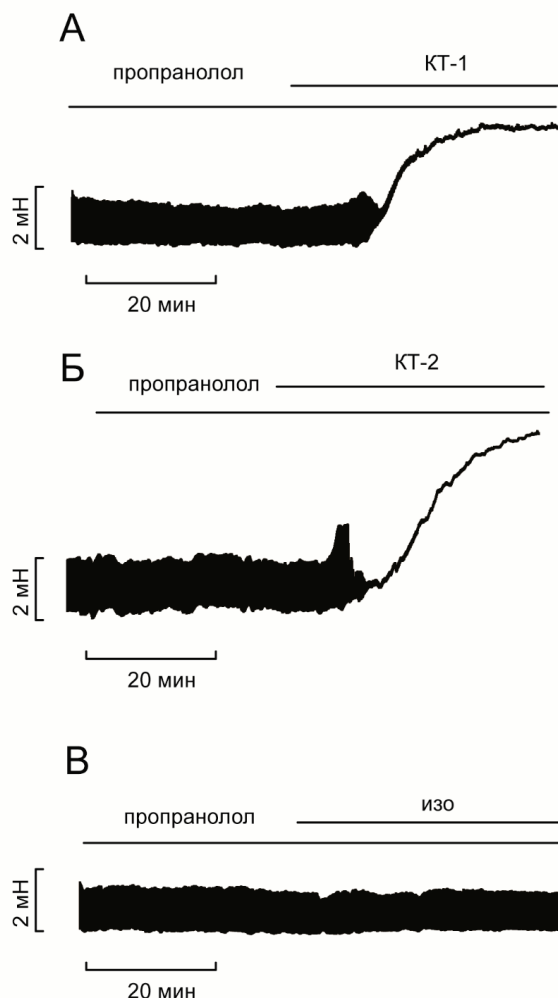


Рисунок 3. Влияние β -блокатора пропранолола на увеличение сократимости папиллярной мышцы правого желудочка, вызванное кардиотоксинами или изопроterenолом. В качестве примера приведены оригинальные записи эффектов КТ-1 (А), КТ-2 (Б) и изопроterenолом (В). Концентрация КТ-1 и КТ-2 – 5мкг/мл, изопроterenолом – 1мкМ, пропранолола – 10мкМ

служить увеличение внутриклеточного Na^+ [11,12]. Ранее было показано, что в этом случае рост силы сокращения сопровождается увеличением его длительности [13], и это вполне согласуется с полученными нами данными.

При воздействии КТ-1 (рис. 2А) и КТ-2 (рис. 2Б) на целое сердце также наблюдался рост пульсового давления, который сменялся его подавлением и контрактурой, в отличие изопроterenолом (рис. 2В), который вызывал устойчивый рост данного параметра, сопряженный с увеличением частоты сердечных сокращений. Следует также отметить, что положительный инотропный эффект КТ-1 и КТ-2 был значительно менее выражен, чем в экспериментах на папиллярной мышце (рис. 1Б). Данный факт может быть связан как с тканевой специфичностью действия кардиотоксинов [14,15], так и различными условиями эксперимента, так папиллярная мышца стимулировалась частотой 0.3 Гц, в то время как в опытах на целом сердце частота сердечных сокращений составляла более 3 Гц [2], а эффекты кардиотоксинов могут быть частотно зависимыми [16].

Для того чтобы получить дополнительные свидетельства того, что рост сократимости не связан с выбросом эндогенного адреналина мы провели эксперименты с предварительной обработкой папиллярных мышц неселективным β -блокатором пропранололом в концентрации 10 мкМ. Как видно из рисунка 3, предварительная обработка пропранололом не препятствовала развитию эффектов, вызванных кардиотоксинами, но полностью блокировала эффект изопроterenолом.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что временный рост сократимости не связан с выбросом эндогенного адреналина, а скорее обусловлен изменениями кальциевого гомеостаза в кардиомиоцитах.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 21-14-00316.

Список литературы / References:

1. Averin A.S., Nenov M.N., Starkov V.G., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. Effects of Cardiotoxins from *Naja oxiana* Cobra Venom on Rat Heart Muscle and Aorta: A Comparative Study of Toxin-Induced Contraction Mechanisms. *Toxins (Basel)*, 2022, vol. 14, doi: 10.3390/toxins14020088.

2. Averin A.S., Goltyaev M.V., Andreeva T.V., Starkov V.G., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. S- and P-type cobra venom cardiotoxins differ in their action on isolated rat heart. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, 2022, vol. 28, e20210110, doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2021-0110.
3. 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, vol. 29, pp. 2759-2770, doi: 10.1006/jmcc.1997.0511.
4. 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, vol. 59, pp. PL55-60, doi: 10.1016/0024-3205(96)00305-0.
5. Burrell K.M., Molenaar P., Dawson P.J., Kaumann A.J. Contractile and arrhythmic effects of endothelin receptor agonists in human heart in vitro: Blockade with SB 209670. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2000, vol. 292, pp. 449-459.
6. Gomes H.L., Menezes T.N., Malacarne P.F., Roman-Campos D., Gondim A.N., Cruz J.S., Vassallo D.V., Figueiredo S.G. Cardiovascular effects of Sp-CTx, a cytolytic from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) venom. *Toxicon*, 2016, vol. 118, pp. 141-148, doi: 10.1016/j.toxicon.2016.05.002.
7. Osipov A.V., Levashov M.Y., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. Cobra venom contains a pool of cysteine-rich secretory proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, vol. 328, pp. 177-182, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.12.154.
8. Tadokoro T., Modahl C.M., Maenaka K., Aoki-Shioi N. Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISPs) From Venomous Snakes: An Overview of the Functional Diversity in A Large and Underappreciated Superfamily. *Toxins (Basel)*, 2020, vol. 12, doi: 10.3390/toxins12030175.
9. Ho K.H., Kwan C.Y., Huang S.J., Bourreau J.P. Dual effect of cobra cardiotoxin on vascular smooth muscle and endothelium. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 1998, vol. 19, pp. 197-202.
10. Matuskova L., Czippelova B., Turianikova Z., Svec D., Kolkova Z., Lasabova Z., Javorka M. Beta-adrenergic receptors gene polymorphisms are associated with cardiac contractility and blood pressure variability. *Physiol. Res.*, 2021, vol. 70, pp. S327-S337, doi: 10.33549/physiolres.934837.
11. Cohen C.J., Fozzard H.A., Sheu S.S. Increase in intracellular sodium ion activity during stimulation in mammalian cardiac muscle. *Circ. Res.*, 1982, vol. 50, pp. 651-662, doi: 10.1161/01.res.50.5.651.
12. Mubagwa K., Lin W., Sipido K., Bosteels S., Flameng W. Monensin-induced reversal of positive force-frequency relationship in cardiac muscle: Role of intracellular sodium in rest-dependent potentiation of contraction. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1997, vol. 29, pp. 977-989, doi: 10.1006/jmcc.1996.0342.
13. Flesch M., Erdmann E. Na⁺ channel activators as positive inotropic agents for the treatment of chronic heart failure. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 2001, vol. 15, pp. 379-386, doi: 10.1023/a:1013329203750.
14. Loots J.M., Meij H.S., Meyer B.J. Effects of *Naja nivea* venom on nerve, cardiac and skeletal muscle activity of the frog. *Br. J. Pharmacol.*, 1973, vol. 47, pp. 576-585, doi: 10.1111/j.1476-5381.1973.tb08188.x.
15. 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, vol. 20, pp. 379-396, doi: 10.1016/0041-0101(82)90001-0.
16. Averin A.S., Astashev M.E., Andreeva T.V., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. Cardiotoxins from Cobra *Naja oxiana* Change the Force of Contraction and the Character of Rhythmoinotropic Phenomena in the Rat Myocardium. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2019, vol. 487, pp. 282-286, doi: 10.1134/S1607672919040094.

THE EFFECTS OF COBRA CARDIOTOXINS ON THE PAPILLARY MUSCLE AND LANGENDORF PERFUSED RAT HEART ARE NOT ASSOCIATED WITH ADRENALINE RELEASE.Averin A.S.¹, Tyurin F.V.², Samodurova K.V.³, Starkov V.G.⁴, Andreeva T.V.⁴, Utkin Yu.N.⁴¹Institute of Cell Biophysics FITC PNCBI RAS

3 Institutskaya str., Pushchino, Moscow region, 142290, Russia; e-mail: averinas82@gmail.com

²Tula State Pedagogical University named after L.N. Tolstoy

Lenin Ave., 125, Tula, 300026, Russia

³St. Petersburg State Technological Institute

Moskovsky Ave., 26, St. Petersburg, 190013, Russia

⁴Institute of Bioorganic Chemistry named after Academicians M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov RAS

Mikhukho-Maklaya str., 16/10, Moscow, 117997, Russian

Received 15.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0515

Abstract. In a study of the effects of cobra cardiotoxins on myocardial tissue, both right ventricular (papillary muscle) and left ventricular contractility (isovolumic recording of left ventricular pulse pressure during Langendorff perfusion of the heart) were assessed. In papillary muscle, both toxins, at a concentration of 5 µg/mL, caused short-term increases in contractility to 200±25% and 171±15% for CTX-1 and CTX-2, respectively, at the point of maximum effect. At the same time, for CTX-1 and CTX-2, the time to peak tension (TPT) increased from 104±2 to 111±2 and from 96±2 to 104±5 ms, the relaxation time to 50%(TR50%) from 64±4 to 70±6 and from 64±6 to 69±7 ms, and the relaxation time to 95%(TR95%) from 163±10 to 190±22 and from 148±16 to 155±20 ms, respectively. This significantly differs from the positive inotropic effect of the β-adrenomimetic isoproterenol (170±31%), which causes acceleration of TPT from 106±5 to 89±4 ms, TR50% from 58±6 to 43±4 ms, and TR95% from 145±15 to 90±14 ms. When the whole heart was exposed to cardiotoxins, an increase in contractility was also observed, followed by its suppression and contracture, in contrast to isoproterenol, which caused a steady increase in contractility coupled with an increase in heart rate. Pretreatment of papillary muscles with the β-blocker propranolol (10 µM) did not prevent the development of cardiotoxin effects, but completely blocked the effects of isoproterenol. Our data indicate that the temporary increase in contractility under the action of cardiotoxins is not associated with the release of endogenous adrenaline, but rather is caused by changes in calcium homeostasis in cardiomyocytes.

Key words: cardiotoxins, papillary muscle, Langendorff perfusion, positive inotropic effect.