

СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ Eu^{3+}
НА СПОНТАННЫЕ СЕРДЕЧНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ© 2024 г. К. В. Соболев^{1,*}, С. М. Коротков¹, И. В. Шемарова¹, В. П. Нестеров¹¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: peer9@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.10.2023 г.

После доработки 18.03.2024 г.

Принята к публикации 21.03.2024 г.

Негативные кумулятивные эффекты влияния лантаноидов на организм человека хорошо известны, они связаны, преимущественно, с токсическим воздействием редкоземельных металлов (РЗЭ) на мышечную ткань. Однако эффекты низких концентраций этих металлов на мышцы изучены значительно хуже. В своей работе мы выявили необычный стимулирующий эффект низкой концентрации европия (Eu^{3+}) на спонтанные сокращения препаратов предсердий сердечной мышцы лягушки. Целью настоящего исследования было изучение стимулирующего влияния европия (Eu^{3+}) на сокращение препаратов предсердий сердечной мышцы как в норме, так и в присутствии ингибитора митохондриального дыхания азида натрия (NaN_3). Исследование проводилось с использованием двух экспериментальных моделей: мышечных препаратов, полученных из изолированных предсердий сердца лягушки *Rana ridibunda*, и митохондрий, выделенных из сердца самцов крыс линии Вистар. В результате проведенных исследований установлено, что Eu^{3+} в концентрации 0.2 мМ при температуре 20°C потенцировал сокращения предсердий лягушки *in situ*, при этом увеличивалась как амплитуда, так и максимальная скорость нарастания силы одиночных спонтанных сокращений. Спонтанные сокращения предсердий становились более устойчивыми к воздействию 1мМ NaN_3 . При этом Eu^{3+} не влиял на дыхание энергизованных митохондрий (активированное АДФ (состояние 3) или 2,4-динитрофенолом (состояние 3Р_{днф})). Интенсивность этого дыхания снижалась в условиях кальциевой нагрузки митохондрий независимо от наличия в среде Eu^{3+} . Таким образом, на основании проведенных исследований был сделан вывод о том, что ионы Eu^{3+} при низкой концентрации (0.2 мМ) стимулируют сокращение предсердий и оказывают положительное инотропное действие. Стимулирующий эффект низкой концентрации Eu^{3+} на сердце можно объяснить синергизмом в действии Ca^{2+} и Eu^{3+} на кальциевые каналы стимулирующей Ca^{2+} -зависимых процессов в кардиомиоцитах и отсутствием негативного эффекта на дыхание митохондрий.

Ключевые слова: лантаноиды, редкоземельные элементы, миокард, инотропное действие, сокращение, Eu^{3+} , Ca^{2+} , дыхание митохондрий

DOI: 10.31857/S0044452924030069, **EDN:** YXGPSW

ВВЕДЕНИЕ

Лантаноиды, в том числе европий (Eu^{3+}), широко применяются в современной медицине и диагностике [1–4]. Легированные Eu^{3+} наночастицы NaYF_4 используются в технологии направленной доставки нейротрансмиттеров в синапсомы для изучения потенциального токсического эффекта на эндотелиальные клетки [5]. Оксид Eu^{3+} служит также в качестве активатора люминофоров [6,7]. Лантаноиды могут стимулировать нейрогенез [8] и использоваться в качестве препаратов для терапии в современной медицине [9]. Кроме того, катионные люминесцентные комплексы Eu^{3+} используются для визуализации изменений концентрации

ряда биологически активных молекул, локальных температурных градиентов, а также структуры органелл при исследовании клеток *in vitro* [10–13]. В этой связи возникает необходимость тщательного и всестороннего изучения влияния лантаноидов на организм человека. Считается, что редкоземельные металлы, включая Eu^{3+} , малотоксичны [14], однако следует принять во внимание тот факт, что лантаноиды способны к биоаккумуляции, что может значительно увеличивать их токсичность [15]. На животных моделях было продемонстрировано, что лантаноиды в высокой концентрации токсичны для электровозбудимых клеток [16–19]. Ранее нами было показано, что в сердечной мышце лантаноиды в высокой концентрации обладают отрицательным

хроно- и инотропным действием, снижают энергетическую функцию митохондрий сердца [17–19]. Однако в некоторых работах отмечался положительный эффект лантаноидов на работу сердечной мышцы, что может быть связано с их влиянием на Ca^{2+} -зависимые процессы [20–24]. Ранее нами также отмечалось, что ионы Eu^{3+} при определенных экспериментальных условиях могут стимулировать спонтанные сердечные сокращения [19]. Поэтому целью данной работы являлось дальнейшее изучение этого эффекта *in situ* на спонтанные сокращения мышечных препаратов сердца как в норме, так и в присутствии ингибитора митохондриального дыхания азидид натрия, а также непосредственно на митохондрии, выделенные из сердца крысы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось с использованием двух экспериментальных моделей: мышечных препаратов, полученных из изолированных предсердий сердца самцов лягушки *Rana ridibunda* и митохондрий, выделенных из целого сердца самцов крыс линии Вистар. Выбор сердца лягушки *Rana ridibunda* в качестве экспериментальной модели связан, с одной стороны, с большей устойчивостью изолированных мышечных препаратов сердца лягушки, позволяющих, в отличие от аналогичных препаратов теплокровных животных, регистрировать спонтанные сокращения на протяжении длительного периода. С другой стороны, общность физиологических процессов, лежащих в основе сердечной деятельности холоднокровных и теплокровных животных [25], позволяет производить сравнение между разными типами животных. Выбор изолированных митохондрий сердца крысы обусловлен необходимостью визуализации энергетических процессов, происходящих в этих органеллах под воздействием изучаемых нами веществ. Эксперименты *in situ* проводили на взрослых самцах *Rana ridibunda* в феврале–марте.

Регистрацию сокращений осуществляли с помощью тензодатчиков, передающих сократительный сигнал с мышечного препарата на компьютер. Обработка сигнала от тензодатчиков производилась в программе WinPulse, сила сокращения выражалась в Ньютонах (Н). Учитывали следующие параметры сокращения: максимальное сокращение ($F_{\max}$, мН); частота сокращений (Hz); максимальная скорость нарастания силы сокращения ($V_{\max}$, мН/с); время, необходимое мышце для достижения максимальной силы сокращения (t , с), и период полурасслабления ($t_{1/2\text{rel}}$, с). Регистрацию сокращений предсердий проводили в изометрическом режиме при 20°C. Нитрат европия ($\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$) был приготовлен в виде 100 мМ сток-раствора, который добавляли в нормальный физиологический раствор для холод-

нокровных животных (раствор Рингера) перед экспериментом до конечных концентраций 0.2 мМ и 1 мМ. Инкубация предсердий с Eu^{3+} осуществлялась 6–7 мин. Параметры сокращений измеряли до аппликации Eu^{3+} и в конце инкубации с металлом. Параметры сокращений в одном опыте усреднялись из нескольких сокращений (около 30) в течение 1 мин. Инкубацию предсердий с азидидом натрия (NaN_3) осуществляли около 9 мин в контроле и через 20 мин после отмывания 0.2 мМ Eu^{3+} . В работе было использовано 4 лягушки для каждого эксперимента.

Митохондрии выделяли по стандартной методике, описанной ранее [17, 18]. Для выделения одного препарата митохондрий сердца крысы (МСК) использовали 8 самцов линии Вистар массой 200–250 г. Суммарная масса сердечной ткани была около 10 г [18]. Было проведено три независимых эксперимента. Дыхание митохондрий в различных энергетических состояниях определяли полярографическим методом по изменению скоростей поглощения кислорода при 26°C. Детальное описание метода и состав сред приведены в работах [17, 18]. Концентрации Eu^{3+} и Ca^{2+} при изучении их эффектов на митохондрии выбирали по результатам ранее проведенных экспериментов с другими лантаноидами [17–19]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистической программы Microsoft Origin 6.0 с достоверностью $p < 0.05$. Достоверность различий между выборками определялась с помощью парного t-критерия Стьюдента в опытах с митохондриями и непарного в опытах по сокращению. В опытах по сокращению использовали относительные величины, соответствующие значения параметров в контроле принимались за 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Действие Eu^{3+} на спонтанные сокращения предсердий

В четырех опытах при температуре 20°C нами было обнаружено, что ионы Eu^{3+} в концентрации 0.2 мМ могут оказывать стимулирующее действие на спонтанные сердечные сокращения. Однако при концентрации 1 мМ Eu^{3+} всегда вызывал отрицательный инотропный и хронотропный эффекты (рис. 1). Ранее нами был описан слабый ингибирующий эффект 0.2 мМ Eu^{3+} на сердечные сокращения при температуре 12°C. Однако и тогда в двух экспериментах из шести наблюдалась стимуляция сокращений [19]. Возможно, при низких температурах стимулирующий эффект низких концентраций Eu^{3+} проявляется с задержкой. Поэтому в данном исследовании мы используем температуру 20°C.

Феномен стимулирования спонтанных сокращений ионами Eu^{3+} в наибольшей степени проявлялся в отношении двух параметров: силы максимального сокращения (F_{max} , мН) и максимальной скорости нарастания силы сокращения (V_{max} , мН/с) (табл. 1).

Стимулирующий эффект ионов Eu^{3+} проявлялся в значительном увеличении амплитуды и скорости нарастания спонтанных сокращений предсердий, инкубируемых в среде с 0.2 мМ Eu^{3+} (рис. 1, табл. 1). На рис. 1б показана форма одиночных сокращений в контроле и при аппликации разных концентраций Eu^{3+} . Из представленных на рис. 1б данных видно, что амплитуда одиночного сокращения мышечного препарата в среде с 0.2 мМ Eu^{3+} почти в два раза выше, чем в контроле. После реаппликации 1 мМ Eu^{3+} положительные хроно- и инотропные эффекты 0.2 мМ Eu^{3+} подавлялись, как видно

из экспериментальных данных, представленных на рис. 1а.

Таким образом, ионы Eu^{3+} при концентрации 0.2 мМ могут оказывать стимулирующее действие на сердечные сокращения. Чтобы выяснить, насколько эти сокращения устойчивы к ингибиторам дыхания митохондрий, мы использовали азид натрия (NaN_3) – ингибитор 4-го митохондриального комплекса. На рис. 2 представлены данные, свидетельствующие об ингибирующем влиянии 1 мМ NaN_3 на сердечные сокращения в контроле и через 20 мин после отмывания предсердия от 0.2 мМ Eu^{3+} .

Представленные на рис. 2 результаты демонстрируют ингибирующий эффект 1 мМ NaN_3 на параметры мышечного сокращения. Аппликация 5 мМ NaN_3 вызывала в наших условиях необратимое подавление сокращений и последующую контрактуру предсердий. Как видно из рис. 2, аппликация 0.2 мМ Eu^{3+} увеличивала устойчивость

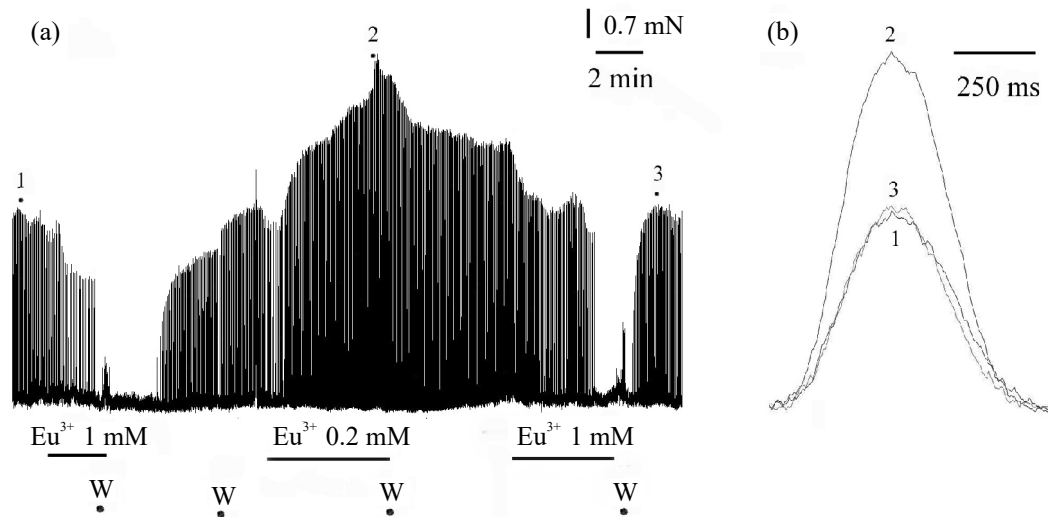


Рис. 1. Эффект двух различных концентраций Eu^{3+} (0.2 мМ и 1 мМ) на сокращения предсердий лягушки при температуре омывающего раствора 20°C. (а) – показана полная схема опыта; (б) – одиночные сокращения, соответствующие сокращениям, помеченными черными кружками на полной схеме опыта. W – отмывание предсердий от Eu^{3+} . Концентрации Eu^{3+} и продолжительность инкубации с Eu^{3+} помечены горизонтальной линией под сокращениями. Горизонтальными метками вверху справа показано время, мин (а), миллисекунды (б). Сила, развиваемая предсердиями, откалибрована вертикальной меткой миллиНьютоны (mN).

Таблица 1. Эффекты 0.2 мМ Eu^{3+} на сокращения предсердий *Rana ridibunda* при температуре омывающего раствора 20°C

Концентрация Eu^{3+} , мМ	Hz, %	F_{max} , %	V_{max} , %	t, %	$t_{1/2\text{rel}}$, %
0.2 (n = 4)	102 ± 7	171 ± 22 *	191 ± 19 *	95 ± 2	98 ± 7

Примечание: Hz – частота спонтанных сокращений; F_{max} – амплитуда спонтанных сокращений; V_{max} – максимальная скорость нарастания силы одиночных сокращений; t – время, необходимое мышце для достижения максимальной силы сокращения; $t_{1/2\text{rel}}$ – время полурасслабления. Соответствующие значения параметров в контроле, в физиологическом растворе без Eu^{3+} , приняты за 100 %. Количество независимых экспериментов (n) равно 4. Достоверность отличия от контроля: * $p < 0.05$ (непарный t-критерий).

сердечных сокращений к токсическому действию 1 мМ NaN_3 . Так, при аппликации 1 мМ NaN_3 в четырех независимых экспериментах, амплитуда спонтанных сокращений в контроле уменьшалась больше, чем в опыте после воздействия 0.2 мМ Eu^{3+} ($50 \pm 4\%$, $n = 4$, контроль vs. $27 \pm 3\%$ $n = 4$, 0.2 мМ Eu^{3+} , $p < 0.01$, непарный t -тест) (рис. 2). Аналогичный эффект наблюдался в отношении $V_{\max}$. В контроле, в растворе Рингера с 1 мМ NaN_3 , $V_{\max}$ уменьшалась на $42 \pm 6\%$ ($n = 4$), а после воздействия 0.2 мМ Eu^{3+} всего на $21 \pm 1\%$ ($n = 4$, $p < 0.05$, непарный t -тест). Таким образом, помимо потенцирования сердечных сокращений, аппликация 0.2 мМ Eu^{3+} увеличивает устойчивость сердечных сокращений к влиянию азидата натрия — ингибитора митохондриального дыхания.

Для дальнейшего изучения механизма действия Eu^{3+} на сердечные клетки и непосредственно на энергетическую функцию мы изучали влияние Eu^{3+}

на дыхание изолированных митохондрий сердца крысы (рис. 3).

На рис. 3 видно, что дыхание митохондрий сердца крысы, энергизованных субстратами 1-го (G+M) или 2-го (Succ) дыхательных комплексов, в состоянии 3 (субстрат и АДФ в среде) или в состоянии $3\text{P}_{\text{ДНФ}}$ (в присутствии разобщителя 2,4-динитрофенола) практически не изменялось в опытах с Eu^{3+} . При этом, дыхание митохондрий в этих состояниях заметно уменьшалось в аналогичных экспериментах с нагруженными кальцием митохондриями, независимо от наличия в среде Eu^{3+} (рис. 3). Минимальный эффект Ca^{2+} и Eu^{3+} наблюдался для энергизованных сукцинатом митохондрий в опытах с ДНФ (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В подавляющем числе работ, начиная с самых первых, отмечается негативное влияние лантано-

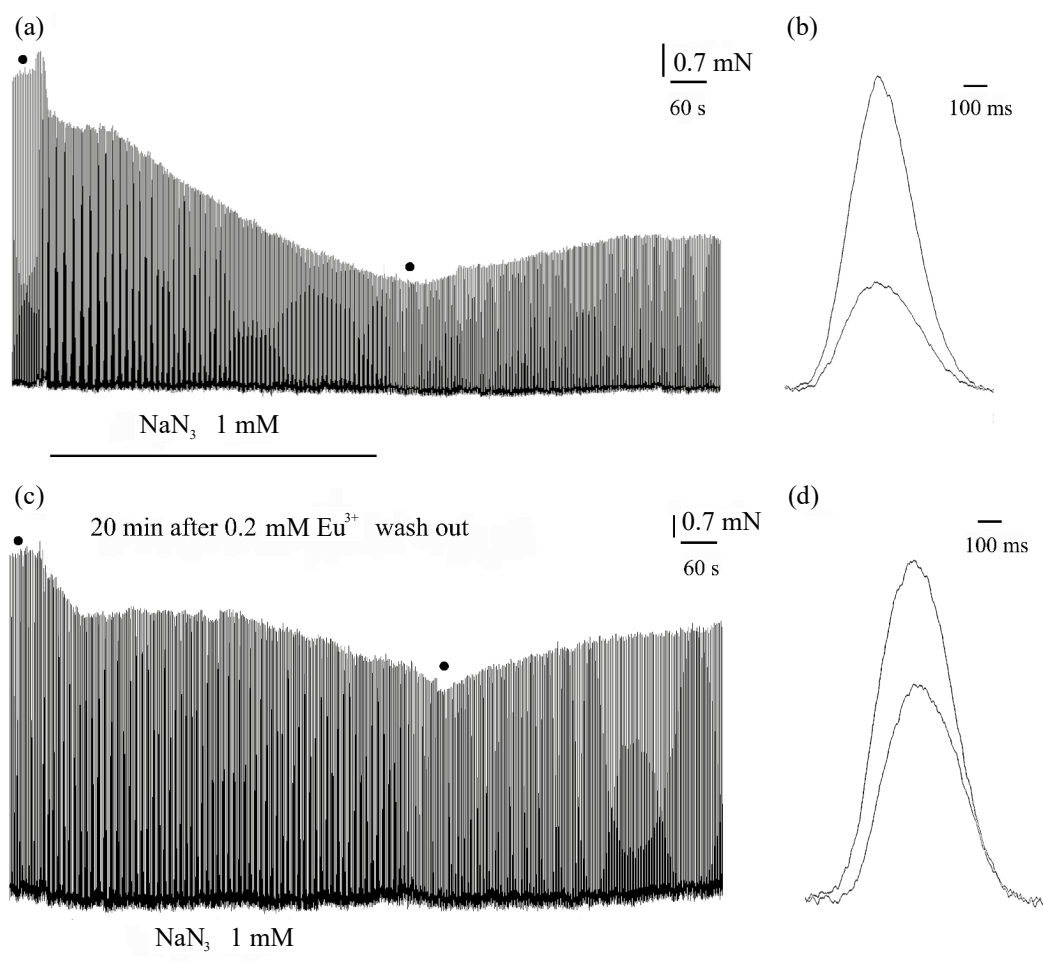


Рис. 2. Влияние NaN_3 на сокращения предсердий лягушки при температуре омывающего раствора 20°C . Показаны полные схемы опыта (a, c) и соответствующие им одиночные сокращения (b, d), помеченные черными кружками на полной схеме опыта. (a) — контрольное сокращение, (c) — сокращение после аппликации 0.2 мМ Eu^{3+} ; через 20 мин после отмыкания предсердия от 0.2 мМ Eu^{3+} добавили 1 мМ NaN_3 . Концентрация NaN_3 и продолжительность инкубации с NaN_3 помечены горизонтальной линией под сокращениями. Горизонтальными метками вверху справа показано время, секунды (a, c), миллисекунды (b, d). Сила, развиваемая предсердиями, откалибрована вертикальной меткой (mN).

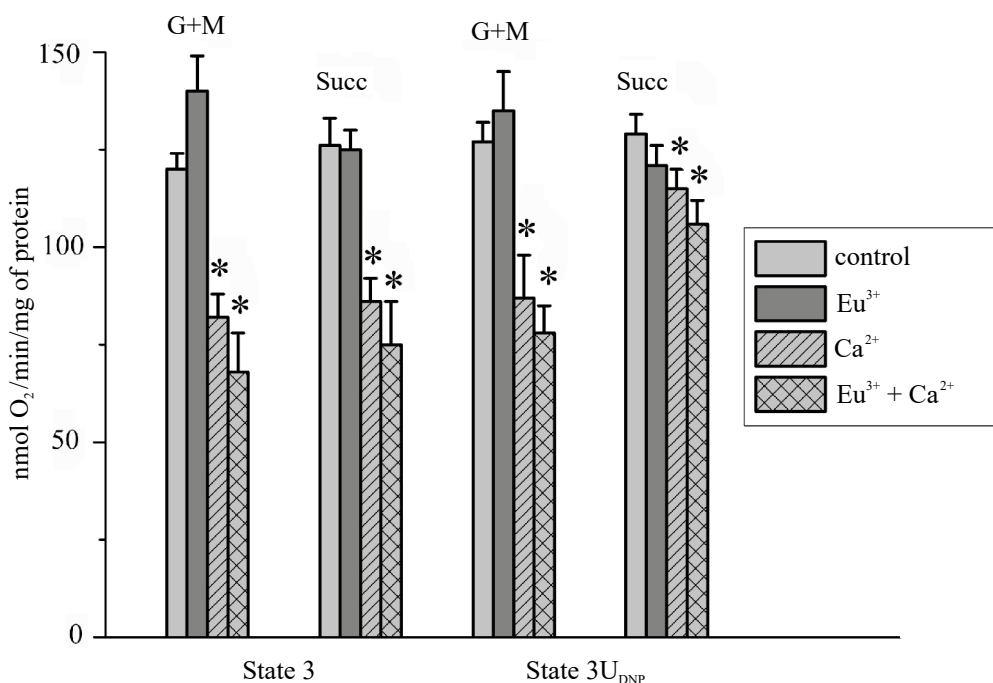


Рис. 3. Влияние Eu^{3+} и Ca^{2+} на скорость потребления кислорода митохондриями сердца крысы. Митохондрии (1 мг/мл белка) вносили в среду, содержащую 125 мМ KCl, 20 мМ Трис-МОРS (pH 7,3) и 3 мМ Трис- PO_4 , а также (где указано) 10 мМ глутамат с 2 мМ малат (G+M), 5 мМ сукцинат с 2 мМ ротенона (Succ), 50 мкМ Eu^{3+} (Eu^{3+}) и 200 мкМ Ca^{2+} (Ca^{2+}). По оси ординат отмечены скорости потребления кислорода (нмоль O_2 /мин/мг белка) в состоянии 3 и состоянии $3\text{P}_{\text{ДНФ}}$. Для индукции состояния 3 и состояния $3\text{P}_{\text{ДНФ}}$ в среду, содержащую энергизованные митохондрии сердца крысы, последовательно добавляли вещества до концентраций 130 мкМ АДФ и 30 мкМ ДНФ. Обозначениями под осью абсцисс показаны состояние 3 (State 3) и состояние $3\text{P}_{\text{ДНФ}}$ (State 3U_{DNP}). Звездочками отмечены достоверные отличия от контроля, опыты без Eu^{3+} и Ca^{2+} ($p < 0.05$, парный t-тест). Представлены средние значения результатов для трех независимых экспериментов.

идов на мышечные сокращения. Ингибирующее действие лантана объясняется тем, что он может блокировать Ca^{2+} каналы, препятствуя входу Ca^{2+} в клетку [26, 27], ингибировать как Ca^{2+} -АТФазу плазматической мембраны [28, 29], так и Ca^{2+} -АТФазу саркоплазматического ретикулума (СР) [30], а также работу $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника (NCX) [31, 32]. Лантан способен проникать внутрь клетки [29], например, через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник [29], замещать Ca^{2+} во внутриклеточных компартментах и снижать концентрацию Ca^{2+} внутри клетки [33–35]. При изучении механизмов влияния лантаноидов на мышечные структуры было установлено, что основными мишенями лантаноидов являются NCX [31, 32], Ca -АТ-Фазы [20, 30] и рианодиновые рецепторы (RyR) [21, 24]. Однако ответ сердечной мышцы на аппликацию лантаноидов зависит не только от свойств редкоземельного металла и силы его связывания с ферментом, в частности с Ca^{2+} -АТФазой или с сайтом связывания в каналобразующем белке, но и от его действующей концентрации, что определяет характер влияния редкоземельного металла на сокращение. Существует ограниченное число работ, в которых отмечены стимулирующие эффекты малых концентраций лантаноидов на мышцу. Так, La^{3+} в концентрациях 0.05–0.3 мМ до-

зо-независимо потенцировал одиночное сокращение скелетных мышц. Было показано увеличение амплитуды, скорости развития и времени релаксации одиночного сокращения скелетного мышечного волокна лягушки [36]. Однако аппликация высоких концентраций лантана (больше 0.5 мМ) приводила к потере возбудимости и ингибированию сокращения скелетных мышц [36]. Авторы предполагают, что этот эффект связан с синергизмом в действии ионов лантана и сходного по размерам и свойствам ионов кальция, в связи с чем ионы La^{3+} могут замещать Ca^{2+} в процессе сокращения, связываясь с теми же регуляторными сайтами, что и кальций [36]. Установлено, что La^{3+} в концентрации 1 мМ усиливал безнатриевую контрактуру сердечных клеток цыпленка [22]. Причем это усиление было обусловлено увеличением высвобождения внутриклеточного Ca^{2+} из СР и нарушением кальциевого барьера плазматической мембраны [22]. В работе других авторов было показано, что La^{3+} и Gd^{3+} в концентрациях 0.1–0.2 мМ ингибируют сердечные сокращения, однако при отмывании лантаноидов отмечалось необычное усиление одиночных сердечных сокращений [23]. Причем данный эффект проявлялся в большей степени в сердечной мышце лягушки по сравнению с таковым в сердце тепло-

кровных и мог наблюдаться длительное время [23]. Авторы объясняют этот эффект действием лантаноидов на плазматическую мембрану клетки, в частности, ингибированием работы NCX [23]. Недавно было показано, что лантаноиды при малых концентрациях могут действовать как агонисты Ca^{2+} каналов, в том числе и рианодиновых рецепторов [21, 24]. Так было отмечено, что при низкой концентрации кальция Eu^{3+} активировал RyR2 , а при высокой — блокировал [21, 24].

Представленные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что Eu^{3+} в низкой концентрации может стимулировать сердечные сокращения. При стимуляции сокращений при малых концентрациях Eu^{3+} мы наблюдали положительный инотропный эффект (табл. 1), который мы объясняем синергизмом в действии Ca^{2+} и Eu^{3+} и возможной стимуляцией Ca^{2+} -зависимых процессов в кардиомиоцитах (электрохимического сопряжения). На рисунке 1 видно, что после аппликации 0.2 мМ Eu^{3+} за ранним падением амплитуды следует значительное увеличение силы сокращений. Аналогичный эффект наблюдался при аппликации трехвалентного алюминия (3.75 мМ) при электрической стимуляции предсердий лягушки [37]. Потенциацию сокращения авторы объясняют увеличением высвобождения Ca^{2+} из СР под влиянием алюминия, поскольку кофеин, опустошая СР, ингибировал потенциацию [37]. Вполне вероятно, что при воздействии низких концентраций Eu^{3+} также происходит увеличение высвобождения Ca^{2+} из СР кардиомиоцитов при каждом акте сокращения, возможно, за счет стимуляции Eu^{3+} RyR2 .

La^{3+} уже в низких концентрациях ингибирует Ca^{2+} -АТФазу плазматической мембраны [28, 29], что также может способствовать медленному увеличению концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , который начинает закачиваться в СР. Однако на Ca^{2+} -АТФазу СР в наших экспериментах низкие концентрации Eu^{3+} практически не влияли, поскольку время полурелаксации одиночного сокращения менялось незначительно. С помощью методов электронной микроскопии было установлено, что лантан вытесняет кальций преимущественно из сарколеммальных участков и Ca^{2+} перераспределяется в СР [38]. Не исключено, что в наших экспериментах с Eu^{3+} происходило аналогичное перераспределение Ca^{2+} в СР. Лантаноиды также могут эффективно ингибировать NCX [31, 32], который является доминирующим механизмом оттока кальция из кардиомиоцитов [39]. NCX играет важную роль в регуляции гомеостаза кальция, влияя на процессы его депонирования, в частности, в СР [39]. Поэтому NCX оказывает огромное влияние на сократимость сердечной мышцы [39]. Не исключено, что небольшие концентрации Eu^{3+} в наших экспериментах начи-

нают ингибировать работу NCX, что приводит к постепенному увеличению кальция в СР и стимуляции сокращений.

При высоких концентрациях лантаноидов происходит значительное блокирование Ca^{2+} -зависимых процессов в сердечных клетках и, как следствие, ингибирование сердечных сокращений [17–19, 34, 35]. На различных биологических моделях показано, что лантаноиды обладают низкой токсичностью [14], но в высоких концентрациях могут замещать Ca^{2+} и тем самым снижать показатели сократимости сердечной мышцы [17–19]. Это связано, главным образом, с их блокирующим действием на потенциал-управляемые Ca^{2+} -каналы кардиомиоцитов [26, 27].

В ходе данной работы мы также оценили влияние Eu^{3+} на функцию митохондрий. В опытах на изолированных из сердца крысы митохондриях было показано, что дыхательная функция митохондрий (скорость поглощения кислорода фосфорилируемыми энергизованными митохондриями, находящимися в состоянии 3 по Чансу) в присутствии низких концентраций Eu^{3+} меняется незначительно и в нашей модели потенцирования/ингибирования сокращения влияние Eu^{3+} на митохондрии можно не учитывать.

В последние десятилетия спрос на редкоземельные элементы значительно вырос как в промышленности, медицине, так и в других сферах их применения. Как правило, РЗЭ в почве, воде и атмосфере содержатся в низких концентрациях, однако они могут накапливаться в окружающей среде, особенно в неблагополучных районах, где наблюдается техническое загрязнение РЗЭ [40]. Поэтому возможно медленное накопление этих элементов в окружающей среде и проявление их токсического действия на организм человека [40]. Механизмы и отдаленные эффекты токсического действия лантаноидов изучены пока недостаточно.

В своей работе мы показали, что в низкой концентрации Eu^{3+} может стимулировать сердечные сокращения за счет перераспределения внутриклеточного Ca^{2+} и в этом случае увеличивать устойчивость сердечной мышцы к влиянию азида натрия — ингибитора митохондриального дыхания. При этом, как нами показано, Eu^{3+} не оказывает значительного токсического действия на дыхание митохондрий *in vitro*. Eu^{3+} в миллимолярных концентрациях может блокировать первоначальный вход Ca^{2+} в сердечную клетку, тем самым нарушая систему электро-механического сопряжения в миокарде [19]. Полученные данные важны для понимания механизмов действия лантаноидов на сердечную мышцу и могут быть полезны в разработке заместительной терапии, а также для исследования Ca^{2+} -сенсоров и Ca^{2+} -каналов в качестве диагностических зондов.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

С.М.К. осуществлял планирование, сбор и обработку данных, исследовал дыхание митохондрий и участвовал в редактировании статьи. К.В.С. исследовал сократительные характеристики препаратов сердечной мышцы лягушки *Rana ridibunda* и участвовал в написании соответствующих разделов и в редактировании статьи. И.В.Ш. осуществляла литературный поиск, участвовала в анализе полученных данных и в написании статьи. В.П.Н. осуществлял общее руководство работы над статьей и участвовал в ее редактировании.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям ИЭФБ РАН по уходу и использованию лабораторных животных протоколы #6-5/2022 и # 6-6/2022 от 23.06.2022 г.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в ИЭФБ РАН с использованием средств государственного бюджета по госзаданию № 075-00264-24-00.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят И.В. Брайловскую за помощь при полярографическом измерении скоростей поглощения кислорода митохондриями.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Darghal N, Garnier-Suillerot A, Bouchemal N, Gras G, Geraud CF, Salerno M (2010) Accumulation of Eu^{3+} chelates in cells expressing or not P-glycoprotein: implications for blood-brain barrier crossing. *J Inorg Biochem* 104:47–54. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.09.026>
2. Chen YC, Huang SC, Wang YK, Liu YT, Wu TK, Chen TM (2013) Ligand-functionalization of BPEI-coated YVO₄:Bi³⁺, Eu³⁺ nanophosphors for tumor-cell-targeted imaging applications. *Chem Asian J* 8:2652–2659. <https://doi.org/10.1002/asia.201300570>
3. Jin Y, Chen S, Duan J, Jia G, Zhang J (2015) Europium-doped Gd₂O₃ nanotubes cause the necrosis of primary mouse bone marrow stromal cells through lysosome and mitochondrion damage. *J Inorg Biochem* 146:28–36. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.02.006>
4. Wu L, Yang F, Xue Y, Gu R, Liu H, Xia D, Liu Y (2023) The biological functions of europium-containing biomaterials: A systematic review. *Mater Today Bio* 19:100595. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100595>
5. Chen S, Zhang C, Jia G, Duan J, Wang S, Zhang J (2014) Size-dependent cytotoxicity of europium doped NaYF₄ nanoparticles in endothelial cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 43:330–342. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.07.029>
6. Alpturk O, Rusin O, Fakayode SO, Wang W, Escobedo JO, Warner IM, Crowe WE, Krall V, Pruet JM, Strongin RM (2006) Lanthanide complexes as fluorescent indicators for neutral sugars and cancer biomarkers. *Proc Natl Acad USA* 103(26): 9756–9760. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603758103>
7. Londhe S, Patra CR (2022) Biomedical applications of europium hydroxide nanorods. *Nanomedicine (Lond)* 17:5–8. <https://doi.org/10.2217/nnm-2021-0351>
8. Wiatrak B, Sobierajska P, Szandruk-Bender M, Jawien P, Janeczko M, Dobrzynski M, Pistor P, Szlag A, Wiglusz RJ (2021) Nanohydroxyapatite as a Biomaterial for Peripheral Nerve Regeneration after Mechanical Damage-In Vitro Study. *Int J Mol Sci* 22:4454. <https://doi.org/10.3390/ijms22094454>
9. Alicka M, Sobierajska P, Kornicka K, Wiglusz RJ, Marycz K (2019) Lithium ions (Li⁺) and nanohydroxyapatite (nHAp) doped with Li⁺ enhance expression of late osteogenic markers in adipose-derived stem cells. Potential theranostic application of nHAp doped with Li⁺ and co-doped with europium (III) and samarium (III) ions. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 99:1257–1273. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.073>
10. Smith DG, Pal R, Parker D (2012) Measuring equilibrium bicarbonate concentrations directly in cellular mitochondria and in human serum using europium/terbium emission intensity ratios. *Chemistry* 18:11604–11613. <https://doi.org/10.1002/chem.201201738>
11. Sun J, Song B, Ye Z, Yuan J (2015) Mitochondria Targetable Time-Gated Luminescence Probe for Singlet Oxygen Based on a β -Diketone-Europium Complex. *Inorg Chem* 54:11660–11668. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b02458>
12. Liu X, Tang Z, Song B, Ma H, Yuan J (2017) A mitochondria-targeting time-gated luminescence probe for hypochlorous acid based on a europium complex. *J Mater Chem B* 5:2849–2855. <https://doi.org/10.1039/c6tb02991d>
13. Mailhot R, Traviss-Pollard T, Pal R, Butler SJ (2018) Cationic Europium Complexes for Visualizing Fluctuations in Mitochondrial ATP Levels in Living Cells. *Chemistry* 24:10745–10755. <https://doi.org/10.1002/chem.201801008>
14. Hirano S, Suzuki KT (1996) Exposure, metabolism, and toxicity of rare earths and related compounds. *Environ Health Perspect.* 104(Suppl 1):85–95. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104s185>
15. Pagano G, Aliberti F, Guida M, Oral R, Siciliano A, Trifuoggi M, Tommasi F (2015) Rare earth elements in human and animal health: State of art and research priorities. *Environ Res* 142:215–220. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.06.039>

16. *Das T, Sharma A, Talukder G* (1988) Effects of lanthanum in cellular systems. A review. *Biol Trace Elem Res* 18:201–228.
<https://doi.org/10.1007/BF02917504>
17. *Korotkov SM, Sobol KV, Shemarova IV, Furaev VV, Shumakov AR, Nesterov VP* (2016) A comparative study of the effects of Pr^{3+} and La^{3+} ions on calcium dependent processes in frog cardiac muscle and rat heart mitochondria. *Biophysics* 61:733–740.
<https://doi.org/10.1134/S0006350916050122>
18. *Коротков СМ, Соболев КВ, Шемарова ИВ, Новожилов АВ, Никитина ЕР, Нестеров ВП* (2020). Влияние Gd^{3+} и Ca^{2+} на сократимость сердечной мышцы лягушки и дыхание, набухание и потенциал внутренней мембраны митохондрий сердца крысы. *ЖЭБФ* 56:99–106. [*Korotkov SM, Sobol KV, Shemarova IV, Novozhilov AV, Nikitina ER, Nesterov VP* (2020) Effects of Gd^{3+} and Ca^{2+} on frog heart muscle contractility and respiration, swelling and inner membrane potential of rat heart mitochondria. *J Evol Biochem Phys* 56: 99–106. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0044452920060054>
19. *Korotkov SM, Sobol KV, Novozhilov AV, Nesterov VP* (2022) Effect of Eu^{3+} on Calcium-Dependent Processes in Vertebrate Myocardium. *J Evol Biochem Phys* 58(Suppl 1): S52–S62.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022070067>
20. *Joshi NB, Shamoo AE* (1987) Binding of Eu^{3+} to cardiac sarcoplasmic reticulum (Ca^{2+} + Mg^{2+})-ATPase-laser excited Eu^{3+} spectroscopic studies. *Biophys J* 51:185–191.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(87\)83324-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(87)83324-6).
21. *Sárközi S, Komáromi I, Jóna I, Almássi J* (2017) Lanthanides Report Calcium Sensor in the Vestibule of Ryanodine Receptor. *Biophys J* 112:2127–2137.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.03.023>
22. *Mead RH, Clusin WT* (1985) Paradoxical electromechanical effect of lanthanum ions in cardiac muscle cells. *Biophys J* 48:695–700.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(85\)83827-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(85)83827-3)
23. *Kawata H, Ohba M, Hatae J, Kishi M* (1983) Paradoxical after-potential of the myocardial contractility by lanthanum. *Jpn J Physiol* 33:1–17.
<https://doi.org/10.2170/jjphysiol.33.1>
24. *Magyar ZÉ, Bauer J, Bauerová-Hlinková V, Jóna I, Gaburjakova J, Gaburjakova M, Almássi J* (2023) Eu^{3+} detects two functionally distinct luminal Ca^{2+} binding sites in ryanodine receptors. *Biophys J* 122: 3516–3531. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2023.07.029>
25. *Rumberger E, Reichel H* (1972) The force-frequency relationship: a comparative study between warm- and cold-blooded animals. *Pflug Arch Eur J Physiol* 332: 206–217.
26. *Hatae J* (1982) Effects of lanthanum on the electrical and mechanical activities of frog ventricular muscle. *Jpn J Physiol* 32:609–625.
<https://doi.org/10.2170/jjphysiol.32.609>
27. *Nathan RD, Kanai K, Clark RB, Giles W* (1988) Selective block of calcium current by lanthanum in single bullfrog atrial cells. *J Gen Physiol* 91:549–572. <https://doi.org/10.1085/jgp.91.4.549>
28. *Shimizu H, Borin ML, Blaustein MP* (1997) Use of La^{3+} to distinguish activity of the plasmalemmal Ca^{2+} pump from $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange in arterial myocytes. *Cell calcium* 21:31–41.
[https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(97\)90094-4](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(97)90094-4)
29. *Peeters GA, Kohmoto O, Barry WH* (1989) Detection of La^{3+} influx in ventricular cells by indo-1 fluorescence. *Am J Physiol* 256:C351–C357.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1989.256.2.C351>
30. *Fujimori T, Jencks WP* (1990) Lanthanum inhibits steady-state turnover of the sarcoplasmic reticulum calcium ATPase by replacing magnesium as the catalytic ion. *J Biol Chem* 265: 16262–16270.
31. *Zhang YH, Hancox JC* (2000) Gadolinium inhibits Na^{+} - Ca^{2+} exchanger current in guinea-pig isolated ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 130:485–488.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703353>
32. *Trospers TL, Philipson KD* (1983) Effects of divalent and trivalent cations on Na^{+} - Ca^{2+} exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochim Biophys Acta* 731:63–68.
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(83\)90398-x](https://doi.org/10.1016/0005-2736(83)90398-x)
33. *Zha X, Morrison GH* (1995) Ion microscopy evidence that La^{3+} releases Ca^{2+} from Golgi complex in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol* 269(4 Pt 1):C923–C928.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.269.4.C923>
34. *Langer GA, Frank JS* (1972) Lanthanum in heart cell culture. Effect on calcium exchange correlated with its localization. *J Cell Biol* 54:441–455.
<https://doi.org/10.1083/jcb.54.3.441>
35. *Sanborn WG, Langer GA* (1970) Specific uncoupling of excitation and contraction in mammalian cardiac tissue by lanthanum. *J Gen Physiol* 56:191–217.
<https://doi.org/10.1085/jgp.56.2.191>
36. *Andersson KE, Edman KA* (1974) Effects of lanthanum on the coupling between membrane excitation and contraction of isolated frog muscle fibres. *Acta Physiol Scand* 90:113–123.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1974.tb05569.x>
37. *Meiri H, Shimoni Y* (1991) Effects of aluminium on electrical and mechanical properties of frog atrial muscle. *Br J Pharmacol* 102:483–491.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1991.tb12198.x>
38. *Miller TW, Tormey JM* (1993) Calcium displacement by lanthanum in subcellular compartments of rat ventricular myocytes: characterisation by electron probe microanalysis. *Cardiovasc Res* 27:2106–2112.
<https://doi.org/10.1093/cvr/27.12.2106>
39. *Ottolia M, Torres N, Bridge JH, Philipson KD, Goldhaber JJ* (2013) Na/Ca exchange and contraction of the heart. *J Mol Cell Cardiol* 61:28–33.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.06.001>
40. *Turra C* (2018) Sustainability of rare earth elements chain: from production to food – a review. *Int J Environ Health Res* 28:23–42.
<https://doi.org/10.1080/09603123.2017.1415307>

STIMULATING EFFECT OF LOW CONCENTRATIONS OF Eu^{3+} ON SPONTANEOUS CARDIAC CONTRACTIONS

K. V. Sobol^{a, #}, S. M. Korotkov^a, I. V. Shemarova^a and V. P. Nesterov^a

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: peep9@yandex.ru*

The negative cumulative effects of lanthanides on the human body are well known; they are associated mainly with the toxic effects of rare earth metals (REE) on muscle tissue. However, the effects of low concentrations of these metals on muscle are less understood. In our work, we found out an unusual stimulating effect of low concentrations of europium (Eu^{3+}) on spontaneous contractions of atria of a frog. The purpose of this study was to study the stimulating effect of Eu^{3+} on the contraction of atria, both normally and in the presence of the mitochondrial respiration inhibitor sodium azide (NaN_3). The study was carried out using two experimental models: muscle preparations obtained from isolated atria of the heart of the frog *Rana ridibunda* and mitochondria isolated from the heart of male Wistar rats. As a result of the studies, it was established that Eu^{3+} in a concentration of 0.2 mM, at a temperature of 20°C, potentiated contractions of the frog atria in situ; both the amplitude and the maximum rate of increase of single spontaneous contractions increased. Spontaneous atrial contractions became more resistant to the effects of 1 mM NaN_3 . At the same time, Eu^{3+} did not affect the respiration of energized mitochondria (activated by ADP (state 3) or 2,4-dinitrophenol (state 3_{U_{DNP}})). The intensity of this respiration decreased after the calcium load of mitochondria, regardless of the presence of Eu^{3+} in the medium. Thus, Eu^{3+} ions at low concentrations (0.2 mM) stimulated atrial contraction and had a positive inotropic effect. The stimulating effect of low concentrations of Eu^{3+} on the heart can be explained by the synergism in the action of Ca^{2+} and Eu^{3+} on calcium channels, stimulation of Ca^{2+} -dependent processes in cardiomyocytes and the absence of a negative effect on mitochondrial respiration.

Keywords: lanthanides, rare earth elements, myocardium, inotropic effect, contraction, Eu^{3+} , Ca^{2+} , mitochondrial respiration