



УДК 612.172:615.711+597.82-08

РАБОТА ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА В УСЛОВИЯХ СТИМУЛЯЦИИ АДРЕНАЛИНОМ И АППЛИКАЦИИ АНТИГИПОКСАНТА ПQ1983**THE ACTIVITY ISOLATED HEART UNDER STIMULATION OF ADRENALINE AND APPLYING ANTIHYPOXANTS PQ1983****О.Е. Шалаева, Д.В. Сосин, А.В. Евсеев, В.А. Правдивцев
O.E. Shalaeva, D.V. Sosin, A.V. Evseyev, V.A. Pravdivtsev**

ГБОУ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия» Минздрава России.
214019, г. Смоленск, ул. Крупской, д. 28
Smolensk State Medical Academy
214019, Smolensk, Krupskaya Street, 28

e-mail: shalaevalga1@rambler.ru

Резюме. В статье представлены данные о динамике биоимпеданса изолированного нефиксированного сердца лягушки, стимулированного адреналином в условиях аппликации на миокард селенсодержащего металлокомплексного соединения пQ1983. Регистрацию импедансокардиограммы и электрокардиограммы изолированного сердца осуществляли *ex vivo* по собственной методике с использованием компьютерной реографической установки «Реоспектр» («Нейрософт», Россия).

Установлено, что *ex vivo* вещество пQ1983 обладает мягким прямым кардиодепрессивным действием, которое преимущественно проявляется снижением частотных характеристик работы сердечной мышцы. Применение металлокомплексного вещества пQ1983 значительно повышает устойчивость миокарда лягушки к адреналиновой стимуляции, пролонгируя его механическую и электрическую работу, что дополнило представления о механизмах реализации антигипоксического эффекта изученного соединения.

Summary. The article presents results of research on the dynamics of bioimpedance unfixed isolated frog heart, after stimulation by adrenaline and application to the myocardium selenium-containing metal complex substance пQ1983. Experiments were performed on 30 meadow winter frogs *Rana temporaria*, which previously divided into experimental (n = 15) and control (n = 15) groups. Registration impedance cardiogram and electrocardiogram isolated heart were performed *ex vivo* on its own procedure using computer rheographic installation "Reospekt" ("Neurosoft", Russia).

It has been established that the antihypoxia substance пQ1983 has a mild cardiodepressive direct action, which mainly manifested by reduced frequency characteristics of the heart muscle. Application *ex vivo* of the substance пQ1983 in a concentration of 0.01% significantly increases the stability the myocardium of the frog to adrenal stimulation, prolonging its mechanical and electrical activity that complemented the concepts of the mechanisms implementing antihypoxic effect of the compounds studied.

Ключевые слова: изолированное сердце, гипоксия, антигипоксикант, лягушка, биоимпедансометрия, электрокардиография.

Key words: isolated heart, hypoxia, antihypoxant, frog, electrocardiography, bioimpedance measuring.

Введение

Фармакотерапия гипоксии является актуальной проблемой практической медицины. Известно, что повышение резистентности организма к недостатку кислорода в окружающей среде может быть достигнуто с помощью химических соединений, относящихся к группе антигипоксикантов [Левченко и др., 2012; Новиков и др., 1998; Шевченко, 2000].

Установлено, что при остро формирующихся гипоксических состояниях экзогенной природы наиболее действенным методом фармакологической защиты является применение веществ, обладающих отчётливым сдерживающим влиянием на процессы образования и потребления энергии [Зарубина и др., 2004; Левченко и др., 2012; Шабанов и др., 2010]. Аналогичные влияния были обнаружены и у веществ металлокомплексной природы – пQ1969, пQ1104, пQ1983. На фоне действия перечисленных соединений и, в частности, селенсодержащего соединения пQ1983, кроме собственно антигипоксического действия, как правило, отмечают значительное замедление частоты сердечных сокращений (кардиодепрессивное действие), что, предположительно, способствует усилению комплексного защитного эффекта в случае формирования острого кислорододефицитного состояния [Новиков и др., 1998; Сороко и др., 2004].



Цель

Доказать наличие прямого кардиодепрессивного действия на миокард селенсодержащего металлокompлексного вещества $\pi Q1983$ в условиях полной изоляции сердца лягушки с помощью методов биоимпедансометрии и электрокардиографии.

Объекты и методы исследования

Опыты выполнены на 30 луговых зимних лягушках *Rana temporaria*. Предварительно лягушек делили на 2 группы – опытную ($n=15$) и контрольную ($n=15$). Изоляцию сердечной мышцы выполняли под лёгким эфирным наркозом, после чего сердце помещали в чашку Петри, содержащую 20 мл раствора Рингера для холоднокровных животных, температура раствора на протяжении опыта сохранялась на уровне 18-20°C. Регистрацию импеданскардиограммы (ИКГ) и электрокардиограммы (ЭКГ) изолированного сердца осуществляли *ex vivo* по собственной методике [Сосин и др., 2013].

В ходе опытов с помощью компьютерной реографической установки «Реоспектр» («Нейрософт», Россия) непрерывно измеряли полное сопротивление миокарда – импеданс (биоимпеданс), который, как известно, изменяется в зависимости от смены фаз сердечной деятельности. За динамикой биоимпеданса сердечной мышцы на протяжении кардиоцикла наблюдали на мониторе компьютера в процессе регистрации ИКГ – кривой, в значительной мере отражающей механическую активность изолированного нефиксированного сердца лягушки. Электроды для регистрации ИКГ располагали следующим образом: 1-й электрод с контактной плоскостью, представленной тонкой серебряной пластинкой (толщина 0.1 мм, площадь 2.5×2.5 мм), располагали на передней поверхности сердца в зоне фиброзного кольца, отделяющего предсердия от желудочков; 2-й электрод погружали в раствор Рингера на некотором отдалении от сердца. «Амплитуду» сокращений сердца выражали в единицах сопротивления проходящему через миокард электрическому току (Ом). Одновременно регистрировали суммарную электрическую активность миокарда – ЭКГ. С этой целью пару соответствующих электродов располагали в растворе Рингера по обеим сторонам от сердца. Кривую ЭКГ также выводили на монитор компьютера.

Схема опыта. После изоляции сердца, размещения электродов для записи ИКГ и ЭКГ, на протяжении 15 мин. регистрировали его спонтанную работу. Стабилизация частоты сердечных сокращений обычно происходила через 10-12 мин. после изоляции. По истечении 15 мин. на сердца лягушек контрольной группы апплицировали по 3 капли 0.1% раствора адреналина гидрохлорида, который оказывал положительное влияние на работу миокарда по показателям частоты сокращений, их силы, скорости проведения возбуждения. На сердца лягушек опытной группы сразу после их помещения в раствор Рингера апплицировали по 3 капли 0.01% раствора вещества $\pi Q1983$, затем через 15 мин. дополнительно наносили по 3 капли 0.1% раствора адреналина гидрохлорида. Главной задачей опытов было установление длительности работы изолированного нефиксированного сердца лягушки в условиях адреналиновой стимуляции и аппликации вещества $\pi Q1983$.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакетов прикладных программ Microsoft Excel 2000 и Statistica 7. Для сопоставления значимости различий применяли непараметрический критерий Wilcoxon. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

Результаты исследования

Исходная частота сокращений изолированного нефиксированного сердца лягушки по данным ИКГ и ЭКГ составила 18.2 ± 3.6 кардиоциклов в минуту, в то время как «амплитуда» сокращений в среднем достигала 150.5 ± 23.4 Ом.

После аппликации 0.1% раствора адреналина гидрохлорида уже через 4 мин. частота следования кардиоциклов увеличивалась на 50-70% (положительный хронотропный эффект). Максимальную частоту наблюдали спустя 6-8 мин. после адреналиновой стимуляции. В частности, к 8-й мин. она достигала 45.4 ± 7.2 /мин, что в 2.5 раза превышало исходный показатель ($p < 0.05$). Вместе с тем, через 10-12 мин. после стимуляции частота следования кардиоциклов начинала плавно снижаться.

«Амплитуда» сердечных сокращений также фазно изменялась (рис. 1). Наибольший положительный инотропный эффект адреналина наблюдали спустя 4-5 мин. после его применения – величина волн ИКГ увеличивалась по сравнению с исходным состоянием на 126.6% и достигала 313.8 ± 48.6 Ом ($p < 0.01$). По завершении амплитудного пика статистически достоверное уменьшение размера волн в сравнении с их стартовым значением отмечали спустя 14-16 мин. после аппликации гормона. Незадолго до асистолии желудочка показатель уменьшался в среднем на 61% ($p < 0.05$), при этом, как правило, предсердия продолжали сокращаться ещё в течение 5-10 мин.

Параллельно изменениям хронотропного характера, на ЭКГ отмечали признаки повышения скорости проведения возбуждения по миокарду, что проявлялось укорочением сегмента PQ (положительное дромотропное действие). Максимальное укорочение с 0.22 ± 0.07 до 0.14 ± 0.04 сек. наблюдали через 6-8 мин. после адреналиновой стимуляции (34.4%, $p < 0.05$). Тем не менее, через

10-20 мин. после достижения пиковой частоты сердце останавливалось. Усреднение данных 15-ти опытов показало, что общая продолжительность работы сердец лягушек контрольной группы от момента аппликации 0.1% раствора адреналина гидрохлорида до полной остановки составила 27.7 ± 3.9 мин.

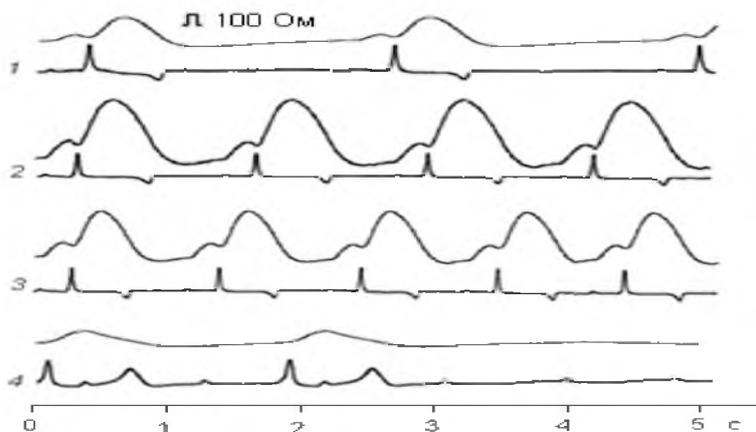


Рис. 1. Изменение частоты и «амплитуды» сокращений изолированного нефиксированного сердца лягушки после стимуляции миокарда 0.1% раствором адреналина гидрохлорида (контрольная группа). 1) исходная работа сердца; 2) работа сердца через 4 мин. после стимуляции; 3) работа сердца через 8 мин. после стимуляции; 4) работа сердца через 24 мин. после стимуляции

Changes in the frequency and "amplitude" contraction of the isolated unfixed heart of a frog after stimulation of the myocardium 0.1% solution of epinephrine hydrochloride (control group). 1) the original work of the heart; 2) heart function on 4 min. after stimulation; 3) heart function on 8 min. after stimulation; 4) The work of the heart on 24 min. after stimulation

Анализ данных ИКГ и ЭКГ в условиях аппликации вещества $\pi Q1983$ на изолированное нефиксированное сердце лягушки показывает, что изученное соединение обеспечивает мягкое негативное влияние на параметры механической и электрической работы изолированного сердца (рис. 2-2). В частности, через 2 мин. после нанесения исследуемого вещества отмечали значимое снижение частоты следования кардиоциклов с 20.4 ± 3.0 до 15.7 ± 2.4 ($p < 0.05$) в сочетании с увеличением их протяженности. При этом «амплитуда» сокращений и проводимость миокарда практически не изменялись. Реакция сердца после применения изученного металлокомплексного соединения на последующую аппликацию 0.1% раствора адреналина гидрохлорида, тем не менее, оставалась типичной и проявлялась хронотропным, инотропным и дромотропным эффектами положительной направленности (см. рис. 2-3, 2-4).

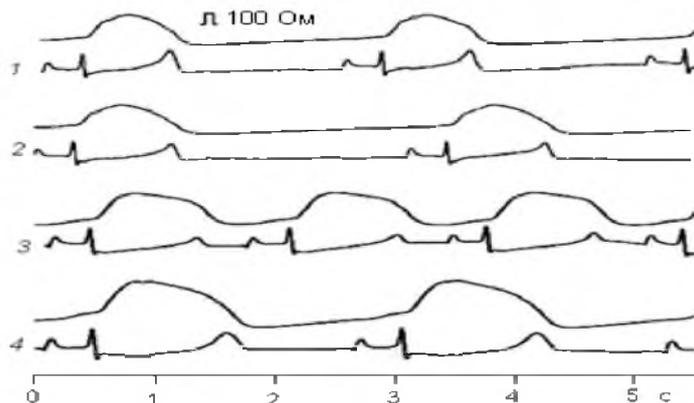


Рис. 2. Изменение частоты и «амплитуды» сокращений изолированного нефиксированного сердца лягушки после аппликации 0.01% раствора вещества $\pi Q1983$ с последующей стимуляцией миокарда 0.1% раствором адреналина гидрохлорида (опытная группа). 1) исходная работа сердца; 2) работа сердца после аппликации вещества $\pi Q1983$; 3) работа сердца через 5 мин. после стимуляции; 4) работа сердца через 7 мин. после стимуляции

Changes in the frequency and "amplitude" contraction of isolated frog heart unfixed after application of 0.01% solution of the substance $\pi Q1983$ with followed by stimulation of the myocardium 0.1% solution of epinephrine hydrochloride (experimental group). 1) the original work of the heart; 2) heart function after the application of substances $\pi Q1983$; 3) heart function on 5 minutes after stimulation; 4) heart function on 7 min. after stimulation

Как правило, первично отмечали прирост частоты сокращений. Через 4-5 мин. после стимуляции адреналином показатель достигал 32.8 ± 5.5 /мин, однако через 7-10 мин. от начала опыта частота следования кардиоциклов постепенно уменьшалась. Интересен тот факт, что на этом этапе



обычно наблюдали рост волн ИКГ, которые через 7-10 мин. достигали своего максимума 212.1 ± 30.9 Ом при стартовом значении 156.4 ± 26.2 Ом. В среднем наибольший прирост «амплитуды» составил 35.6% ($p < 0.05$). Кратковременный положительный дромотропный эффект отмечали лишь в 5-ти случаях из 15-ти.

Продолжение иллюстрации опыта (рис.3) демонстрирует, что ухудшение функционального состояния миокарда в условиях его защиты веществом $\pi Q1983$ наблюдается лишь спустя 20 мин. после стимуляции адреналином. На этом этапе отмечали уменьшение амплитуды сокращений и удлинение кардиоциклов (см. рис. 3-1, 3-2). При анализе ЭКГ в этот период выявлены нарушения в работе проводящей системы сердца, которые выражались преимущественно удлинением сегмента ST, а в отдельных случаях и деформацией зубца R.

На протяжении последующих 30-60 мин. опыта наблюдали постепенное ослабление сердечной деятельности, проявлявшееся снижением показателей сократительной активности желудочка. Результаты ЭКГ показали, что на завершающих этапах опыта работа сердца нередко была обусловлена активностью атриовентрикулярного узла. Смена водителя ритма подтверждалась исчезновением зубца P, замедлением частоты следования кардиоциклов, грубыми изменениями конфигурации комплекса QRS (см. рис. 3-3, 3-4).

Следует отметить, что исчезновение зубца P сопровождалось отсутствием на кривой ИКГ пресистолического зубца. Относительно позднее возникновение перечисленных нарушений, по видимому, могло явиться следствием прямого положительного метаболического эффекта на миокард изученного вещества в условиях нарастающей гипоксии-ишемии. В среднем, по результатам описанных опытов, механическая активность сердца, защищенного веществом $\pi Q1983$ и подвергнутого стимуляции адреналином, сохранялась на протяжении 67.5 ± 7.3 мин., что в 2.4 раза больше в сравнении с показателем контрольной группы ($p < 0.05$).

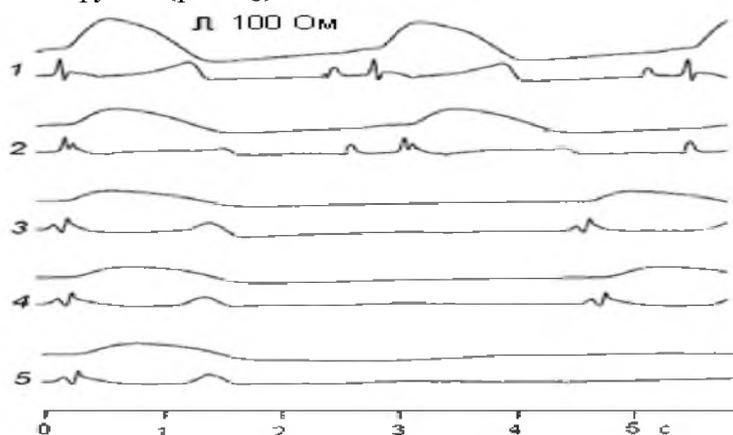


Рис. 3. Изменение частоты и «амплитуды» сокращений изолированного нефиксированного сердца лягушки после аппликации 0.01% раствора вещества $\pi Q1983$ с последующей стимуляцией миокарда 0.1% раствором адреналина гидрохлорида (продолжение): 1) работа сердца через 10 мин. после стимуляции; 2) работа сердца через 20 мин. после стимуляции; 3) работа сердца через 30 мин. после стимуляции; 4) работа сердца через 40 мин. после стимуляции; 5) работа сердца через 70 мин. после стимуляции

Change the frequency and "amplitude" contraction of the isolated frog heart unfixed after the application of 0.01% solution of the substance $\pi Q1983$ followed by stimulation of the myocardium 0.1% solution of epinephrine hydrochloride (continued): 1) the work of the heart on 10 min. after stimulation; 2) the work of the heart on 20 min. after stimulation;

3) The work of the heart on 30 min. after stimulation; 4) The work of the heart on 40 min. after stimulation;

5) The work of the heart on 70 min. after stimulation

Обсуждение результатов

На основании проведенных опытов, выполненных на изолированном нефиксированном сердце лягушки *ex vivo*, установлено, что вещество $\pi Q1983$ обладает мягким прямым кардиодепрессивным действием, которое преимущественно проявляется снижением частотных характеристик работы сердечной мышцы. Было установлено, что в присутствии вещества $\pi Q1983$ реакция миокарда на аппликацию 0.1% раствора адреналина гидрохлорида характеризуется более чем 2-кратным увеличением времени его удовлетворительной функциональной активности.

В ходе проведенного исследования выявлено, что изменения биоимпеданса изолированного сердца полностью совпадают с механическими проявлениями его активности. Благодаря возможностям регистрации ИКГ, оценка влияний кардиотропных соединений на параметры электромеханического сопряжения миокарда приобрела большую объективность, т.к. помимо электрических характеристик были проанализированы и изменения механических показателей, являющихся, как известно, более лабильными в плане реализации действия соответствующих фармакологических агентов [Зарубина, Шабанов, 2004; Левченкова и др., 2012; Шабанов и др., 2010].



Результаты эксперимента показали, что на аппликацию 0.1% раствора адреналина гидрохлорида (контрольная группа) миокард отвечал типичными реакциями в виде усиления функциональной активности – положительные хронотропные, инотропные и дромотропные эффекты. Необходимость адреналиновой стимуляции была обусловлена тем, что интактное изолированное сердце лягушки может сокращаться в растворе Рингера часами (до суток). В этом случае вариабельность данных значительно увеличивается. В свою очередь, применение адреналина *ex vivo* в несколько раз сокращало время механической работы сердца и выравнивало индивидуальные показатели активности. Так, в предложенных условиях проведения опытов, асистолию сердец контрольной группе констатировали спустя 27.7 ± 3.9 мин.

Воздействие на миокард вещества $\pi Q1983$ в виде 0.01 раствора (опытная группа) сопровождалось замедлением частоты следования кардиоциклов на ИКГ и увеличением их продолжительности. На ЭКГ помимо отрицательного хронотропного эффекта выявляли признаки замедления проведения возбуждения по миокарду желудочка.

В ходе проведенного исследования было установлено, что на фоне действия вещества $\pi Q1983$ эффект адреналиновой стимуляции сохранялся, но был менее отчетлив. В отличие от контрольной группы, в этой серии опытов отмечали преобладание хронотропных влияний адреналина над инотропными. Тем не менее, ускорение частоты сокращений миокарда достигало 32.8 ± 5.5 /мин при максимальной частоте в контроле 45.4 ± 7.2 /мин (-27.8% , $p < 0.05$) и стартовом показателе 15.7 ± 2.4 . Максимальный прирост «амплитуды» волн ИКГ в этой группе также был статистически значимо ниже, чем в контроле и составил всего 35.6% ($p < 0.05$).

Несмотря на незначительный эффект адреналиновой стимуляции, сердца лягушек опытной группы демонстрировали хорошие показатели стабильности электрической и механической активности. Благодаря влиянию вещества $\pi Q1983$, контрактильная деятельность миокарда осуществлялась в течение 67.5 ± 7.3 мин. (без вещества – 27.7 ± 3.9 мин.), т.е. время работы сердечной мышцы увеличивалось более чем в 2 раза при сохранении удовлетворительных значений амплитудных и частотных характеристик.

Следует отметить, что после применения вещества $\pi Q1983$ с последующей адреналиновой стимуляцией на поздних этапах опыта нередко наблюдали смену синусного ритма на атриовентрикулярный ритм, чего ни разу не было отмечено для сердец контрольной группы. При этом нельзя исключить вероятности того, что в условиях применения вещества $\pi Q1983$, смена водителя ритма на финальных стадиях эксперимента, представляла собой вариант адаптивной реакции миокарда в ответ на отсроченное формирование осложнений гипоксии [Новиков и др., 1998; Sutton et al., 1990]. Последнее может быть рассмотрено в качестве косвенного доказательства более высокой устойчивости сердца к недостатку кислорода на фоне действия изученного антигипоксанта.

Заключение

Применение нового антигипоксического вещества металлокомплексной природы $\pi Q1983$ *ex vivo* в концентрации 0.01% в значительной мере повышает устойчивость миокарда лягушки к адреналиновой стимуляции (более чем в 2 раза), пролонгируя его механическую и электрическую работу, что нашло подтверждение в опытах с регистрацией импеданскардиограммы и электрокардиограммы. Полученные данные свидетельствуют о наличии у вещества $\pi Q1983$ мягкого прямого кардиодепрессивного эффекта, сочетающегося с ранее доказанным антигипоксическим действием, что позволяет сформировать новые представления о механизмах реализации защитного действия вещества $\pi Q1983$ при развитии у теплокровных животных (мышь, крыса, кошка) острой экзогенной гипоксии.

Литература

- Гипоксия. Адаптация, патогенез, клиника. Под ред. Ю.Л. Шевченко. 2000. СПб., Элби, 384.
- Зарубина И.В., Шабанов П.Д. 2004. Молекулярная фармакология антигипоксантов. СПб., ООО «Изд. Н-Л», 368.
- Левченкова О.С., Новиков В.Е., Пожилова Е.В. 2012. Фармакодинамика и клиническое применение антигипоксантов. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, 10 (4): 3-22.
- Новиков В. С., Шустов Е. Б., Гаранчук В. В. 1998. Коррекция функциональных состояний при экстремальных воздействиях. СПб., Наука, 544.
- Сороко С. И., Бурых Э. А., Нестеров С. В. 2004. Перестройки интегративных механизмов регуляции функций в организме при острой гипоксии. Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова, 90 (8): 301.
- Сосин Д.В., Правдивцев В.А., Евсеев А.В. 2013. Способ регистрации механической работы изолированного сердца лягушки. Патент №2479871.



Шабанов П.Д., Зарубина И.В., Новиков В.Е. Цыган В.Н. 2010. Метаболические корректоры гипоксии. Под. ред. А.Б. Белевитина. СПб., Информ-Навигатор, 912.
Sutton J.R., Coates G., Remmers J. 1990. Hypoxia. Philadelphia, B. C. Decker, 198.

Literature

- Gipoksiya. Adaptatsiya, patogenez, klinika. [Hypoxia. Adaptation, pathogenesis, clinical features]. Pod red. Yu.L. Shevchenko. 2000. Sankt-Peterburg, Elbi, 384. (in Russian)
- Zarubina I.V., Shabanov P.D. 2004. Molekulyarnaya farmakologiya antigipoksantov. [Molecular Pharmacology of antihypoxants]. Sankt-Peterburg, ООО « Izdatel'stvo N-L», 368. (in Russian)
- Levchenkova O.S., Novikov V.E., Pozhilova E.V. 2012. Pharmacodynamics and clinical application antihypoxants *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii*, 10 (4): 3-22. (in Russian)
- Novikov V. S., Shustov E. B., Garanchuk V. V. 1998. *Korreksiya funktsional'nykh sostoyaniy pri ekstremal'nykh vozdeystviyakh* [Correction of functional states at extreme influences]. Sankt-Peterburg, Nauka, 544. (in Russian)
- Soroko S. I., Burykh E. A., Nesterov S. V. 2004. Redevelopment of integrative mechanisms regulating functions in the body during acute hypoxia. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I. M. Sechenova* [Russian physiological Journal of I.M. Sechenov]. 90 (8): 301. (in Russian)
- Sosin D.V., Pravdivtsev V.A., Evseev A.V. 2013. Sposob registratsii mekhanicheskoy raboty izolirovannogo serdtsa lyagushki. Patent №2479871 [Patent №2479871]. (in Russian)
- Shabanov P.D., Zarubina I.V., Novikov V.E. Tsygan V.N. 2010. Метаболические корректоры гипоксии. [Metabolic correctors of hypoxia]. Pod. red. A.B. Belevitina. Sankt-Peterburg, Inform-Navigator, 912. (in Russian)
- Sutton J.R., Coates G., Remmers J. 1990. Hypoxia. Philadelphia, B. C. Decker, 198.