

ВЛИЯНИЕ Ni^{2+} НА СЕРДЕЧНЫЙ И ДЫХАТЕЛЬНЫЙ РИТМЫ У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫСЯТ

© 2022 г. С. В. Кузнецов^{1,*}, Н. Н. Кузнецова¹

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: ksv@iephb.ru

Поступила в редакцию 19.05.2022 г.

После доработки 21.07.2022 г.

Принята к публикации 22.07.2022 г.

На новорожденных крысятах 3–16-дневного возраста (P3–16) изучено влияние Ni^{2+} , блокатора низкопороговых кальциевых каналов T-типа (T-VDCC) и натрий-кальциевого обменника (NCX), на параметры сердечного и дыхательного ритмов. Обнаружена четкая возрастная зависимость выраженности аритмогенного эффекта, возникающего при блокаде кальциевых каналов. У 100% 3-дневных крысят при инъекции NiCl_2 в дозе 109 мг/кг (ED_{100}) возникает преходящий атипичный сердечный ритм, представляющий собой чередование периодов умеренной брадикардии с патологически медленным (до 20–60 сокр/мин) сердечным ритмом. Параллельно развивается выраженная дисфункция дыхательной системы с пачечной формой дыхания. Данный симптомокомплекс возникает у 75% 10–14-суточных крысят и полностью отсутствует у 15–16-суточных. Феноменологически сходные нарушения сердечного ритма наблюдаются у новорожденных крысят после инъекции хлорида никеля, при отравлении ингибиторами ацетилхолинэстеразы и при активации центральных Н-холинергических структур. Полученные данные позволяют предполагать, что в ранний период постнатального онтогенеза крыс нарушение механизмов кальциевого обмена может играть определенную роль в развитии нарушений ритмогенеза.

Ключевые слова: новорожденные крысы, дизритмия, сердечный ритм, дыхание, кальциевые каналы, хлорид никеля

DOI: 10.31857/S0044452922050060

В раннем постнатальном онтогенезе у крысят могут возникать эпизоды атипичного сердечного ритма, представляющие собой чередование периодов умеренной брадикардии с периодами еще более медленного (до 20 сокр/мин) ритма. Аналогичные нарушения сердечного ритма возникают в условиях активации холинергической системы, вызванной рядом фармакологических воздействий [1–3]. Нами был проведен цикл исследований, направленных на выявление возможной роли дисфункции ионных каналов в развитии данного вида аритмии. В опытах на новорожденных крысятах было проведено изучение влияния блокады медленных кальциевых каналов L-типа [4] и Na^+/K^+ -АТФазы [5], а также блокады и активации рианодиновых рецепторов (RyR) [6] на параметры сердечного и дыхательного ритмов. Было установлено, что нарушение этих ионообменных процессов у новорожденных крысят к значимым нарушениям сердечного ритма не приводит. Вместе с тем в сердце есть еще один тип кальциевых каналов, который может принимать участие в нарушении нормального ритмогенеза.

Кальциевые потенциал-зависимые каналы T-типа (T-type voltage-dependent Ca^{2+} channel, T-VDCC) наиболее многочисленны в клетках, не имеющих системы поперечных канальцев, таких как узловые и эмбриональные сердечные миоциты. T-VDCC расположены преимущественно в синоатриальном и атриоventрикулярном узлах, клетках Пуркинье и участвуют в работе сердечного пейсмекера [7]. В спонтанно сокращающихся пейсмекерных клетках увеличение субсарколеммальной внутриклеточной концентрации Ca^{2+} происходит одновременно с последней третью диастолической деполяризации из-за локального спонтанного высвобождения Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулула, т.е. быстрого подъема уровня ионов Ca^{2+} (спарков). Спонтанный выброс Ca^{2+} приводит к активации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника в прямом режиме (1 Ca^{2+} – наружу, 3 Na^+ – внутрь клетки), создающего входящий деполяризующий ток $I_{\text{Na-Ca}}$, ускоряющий диастолическую деполяризацию. В то же время активация кальциевого тока T-типа (I_{CaT}) с одной стороны сама по себе приводит к еще большему ускорению

диастолической деполяризации, а с другой — дополнительно усиливает входящий I_{Na-Ca} . В итоге диастолическая деполяризация переходит из линейной фазы в экспоненциальную, в результате чего мембрана пейсмекерного миоцита деполяризуется до порога запуска потенциала действия. Этот механизм указывает на важную роль I_{CaT} и субсарколеммального внутриклеточного высвобождения Ca²⁺ в нормальной деятельности сердечного пейсмекера, а при определенных условиях может способствовать развитию эктопических предсердных аритмий. Помимо участия в обеспечении пейсмекерной активности, вход Ca²⁺ через T-VDCC может напрямую регулировать внутриклеточные концентрации Ca²⁺, являющегося важным вторичным мессенджером для различных клеточных процессов [8, 9]. Локализуемые в сердечно-сосудистой системе T-VDCC подразделяются на подтипы Cav3.1 и Cav3.2, которые имеют различные функциональные особенности. Вместе с тем анализ литературы не дает однозначного ответа о роли этих подтипов в работе миокарда [10, 11].

Как правило, кальциевые каналы T-типа экспрессируются в неонатальных кардиомиоцитах, клетках синоатриального и атриовентрикулярного узла, но практически не экспрессируются во взрослых желудочковых миоцитах [12, 13]. T-VDCC могут повторно экспрессироваться в гипертрофированном миокарде, это позволяет предположить, что данные каналы являются частью фетальной генной программы, возникающей вновь во время гипертрофического процесса [13]. Кроме того, при различных патологических состояниях I_{CaT} часто регистрируется в локальной области миокарда на некоторых стадиях ремоделирования, при этом происходит выраженная экспрессия одного или нескольких канальных белков Cav3.1–3.3 [14]. Предполагается, что у кардиомиопатических хомяков, крыс и кошек чрезмерная перегрузка кальцием может быть связана с аномальной экспрессией T-VDCC во время развития сердечной недостаточности [15]. Сходные данные получены и при анализе динамики созревания натрий-кальциевого обменника (Na⁺/Ca²⁺ exchanger, NCX). Экспрессия и функция NCX в сердечных миоцитах наиболее высоки у новорожденных крыс и постепенно снижаются при постнатальном развитии. При гипертрофии, вызванной экспериментальной перегрузкой давлением или при сердечной недостаточности у человека, экспрессия NCX увеличивается и переходит в повышенную активность, аналогично ранней фазе постнатального развития крысы, что позволяет предположить наличие общего базового механизма в контроле экспрессии NCX в незрелом и гипертрофированном миокарде [16].

Установлено, что подтипы T-VDCC можно различать по их чувствительности к блокированию Ni²⁺, причем изоформа Cav3.2 приблизительно в

20 раз более чувствительна к никелю, чем Cav3.1 и Cav2.3 [17–21]. NCX также может блокироваться Ni²⁺, но необходимая для этого концентрация никеля должна быть более, чем в 10 раз выше, чем в случае с T-VDCC [22–24]. Исследования спонтанной фиксации токов показали, что Ni²⁺ замедляет позднюю фазу деполяризации и, следовательно, замедляет срабатывание пейсмекерных синоатриальных клеток у кролика или латентных пейсмекерных клеток у кошки. В опытах *in vivo* изменения чувствительности T-VDCC к никелю в перинатальном онтогенезе не исследовались, но могли бы представлять интерес [9], в том числе и для анализа безопасности фармакологических средств для новорожденных и недоношенных детей [21].

Целью настоящего исследования стало изучение последствий блокады кальциевых каналов T-типа ионами Ni²⁺ у крысят 3–16-дневного возраста.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования

Работа выполнена на крысятах *Rattus norvegicus f. domestica* 3-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14-, 15- и 16-дневного возраста (P3–P16). В каждой возрастной группе было от 6 до 62 животных без разделения по полу. Всего в опытах использовано 308 крысят. Все экспериментальные процедуры соответствовали требованиям Комитета по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, основанным на директиве Европейского парламента 2010/63/EU “О защите животных, используемых в экспериментальных целях”.

Экспериментальная установка и методы регистрации

Животных помещали в экранированную камеру с температурой $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Контроль температуры осуществляли с помощью цифрового термометра RST-02100 (RST, Швеция). Регистрацию физиологических показателей проводили на ненаркотизированных крысятах в условиях мягкой фиксации животных.

Исследовали ЭКГ, показатели внешнего дыхания. В целях снижения уровня артефактов, при регистрации ЭКГ у крысят применяли нестандартное отведение от теменной части головы и крестцовой области. Для анализа частоты дыхания (ЧДД) осуществляли регистрацию экскурсий грудной клетки с использованием пьезоэлектрического датчика VP-102 (RTF, Германия). В экспериментах использовали усилители биопотенциалов ИУ-40 (производство ЭПМ НИИЭМ РАМН). ЧДД регистрировали при полосе пропускания усилителя от

0.15 до 30 Гц, ЭКГ – от 5 до 50 Гц, ЭМГ – от 5 до 150 Гц. Для ввода аналоговых сигналов в компьютер использовали АЦП Е14–440 (L-card, Россия) с периодом дискретизации 1 мс. Анализ регистрируемых сигналов проводили в программе “PowerGraph 3.3.10” (ООО “ДИСофт”, Россия) и “Origin 2019” (OriginLab Corporation, США).

У интактных крысят после 15-минутного периода адаптации в течение 30 мин регистрировали сердечный и дыхательный ритм. После регистрации физиологических показателей у интактных животных крысятам внутрибрюшинно вводили шестиводный хлористый никель (7791-20-0 Sigma-Aldrich) в дозах от 8 до 273 мг/кг (в пересчете на безводный NiCl_2). Общее время исследования каждого животного составляло от 75 до 90 мин в зависимости от состояния животного. У части крысят осуществляли дополнительную регистрацию ЭКГ и дыхания через 6–8 ч после инъекции препарата.

Определение эффективной дозы хлорида никеля

В доступной литературе имеется очень мало сведений об острых отравлениях соединениями никеля. Установленные в экспериментах на взрослых крысах среднесмертельные (LD_{50}) дозы хлорида никеля существенно различаются у разных исследований. В частности, исследования острой пероральной токсичности девяти соединений никеля, проведенные на взрослых белых крысах, подтвердили общую низкую пероральную токсичность этих соединений и продемонстрировали широкий диапазон значений LD_{50} от 310 до >11000 мг/кг. Шестиводный хлорид никеля, растворенный в дистиллированной воде, вводили крысам перорально в дозах от 159 до 2000 мг/кг. В течение 14 дней исследования не наблюдалось смертельных исходов в дозах до 400 мг/кг. Острая пероральная LD_{50} была определена как 500 мг/кг, с 95% доверительным интервалом 397–624 мг/кг [25]. По данным другой группы исследователей, – LD_{50} при пероральном введении крысам составляет 681 мг/кг, при внутривенном – ровно на порядок ниже (68.1 мг/кг) [26]. Внутрибрюшинное введение хлористого никеля мышам в дозе 500 мг/кг приводит к их гибели на 3-й день после инъекции. За время наблюдения у подопытных мышей отмечено возникновение респираторного дистресса. Среднесмертельная доза, установленная в этом же исследовании при внутривенном введении NiCl_2 крысам, составила 38.8 мг/кг [27].

Так как в перинатальном онтогенезе крыс токсические дозы никеля ранее не были установлены, то мы провели серию опытов с внутрибрюшинным введением NiCl_2 в дозах 8, 14, 27, 55, 82, 109, 164, 218 и 273 мг/кг. Для установления действующей (эффективной) дозы было использовано несколько

групп, состоящих из 4–12 крысят 3-, 10- и 16-дневного возраста. За период наблюдения в течение 8–10 ч после введения препарата была зафиксирована гибель одного 13-дневного животного при инъекции ему никеля в дозе 109 мг/кг и одного 16-дневного – при введении никеля в дозе 273 мг/кг. Таким образом, несмотря на наличие выраженных изменений ряда физиологических показателей, нам не удалось установить среднесмертельную дозу препарата. Средняя эффективная доза (ED_{50}) хлористого никеля, вызывающая нарушения сердечного или дыхательного ритма, составила для 3–16-дневных крысят 14 мг/кг.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных осуществляли в программе “Origin 2019”. Статистически обработанные данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка ($M \pm SEM$). Для определения достоверности различий между группами использовали парный тест Стьюдента. Все изменения рассматривали по отношению к фоновым показателям до введения препарата. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Расчет коэффициента сердечной аритмии (КА) осуществляли по формуле $KA = (RR_{max} - RR_{min}) / RR_{mean}$, где RR – длительность кардиоинтервалов. Расчеты показателей частоты сердечных сокращений (ЧСС) и ЧДД осуществляли как за всю эпоху анализа, так и дополнительно в первые и последние три минуты регистрации после инъекции хлорида никеля. При анализе периодограмм сердечного ритма вычисляли коэффициент асимметрии (Skewness) и коэффициент эксцесса (Kurtosis), который для обеспечения сравнения со стандартным нормальным распределением, рассчитывали как куртозис Пирсона (куртоз – 3).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ предварительных данных показал, что, начиная с дозы 109 мг/кг, у 100% 3-дневных крысят возникают единообразные изменения сердечного и дыхательного ритма. Поэтому доза 109 мг/кг была нами выбрана в качестве основной, используемой для тестирования на животных всех возрастных групп (табл. 1).

После проведения оценки изменений показателей сердечного ритма в экспериментальных группах животных, мы объединили для дальнейшего анализа несколько однородных по характеру реакции возрастных групп крысят. В результате были получены три группы крысят: 3- (масса тела 10.1 ± 0.2 г), 10–14- (масса тела 27.1 ± 0.9 г) и 15–16-дневные (масса тела 32.3 ± 1.0 г).

Первые признаки нарушения ритма дыхания возникают у крысят приблизительно через 3 мин после инъекции хлористого никеля. Еще через

Таблица 1. Физиологические показатели у крысят в фоне и после инъекции NiCl₂ в дозе 109 мг/кг

Показатели	Фон	NiCl ₂			
	<i>M ± SEM</i>	<i>M ± SEM</i>	Mediana, (first – last)	% к фону	% животных с наличием комплексов
3 сут (n = 12)					
ЧСС в мин	322.1 ± 3.4	256.1 ± 6.8*	260 (267–185)	80	100
ЧДД в мин	114.0 ± 2.6	71.8 ± 1.4*	71 (78–29)	63	
КА, у.е.	0.29 ± 0.05	5.21 ± 0.75*	–	1797	
10–14 сут (n = 16)					
ЧСС в мин	461.6 ± 11.4	296.1 ± 8.1*	293 (423–264)	64	73
ЧДД в мин	120.6 ± 5.0	68.2 ± 3.5*	70 (76–41)	57	
КА, у.е.	0.12 ± 0.01	3.93 ± 0.56*	–	3275	
15–16 сут (n = 12)					
ЧСС в мин	494.5 ± 7.9	352.0 ± 15.2*	366 (451–317)	71	0
ЧДД в мин	123.5 ± 5.3	57.8 ± 2.3*	56 (69–50)	47	
КА, у.е.	0.13 ± 0.02	0.50 ± 0.04*	–	385	

Здесь и в табл. 2: **p* < 0.05 – достоверность различий между фоном и препаратом.

ЧДД – частота дыхательных движений, ЧСС – частота сердечных сокращений. КА – коэффициент аритмии. Mediana – медиана для среднего значения показателя по группе; (first – last) – средние значения ЧСС или ЧДД в первые и последние три минуты регистрации после инъекции NiCl₂.

30–60 с начинается развитие брадикардии, переходящее в пачечную форму активности, где установившийся медленный сердечный ритм чередуется с периодами еще более медленных сердечных сокращений (рис. 1). Через 15–25 мин происходит восстановление регулярного дыхательного и сердечного ритма. Следует отметить, что, несмотря на стабилизацию ритма сердца, восстановления до нормальной ЧСС не происходит на протяжении 6–8 ч после инъекции.

Примечательно, что увеличение дозы препарата до 273 мг/кг вызывает у животных изменения физиологических показателей, сопоставимые по клинической картине, времени наступления и продолжительности с наблюдаемыми при введении NiCl₂ в дозе 109 мг/кг (табл. 2, рис. 2).

Как мы уже указывали выше, возникновение нарушений ритма дыхания на несколько секунд опережает начало развития брадикардии и появления пачечной аритмии (рис. 1, 2). У 37% 3-дневных и 90% 10–14-дневных крысят на протяжении периода воспроизведения атипичного сердечного ритма отслеживается устойчивая взаимосвязь между комплексами сердечных сокращений и вспышка-

ми высокоамплитудного дыхания (рис. 3). В период между комплексами дыхательных движений может наблюдаться или нерегулярное поверхностное дыхание (рис. 3с), или периоды апноэ. У крысят на P15–16 после инъекции NiCl₂ пачечная форма дыхания отсутствует, хотя ритм дыхания замедляется и имеет нерегулярный характер (табл. 1).

У 3–14-дневных крысят в период аритмии ЧСС имеет большую вариабельность. В разных возрастных группах разброс RR-интервалов существенно различается. Наблюдается четкая возрастная зависимость выраженности аритмогенного эффекта препарата, максимального на 3-и сутки и отсутствующего у 15-дневных крысят (рис. 4). Более выраженный прирост величины коэффициента аритмии на P10–14, представленный в табл. 1, обусловлен меньшим разбросом длительности сердечного цикла в фоне по сравнению с P3, когда и у интактных крысят возникают характерные для этого возраста преходящие короткие периоды брадикардии.

На рис. 5 представлены гистограммы распределения RR-интервалов у интактных и подвергшихся воздействию никеля крысят. В фоне у 3-дневных крысят наблюдается распределение с незначитель-

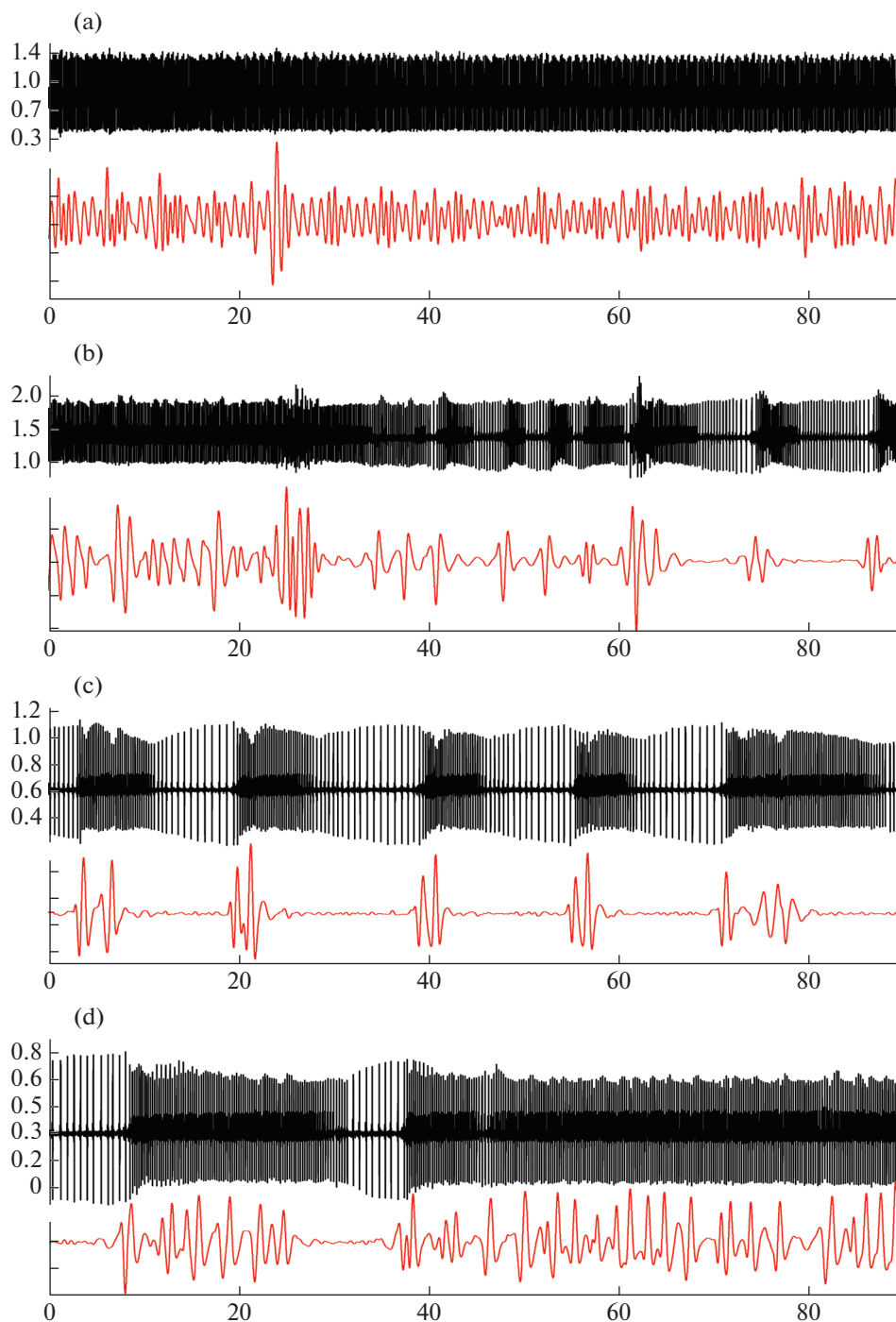


Рис. 1. Преходящие нарушения сердечного (верхняя кривая) и дыхательного (нижняя кривая) ритма у 11-дневного крысенка в фоне (а) и через 140 с (b), 660 с (c), 930 с (d) после инъекции NiCl_2 в дозе 109 мг/кг. Здесь и на рис. 2, 3: по оси абсцисс – время (с), по оси ординат – амплитуда ЭКГ (мВ) и пьезограммы дыхания (у.е.).

ным сдвигом в высокочастотную область, бимодальное распределение интервалов на 10–14-е сутки связано с возрастными различиями ЧСС, а у 15–16-дневных распределение приближается к нормальному (табл. 3). После введения препарата в первые две недели постнатального развития у кры-

сят происходит смещение интервалов в медленно-волновой диапазон, а также их выраженная локализация в области 360–180 мс. Интересный результат наблюдается на P15–16. Введение никеля сопровождается развитием брадикардии и, одновременно, стабилизацией сердечного ритма, при

Таблица 2. Изменение физиологических показателей у крысят в фоне и после инъекции NiCl₂ в разных дозах

Показатели	Фон	NiCl ₂		
	<i>M ± SEM</i>	<i>M ± SEM</i>	% к фону	% животных с наличием комплексов
3-и сутки, 14–27 мг/кг (n = 12)				
ЧСС в мин	311.0 ± 18.9	235.9 ± 9.2*	76	75
ЧДД в мин	110.1 ± 7.0	76.6 ± 3.6*	70	
КА, у.е.	0.26 ± 0.09	1.87 ± 0.45*	719	
3-и сутки, 55 мг/кг (n = 8)				
ЧСС в мин	286.4 ± 13.2	214 ± 25.4*	75	67
ЧДД в мин	96.4 ± 8.9	71.4 ± 7.6*	74	
КА, у.е.	0.29 ± 0.06	3.92 ± 0.99*	1352	
3-и сутки, 273 мг/кг (n = 8)				
ЧСС в мин	287.7 ± 2.0	134.7 ± 2.3*	47	100
ЧДД в мин	110.3 ± 5.0	75.3 ± 7.4*	68	
КА, у.е.	0.24 ± 0.01	4.73 ± 0.70*	1971	
15–16-е сутки, 273 мг/кг (n = 8)				
ЧСС в мин	487.0 ± 11.2	332.0 ± 36.7*	68	0
ЧДД в мин	135.7 ± 15.0	67.7 ± 5.2*	50	
КА, у.е.	0.11 ± 0.02	0.74 ± 0.19*	673	

Таблица 3. Показатели распределения RR-интервалов у крысят в фоне и после инъекции NiCl₂ в дозе 109 мг/кг

Возраст, сутки	Состояние	<i>M ± SEM</i>	Мода	Медиана	Коэффициент асимметрии	Коэффициент эксцесса
3	фон	0.202 ± 0.0001	0.192	0.199	0.388	–0.367
	NiCl ₂	0.376 ± 0.0012*	0.363	0.346	4.145	20.892
10–14	фон	0.129 ± 0.0001	0.126	0.126	1.187	0.178
	NiCl ₂	0.214 ± 0.0003*	0.203	0.199	4.885	34.392
15–16	фон	0.121 ± 0.00003	0.118	0.120	0.235	–0.473
	NiCl ₂	0.165 ± 0.0001*	0.177	0.165	0.056	–0.891

которой коэффициент асимметрии становится близким к нулю, а снижение коэффициента эксцесса может быть связано с постепенным развитием отрицательного хронотропного эффекта (табл. 3, рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Итак, нами обнаружена четкая возрастная зависимость выраженности аритмогенного эффекта, возникающего при блокаде T-VDCC и, возможно, NCX. У 100% крысят на P3 при инъекции NiCl₂ в дозе 109 мг/кг возникает преходящий атипичный сердечный ритм, параллельно развивается выраженная дисфункция дыхательной системы с пачечной формой дыхания. Данный симптомокомплекс

возникает у 75% 10–14-суточных крысят и полностью отсутствует у 15–16-суточных. Возрастная динамика выраженности разброса кардиоинтервалов после введения блокатора (рис. 4) коррелирует с экспрессией кальциевых каналов Cav3.2, описанной в ранний период перинатального онтогенеза [10, 17, 28].

В процессе развития происходят изменения I_{CaT} , который регистрируется во всех исследованных эмбриональных и неонатальных клетках, но сохраняется лишь у нескольких видов животных во взрослых интактных клетках желудочков миокарда. В предсердиях крысы изменения плотности I_{CaT} связаны в основном с изменением плотности каналов без изменения проводимости или стробирования (гейтинга) одного канала. В отличие от отно-

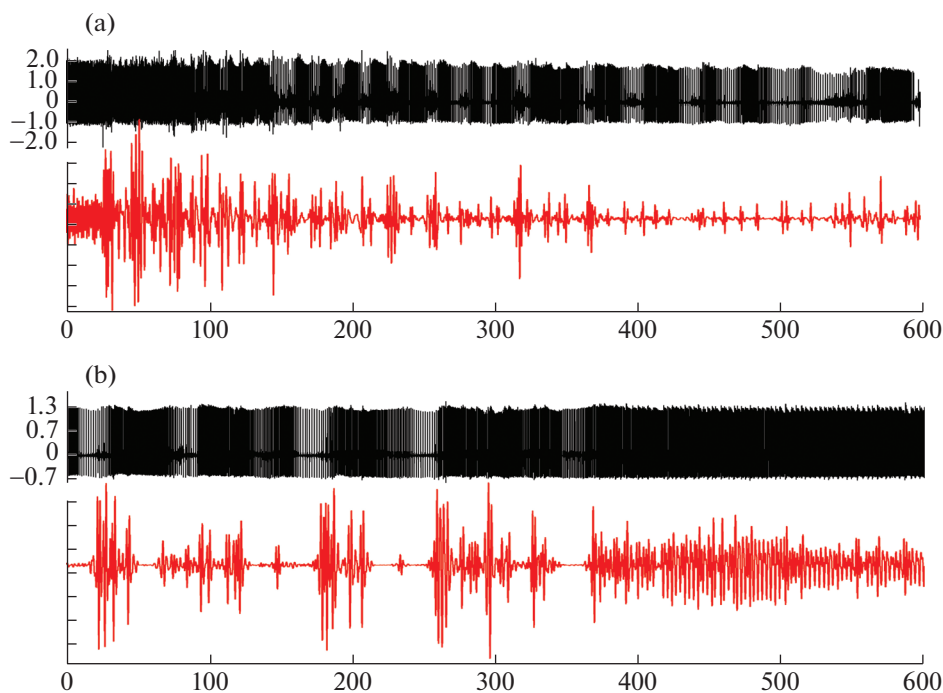


Рис. 2. Преходящие нарушения сердечного (верхняя кривая) и дыхательного (нижняя кривая) ритма у 3-дневного крысенка через 170 с (а) и 1250 с (б) после инъекции NiCl_2 в дозе 273 мг/кг.

сительно стабильного уровня плотности кальциевого тока L-типа, плотность I_{CaT} в предсердных миоцитах крыс достигает максимального уровня к 5-й неделе после рождения и затем начинает резко снижаться [29]. В опытах на изолированных миоцитах предсердий и желудочков крыс было осуществлено измерение плотности кальциевых токов L- и T-типа, начиная с 4-дневного (P4) и до взрослого (P120) возраста. Установлено, что I_{CaT} в клетках предсердия регистрируется уже в 4-дневных миоцитах предсердий крыс и достигает максимального уровня в 8-дневных. Плотность I_{CaT} снижается через 3 недели и остается низкой в миоцитах предсердий взрослых крыс. В клетках желудочков ситуация иная. Протекающий через T-VDCC ток также наблюдается у 8-дневных крысят, но затем исчезает у 3-недельных крыс, несмотря на наличие мРНК субъединиц $\alpha 1\text{G}$ ($\text{Cav}3.1$) и $\alpha 1\text{H}$ ($\text{Cav}3.2$) [25]. Сходные результаты получили и авторы другого исследования, в котором было показано, что I_{CaT} выражен в основном в кардиомиоцитах желудочков плода (E16–E18) и остается стабильным до рождения. Плотность I_{CaT} снижается вскоре после рождения (P1–P5) и не обнаруживается у 21-дневных крысят [17].

Во время созревания сердца существует взаимная связь между его морфогенезом и сократимостью. В раннем эмбриональном миокарде саркоплазматический ретикулум развит слабо, и кальциевые каналы плазматической мембраны имеют

решающее значение для поддержания как сократимости, так и возбудимости. На 6–9-е сутки постнатального периода в кардиомиоцитах крыс впервые визуализируются короткие T-трубочки, которые проникают вглубь цитоплазмы к 14–15-м суткам постнатального периода. Поперечная исчерченность саркоплазмы кардиомиоцитов крыс полностью формируется к 21-м суткам после рождения [30]. В первые 5 дней после рождения преобладает сарколеммальный поток Ca^{2+} , тогда как в возрасте 3 нед наиболее важным является Ca^{2+} -индуцированный выброс Ca^{2+} (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR) из саркоплазматического ретикулума. Исчезновение I_{CaT} совпадает с появлением CICR механизма электромеханической связи. У новорожденного животного сарколеммальный Ca^{2+} почти в равной степени проходит через Ca^{2+} -каналы T- и L-типа, а также через NCX. В опытах на изолированных сердцах крыс было показано, что введение Ni^{2+} вызывает снижение кальциевого транзientа на 93% в 1–3-и сутки и на 35% – на 3-й неделе. Мибефразил, блокирующий преимущественно T-VDCC, снижает кальциевые токи на 75 и 16% соответственно. Это может свидетельствовать о возрастном снижении I_{CaT} при сохранении $I_{\text{Na-Ca}}$ [31]. Следует отметить, что исчезновение атипичного сердечного ритма, наблюдаемого нами на P15–16 после инъекции крысятам NiCl_2 , совпадает по времени с описанным выше торможением I_{CaT} .

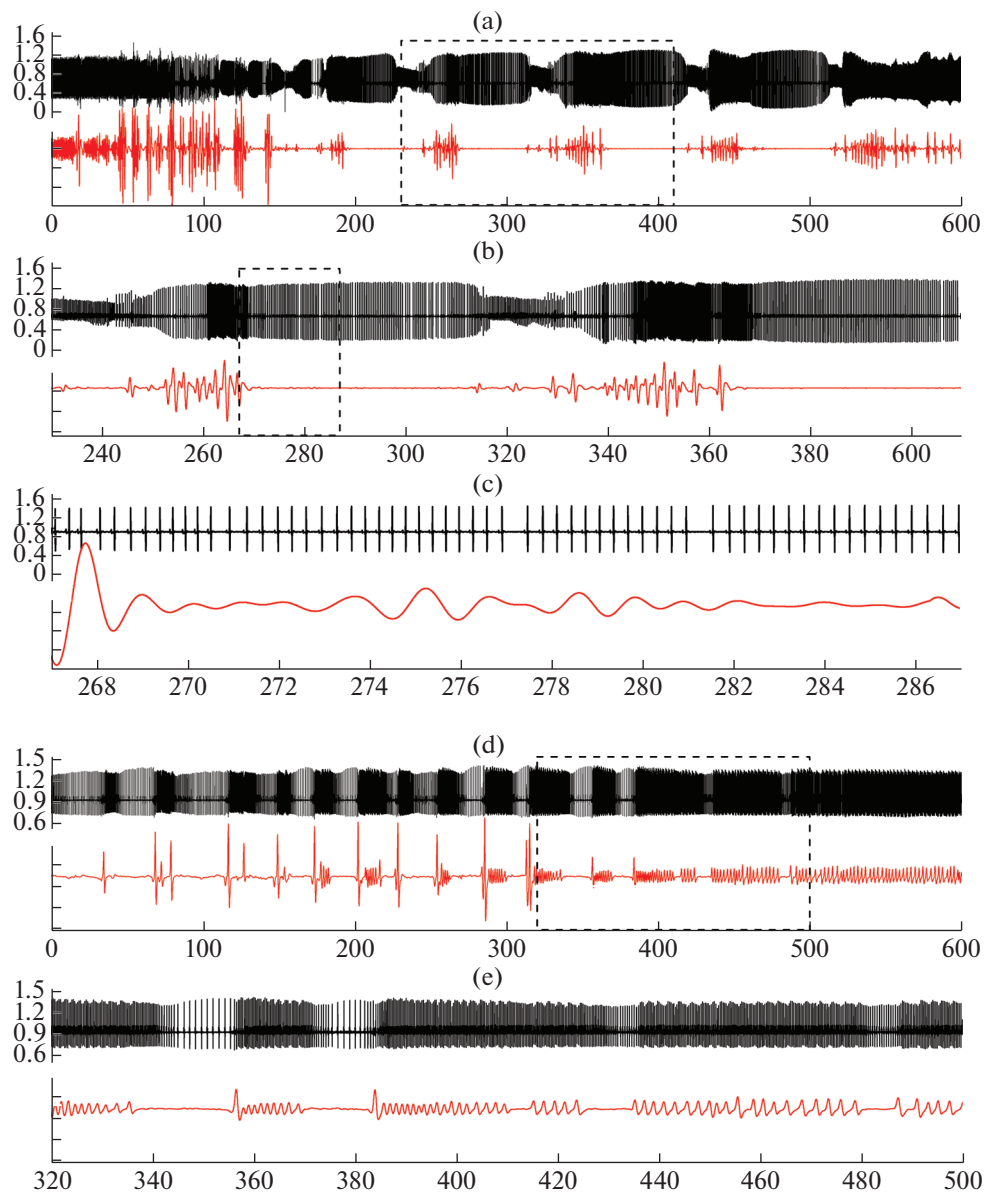


Рис. 3. Синхронизация комплексов сердечных сокращений (верхняя кривая) и всплеск дыхательного ритма (нижняя кривая) у 13-дневного крысенка через 150 с (а, b, с) и 1100 с (d, e) после инъекции NiCl₂ в дозе 109 мг/кг. На (b, d) – фрагменты записей (а, с), отмеченные прямоугольником; на (с) – фрагмент (b) с амплитудой пьезограммы дыхания, умноженной в 5 раз.

Обращает на себя внимание отсутствие явных различий в характере нарушений сердечного и дыхательного ритмов при введении хлорида никеля в дозе 109 мг/кг и выше (164–273). В работе Kang и соавт., выполненной в условиях *in vitro* на ооцитах лягушки, было показано, что дозозависимое ингибирующее действие никеля на Cav3.2 носит обратный экспоненциальный характер [20]. Это в какой-то мере согласуется и с тем, что влияние никеля на Cav3.2 характеризуется низким значением концентрации полумаксимального ингибирования [9]. Не исключено, что и на уровне целого ор-

ганизма сохраняется подобная зависимость “доза–эффект”, при которой дальнейшее увеличение дозы препарата не вызывает значимых изменений в характере реакций. Замещение первоначально возникающей пачечной формы сердечного ритма длительной многочасовой брадикардией может быть связано с различной аффинностью Cav3.1 и Cav3.2 подтипов T-VDCC или других ионных каналов (Cav2.3, NCX) к ионам никеля и, как следствие, с разделенным по времени нарушениям механизмов симпатической и парасимпатической иннервации.

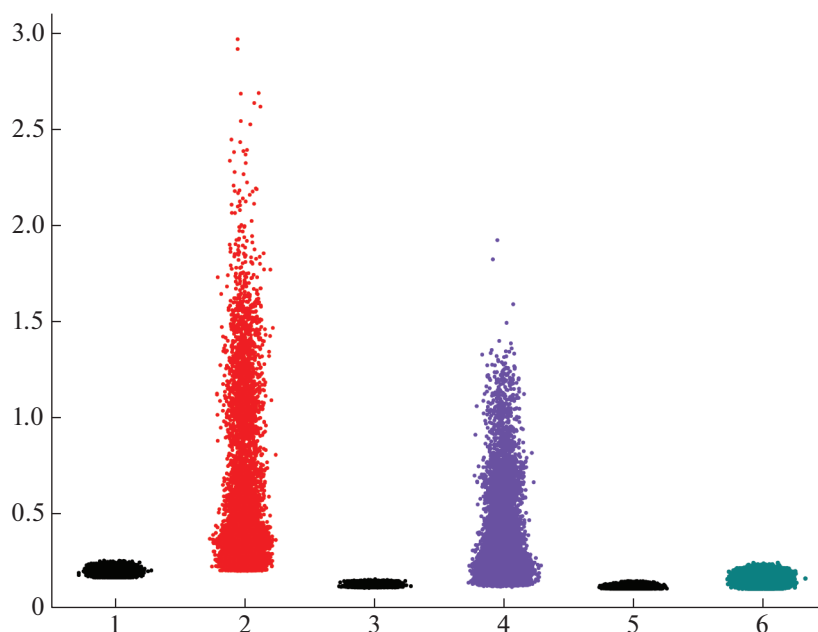


Рис. 4. Скаттерограмма RR-интервалов у крысят разных возрастных групп в фоне и после введения NiCl_2 в дозе 109 мг/кг. По оси абсцисс – группы животных: 1 – 3 сут, фон; 2 – 3 сутки, NiCl_2 , 3 – 10–14 сут, фон; 4 – 10–14 сут, NiCl_2 ; 5 – 15–16 сут, фон; 6 – 15–16 сут, NiCl_2 . По оси ординат – длительность сердечного цикла (с).

Возникающий у крысят после введения хлористого никеля атипичный сердечный ритм феноменологически сходен с тем, который мы наблюдали ранее при отравлении крысят ингибиторами ацетилхолинэстеразы фосфаколом или эзеринном [2, 3], а также при активации центральных Н-холинореактивных структур [1, 32]. Участие холинорецепторов в регуляции кальциевого гомеостаза подтверждено опытами, выполненными в условиях *in vitro*. В экспериментах на морских свинках было показано, что NiCl_2 , как и М-холинолитик атропин, частично блокирует дополнительно усиленное параоксоном (фосфаколом) некантовое высвобождение (non-quantal release, NQR) ацетилхолина из парасимпатических нейронов гладкой мускулатуры дыхательных путей, в которых присутствует и Ca^{2+} -зависимое некантовое высвобождение ацетилхолина. Установлено, что торможение сократительной способности гладких мышц не связано с истощением нейронных везикул, а реализуется через неспецифические катионные каналы, в том числе и кальциевые [33].

Наряду с определенным сходством развития патологического процесса после введения хлорида никеля или после инъекции холиномиметиков [2, 3], существуют и явные различия. Так, при активации холинореактивных структур характерно возникновение синоатриальных и атриовентрикулярных блокад, которых не обнаружено после введения NiCl_2 . Еще одним отличием является длительность эффекта. После введения холиноми-

метиков нарушение ритма начинается через 10–15 мин и может продолжаться до 1.5–2 ч, часто заканчиваясь возникновением длительных периодов асистолии и остановкой сердца и дыхания. В случае инъекции хлорида никеля, амплитуда QRS комплекса ЭКГ сохраняется, аритмия возникает через 5–10 мин и, независимо от дозы препарата, заканчивается не более чем через 20–25 мин. Возникающая у 3–14-дневных крысят пачечная форма дыхания никогда нами не наблюдалась у животных после холинергической активации. Данные факты могут свидетельствовать как о наличии общих звеньев, так и различий в механизмах развития дизритмии. Мы надеемся, что дальнейшее исследование с предварительной блокадой холинорецепторов и последующим введением NiCl_2 позволит нам получить более четкое представление о возможных механизмах возникновения атипичного сердечного ритма у крысят.

Нам не удалось найти публикаций, свидетельствующих о возникновении функциональных нарушений дыхательной системы при отравлении хлоридом никеля. В опытах на взрослых крысах линии Sprague-Dawley, находящихся под уретановой анестезией и искусственной вентиляцией легких, было показано, что билатеральная микроинъекция NiCl_2 в каудальный отдел вентролатеральной области продолговатого мозга и комплекс пре-Бетцингера (preBötC) сопровождается уменьшением амплитуды разрядов диафрагмального нерва, но не вызывает замедления фазы выдоха и последующего прекращения дыхания, как это происходит в

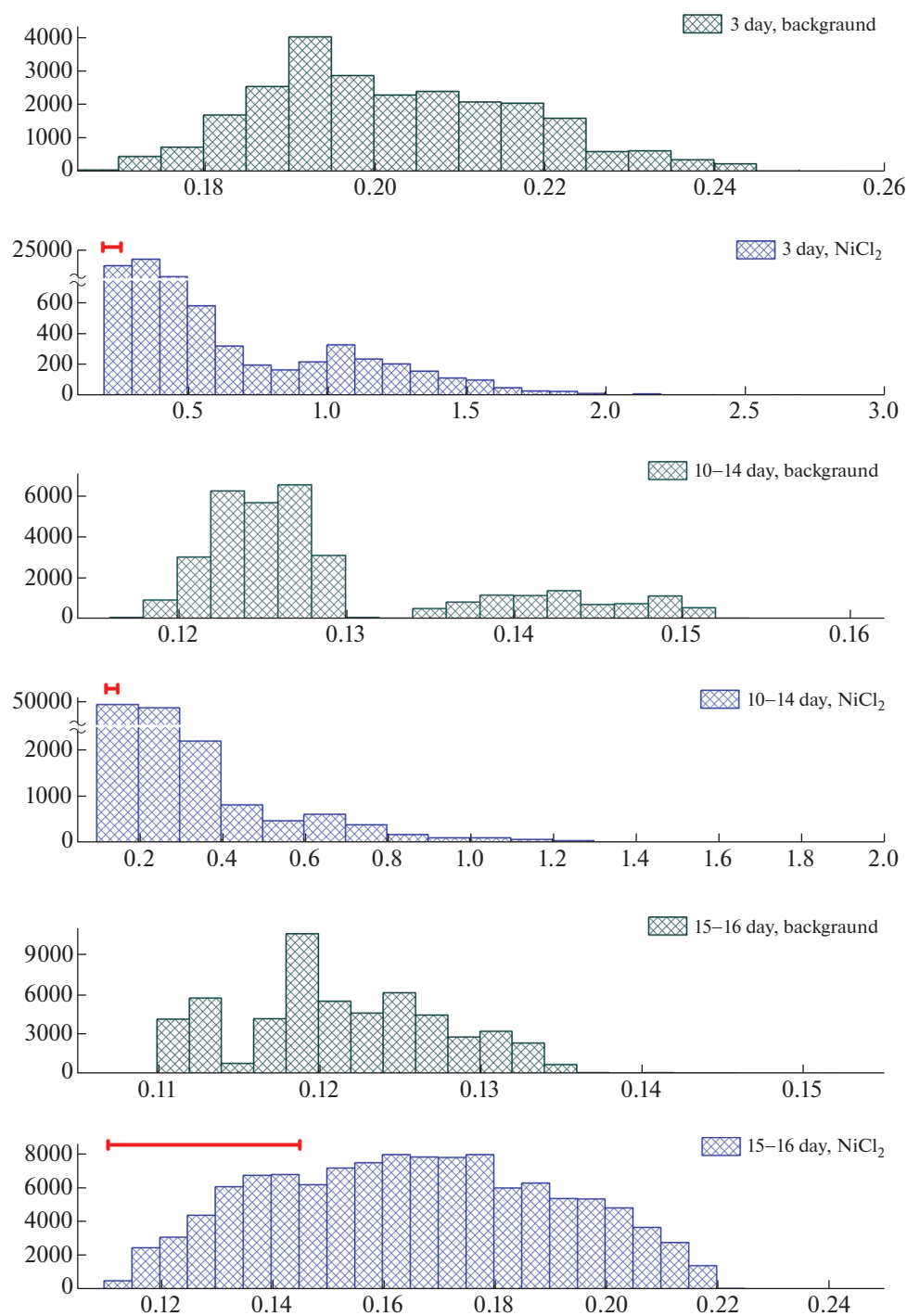


Рис. 5. Гистограммы распределения RR-интервалов у крысят разного возраста в фоне и после введения $NiCl_2$ в дозе 109 мг/кг.

По оси абсцисс – время (с), по оси ординат – совокупное количество циклов (Count bins).

Так как по оси абсцисс диапазоны значений в фоне и опыте различаются, для облегчения сопоставления результатов, горизонтальной линией над гистограммами показано расположение и диапазон RR-интервалов, соответствующий исходному (фоновому) состоянию.

случае применения антагониста NMDA-рецепторов кинурената или блокаторов высокопороговых Ca^{2+} каналов P/Q- и L-типа [34]. Кроме того, в

опытах на изолированных срезах каудального гипоталамуса взрослых крыс обнаружено угнетение никелем I_{CaT} , а также ритмической активности

нейронов, в условиях *in vivo* разряжающихся синхронно с дыхательными и сердечно-сосудистыми циклами [35]. Показано, что в первые 5 сут постнатального развития у крыс в ргеVöтС обнаруживается очень мало пейсмекерных нейронов, у которых в основе генерации разрядов лежит Ca^{2+} -активируемый внутренний катионный ток [36], а функциональная значимость Ca^{2+} токов Т-типа возрастает во время онтогенетических преобразований механизмов генерации дыхательных ритмов [37]. Нельзя исключить, что наблюдаемые нами на P3–14 изменения ритма дыхания после воздействия хлоридом никеля связаны с возрастными особенностями колебаний кальциевых токов и перестройками нейрональной активности в ргеVöтС. Вопрос о природе кардиореспираторных взаимодействий остается открытым и требует отдельного исследования.

Вопрос об участии NCX в возникновении атипичного сердечного ритма после введения NiCl_2 остается открытым и требует дальнейшего изучения. У крыс экспрессия натрий-кальциевого обменника возрастает в ходе эмбриогенеза, достигая максимальных значений на 18-е сутки пренатального периода и снижаясь до уровня взрослых к 20-му дню после рождения [38]. По данным других авторов максимальный уровень экспрессии NCX наблюдается у крысят в первые сутки после рождения и снижается до уровня взрослых уже к 12-му дню [16]. Ситуация осложняется еще и тем, что в нашем исследовании, при использовании системного введения ингибитора кальциевых каналов, мы неизбежно провоцируем изменения внутриклеточного гомеостаза кальция и, как следствие, изменения сопряженных с ним других ионных токов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В раннем постнатальном онтогенезе системное введение хлорида никеля, вызывающее нарушения кальциевого обмена, приводит к развитию патологического состояния с атипичным сердечным ритмом и нарушением дыхания. Возникающие дизритмии сходны с наблюдаемыми в перинатальный период у крыс после активации холинореактивных структур. Однако имеющиеся различия в характере возникающих патологических реакций могут свидетельствовать как о наличии общих звеньев, так и различий в механизмах развития аритмий.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны ведущему научному сотруднику Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН к.б.н. С.М. Короткову за ценные замечания при подготовке рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-0152-22-00.

ВКЛАД АВТОРОВ

С.В.К. осуществлял планирование, сбор и обработку данных, написание статьи. Н.Н.К. осуществляла подготовку и проведение экспериментов, а также обработку данных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kuznetsov SV* (1994) Reproduction of the Primary Rhythms of Excitation in Cardiac Activity of Neonatal Rat Pups. *Bull Exp Biol Med* 117 (4): 421–423. <https://doi.org/10.1007/BF02444201>
2. *Kuznetsov SV, Goncharov NV, Glashkina LM* (2005) Change of Parameters of Functioning of the Cardiovascular and Respiratory Systems in Rats of Different Ages under Effects of Low Doses of the Cholinesterase Inhibitor Phosfacol. *J Evol Biochem Physiol* 41 (2): 201–210. <https://doi.org/10.1007/s10893-005-0055-x>
3. *Sizonov VA, Dmitrieva LE* (2018) Heart Rhythm Disturbances Caused by Injection of Cholinesterase Inhibitor Physostigmine to Rats during the Early Ontogeny. *Bull Exp Biol Med* 165 (1): 44–47. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4095-9>
4. *Кузнецов СВ, Кузнецова НН, Гайдукова ПА* (2019) Влияние блокады медленных кальциевых каналов L-типа на показатели сердечной, дыхательной и моторной деятельности у интактных и подвергшихся интоксикации эзеринем новорожденных крысят. *Обзоры клин фармакол и лекарств терапии* 17: 39–49. [*Kuznetsov SV, Kuznetsova NN, Gaydukova PA* (2019) Influence of L-type slow calcium channels blockers on cardiac, respiratory and motor activity at the intact and poisoned by physostigmine (eserine) of rats during the early ontogeny. *Rev Clin Pharmacol Drug Therapy* 17: 39–49. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17816/RCF17339-49>
5. *Кузнецов СВ, Кузнецова НН* (2021) Влияние высоких доз убаина на показатели сердечной, дыхательной и моторной деятельности у новорожденных крысят. *Обзоры клин фармакол и лекарств терапии* 19: 395–403. [*Kuznetsov SV, Kuznetsova NN* (2021) Effects of high doses of ouabain on cardiac, respiratory, and motor activity at newborn rats. *Rev Clin Pharmacol Drug Therapy* 19: 395–403. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17816/RCF194395-403>
6. *Кузнецов СВ, Кузнецова НН* (2020) Онтогенетические особенности влияния дантролена и кофеина на показатели сердечной, дыхательной и моторной деятельности у интактных и подвергшихся интоксикации эзеринем крысят. *Обзоры клин фармакол и ле-*

- карств терапии 18: 139–148. [Kuznetsov SV, Kuznetsova NN (2020) Ontogenetic peculiarities of the effect of dantrolene and caffeine on the cardiac, respiratory and motor performance of intact and poisoned by physostigmine of rats. *Rev Clin Pharmacol Drug Therapy* 18: 139–148. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17816/RCF182139-148>
7. Massie BM (1997) Mibefradil: A Selective T-Type Calcium Antagonist. *Am J Cardiol* 80 (9A): 231–321.
[https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(97\)00791-1](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(97)00791-1)
 8. Hüser J, Blatter LA, Lipsius SL (2000) Intracellular Ca²⁺ release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells. *J Physiol* 524 (Pt2): 415–422.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00415.x>
 9. Perez-Reyes E (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiol Rev* 83: 117–161.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2002>
 10. Mangoni ME, Traboulsie A, Leoni AL, Couette B, Marger L, Le Quang K, Kupfer E, Cohen-Solal A, Vilar J, Shin HS, Escande D, Charpentier F, Nargeot J, Lory P (2006) Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking Ca_v3.1/α1G T-type calcium channels. *Circ Res* 98: 1422–1430.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000225862.14314.49>
 11. Mangoni ME, Nargeot J (2008) Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev* 88: 919–982.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2007>
 12. Ferron L, Capuano V, Ruchon Y, Deroubaix E, Coulombe A, Renaud JF (2003) Angiotensin II signaling pathways mediate expression of cardiac T-type calcium channels. *Circ Res* 93: 1241–1248.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000106134.69300.B7>
 13. Schaffer SW, Jong CJ (2015) Regulation of Cardiac Hypertrophy by T-Type Ca²⁺ Channel. In: *T-type Calcium Channels in Basic and Clinical Science* Springer-Verlag Wien 73–84.
<https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1413-1>
 14. Vassort G, Talavera K, Alvarez JL (2006) Role of T-type Ca²⁺ channels in the heart. *Cell Calcium* 640: 205–220.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.04.025>
 15. Suzuki S, Ohkusa T, Ono K, Sato T, Yoshida M, Yano M, Takebayashi S, Matsuzaki M (2007) Beneficial effects of the dual L- and T-type Ca²⁺ channel blocker efonidipine on cardiomyopathic hamsters. *Circ J* 71 (12): 1970–1976.
<https://doi.org/10.1253/circj.71.1970>
 16. Studer R, Reinecke H, Vetter R, Holtz J, Drexler H (1997) Expression and function of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger in postnatal development of the rat, in experimental-induced cardiac hypertrophy and in the failing human heart. *Basic Res Cardiol* 92 (1): 53–58.
<https://doi.org/10.1007/BF00794068>
 17. Ferron L, Capuano V, Deroubaix E, Coulombe A, Renaud JF (2002) Functional and molecular characterization of a T-type Ca⁽²⁺⁾ channel during fetal and postnatal rat heart development. *J Mol Cell Cardiol* 34: 533–546.
<https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.1535>
 18. Satoh H (1995) Role of T-type Ca²⁺ channel inhibitors in the pacemaker depolarization in rabbit sino-atrial nodal cells. *Gen Pharmacol* 26 (3): 581–587.
[https://doi.org/10.1016/0306-3623\(94\)00214-8](https://doi.org/10.1016/0306-3623(94)00214-8)
 19. Lee JH, Gomora JC, Cribbs LL, Perez-Reyes E (1999) Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block alpha1H. *Biophys J* 77 (6): 3034–3042.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77134-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77134-1)
 20. Kang HW, Park JY, Jeong SW, Kim JA, Moon HJ, Perez-Reyes E, Lee JH (2006) A Molecular Determinant of Nickel Inhibition in Cav3.2 T-type Calcium Channels. *J Biol Chem* 281 (8): 4823–4830.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M510197200>
 21. Haverinen J, Hassinen M, Dash NS, Vornanen M (2018) Expression of calcium channel transcripts in the zebrafish heart: dominance of T-type channels. *J Exp Biol* 221 (Pt10): jeb179226.
<https://doi.org/10.1242/jeb.179226>
 22. Kimura J, Miyamae S, Noma A (1987) Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea-pig. *J Physiol* 384: 199–222.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016450>
 23. Reppel M, Fleischmann BK, Reuter H, Pillekamp F, Schunkert H, Hescheler J (2007) Regulation of Na⁺/Ca²⁺ exchange current in the normal and failing heart. *Ann N Y Acad Sci* 1099: 361–372.
<https://doi.org/10.1196/annals.1387.065>
 24. Cheng H, Smith GL, Hancox JC, Orchard CH (2011) Inhibition of spontaneous activity of rabbit atrioventricular node cells by KB-R7943 and inhibitors of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase. *Cell Calcium* 49 (1): 56–65.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.11.008>
 25. Henderson RG, Durando J, Oller AR, Merkel DJ, Marone PA, Bates HK (2012) Acute oral toxicity of nickel compounds. *Regul Toxicol Pharmacol* 62 (3): 425–432.
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.02.002>
 26. Singh PP, Junnarkar AY (1991) Behavioural and toxic profile of some essential trace metal salts in mice and rats. *Ind J Pharmacol* 23: 153–159.
 27. Yan XM, Tao ZQ, Liang YY, Chen ZJ, Zhang JS, Xu XH (1998) Effect of catecholamic acid on detoxication and distribution of NiCl₂ in mice and rats. *Acta Pharmacol Sinica* 19 (1): 80–84.
 28. Leuranguer V, Monteil A, Bourinet E, Dayanithi G, Nargeot J (2000) T-type calcium currents in rat cardiomyocytes during postnatal development: contribution to hormone secretion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H2540–H2548.
<https://doi.org/10.1152/10.1152/ajpheart.2000.279.5.H2540>
 29. Xu X, Best PM (1992) Postnatal changes in T-type calcium current density in rat atrial myocytes. *J Physiol* 454 (1): 657–672.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp019285>
 30. Seki S, Nagashima M, Yamada Y, Tsutsuura M, Kobayashi T, Namiki A, Tohse N (2003) Fetal and postnatal development of Ca²⁺ transients and Ca²⁺ sparks in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 58 (3): 535–548.
[https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(03\)00255-4](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(03)00255-4)
 31. Escobar AL, Ribeiro-Costa R, Villalba-Galea C, Zoghbi ME, Perez CG, Mejia-Alvarez R (2004) Developmental changes of intracellular Ca²⁺ transients in beating rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286 (3): H971–H978.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00308.2003>

32. *Kuznetsov SV* (1995) N-cholinergic activation of periodic activity of excitable structures in early postnatal ontogenesis. *J Evol Biochem Physiol* 31 (2): 100–105.
33. *Chavez J, Vargas MH, Cruz-Valderrama JE, Montaña LM* (2011) Non-quantal release of acetylcholine in guinea-pig airways: role of choline transporter. *Exp Physiol* 96 (4): 460–467.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2010.056440>
34. *Miyawaki T, Goodchild AK, Pilowsky PM* (2003) Maintenance of sympathetic tone by a nickel chloride-sensitive mechanism in the rostral ventrolateral medulla of the adult rat. *Neuroscience* 116 (2): 455–464.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00705-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00705-4)
35. *Fan Y-P, Horn EM, Waldrop TG* (2000) Biophysical characterization of rat caudal hypothalamic neurons: calcium channel contribution to excitability. *J Neurophysiol* 84: 2896–2903.
<https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.6.2896>
36. *Del Negro CA, Morgado-Valle C, Hayes JA, Mackay DD, Pace RW, Crowder EA, Feldman JL* (2005) Sodium and Calcium Current-Mediated Pacemaker Neurons and Respiratory Rhythm Generation. *J Neurosci* 25 (2): 446–453.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2237-04.2005>
37. *Onimaru H, Ballanyi K, Richter DW* (1996) Calcium-dependent responses in neurons of the isolated respiratory network of newborn rats. *J Physiol* 491 (Pt 3): 677–695.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021249>
38. *Koban MU, Moorman AF, Holtz J, Yacoub MH, Boheler KR* (1998) Expressional analysis of the cardiac Na-Ca exchanger in rat development and senescence. *Cardiovasc Res* 37 (2): 405–423.
[https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(97\)00276-9](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(97)00276-9)

Effects Of Ni²⁺ On Cardiac And Respiratory Rhythms In Newborn Rats

S. V. Kuznetsov^{a, #}, and N. N. Kuznetsova^a

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

[#] *e-mail: ksv@iephb.ru*

The effect of Ni²⁺, a T-type low-threshold calcium channel (T-VDCC) and Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) blocker, on cardiac and respiratory rhythm parameters was studied in newborn rats aged 3–16 days (P3–16). A clear age dependence of the intensity of the arrhythmogenic effect arising from calcium channel blockade was found. In 3-day-old rats injected with NiCl₂ at a dose of 109 mg/kg (ED₁₀₀), a transient atypical cardiac rhythm, representing alternating periods of moderate bradycardia with a pathologically slow (up to 20–60 bpm) cardiac rhythm, occurs in 100% of animals. In parallel, a pronounced respiratory system dysfunction with a burst form of breathing develops. This symptom complex occurs in 75% of 10–14-day-old rats and is completely absent in 15–16-day-old animals. Phenomenologically similar cardiac rhythm disorders are observed in newborn rats after nickel chloride injection, during poisoning with acetylcholinesterase inhibitors, and activation of the central N-cholinergic structures. The obtained data suggest that in the early period of rat postnatal ontogenesis, impaired mechanisms of calcium metabolism may play a certain role in the development of arrhythmogenic disorders.

Keywords: newborn rats, dysrhythmia, heart rate, respiration, calcium channels, nickel chloride