

УДК 612.647 612.179.2 612.21

ИЗМЕНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ СЕРДЕЧНОГО РИТМА У ПЛОДОВ КРЫС (*RATTUS NORVEGICUS F. DOMESTICA*) ПРИ АКТИВАЦИИ ХОЛИНОРЕАКТИВНЫХ СТРУКТУР

© 2020 г. Н. Д. Вдовиченко^{1,*}, П. А. Гайдукова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: vdona@mail.ru

Поступила в редакцию 01.07.2019 г.

После доработки 18.10.2019 г.

Принята к публикации 25.10.2019 г.

Ключевые слова: пренатальный онтогенез, сердечный ритм, эзерин

DOI: 10.31857/S0044452920020102

Холинергическая система является одной из основных систем, обеспечивающих нормальное развитие организма. Известно, что в ходе раннего онтогенеза происходит ее морфологическое и функциональное становление [1]. Стадия закладки внутрисердечных ганглиев вегетативной нервной системы у зародышей крысы происходит до 14-го дня эмбриогенеза, а образование простых контактов преганглионарных волокон с нейробластами в ганглиях сердца происходит у крысы уже на 14–16-й день эмбриогенеза [2]. Установлено, что гуморальные влияния на функциональные показатели сердца крыс отмечаются уже в середине эмбрионального развития [3]. Однако, несмотря на обширные морфологические исследования развития холинергической системы, ее функциональное созревание и развитие холинергических влияний на сердечную деятельность, а также последствия нарушения нормального функционирования холинергической системы в пренатальный период остаются до сих пор недостаточно изученными. Большинство имеющихся экспериментальных работ посвящено изучению отдаленных последствий применения различных холинергических средств у беременных. В представленной работе мы рассматриваем изменение вагосимпатического баланса, но, учитывая, что парасимпатическая и симпатическая нервные системы в исследуемые сроки пренатального онтогенеза морфологически еще не полностью сформированы, под этим термином мы понимаем баланс между холинергическими и адренергическими влияниями.

Целью данной работы стало исследование параметров сердечного ритма у плодов крыс на 18–20-й день гестации (E18–E20) в условиях изменения уровня активности холинергических структур, вызванного уве-

личением количества ацетилхолина (АХ) вследствие ингибирования ацетилхолинэстеразы (АХЭ) эзеринном.

Исследования проводили в острых опытах на крысах линии Вистар в соответствии с положениями Российского национального комитета по биологической этике РАН. Результаты получены на 20 плодах от 8 самок; 11 плодов на E18 и 9 на E20. У самки, находящейся под слабым уретановым наркозом (ICN Biomedicals, Inc.) (1 г/кг) в сочетании с эпидуральной анестезией лидокаином (ОАО “Борисовский завод медицинских препаратов”) (10 мг/кг), через разрез в брюшной стенке извлекали матку и помещали ее в кювету с термостатированным ($37 \pm 0.2^\circ\text{C}$) физиологическим раствором. У двух плодов, извлеченных из матки с сохранением плацентарного кровообращения, одновременно регистрировали электрокардиограмму (ЭКГ). Параллельно регистрировали ЭКГ и внешнее дыхание у самки для контроля функционального состояния и его возможного влияния на активность плода. Активацию холинергических структур вызывали введением плодам ингибитора АХЭ эзерина (05211751 MP Biomedicals, США) в дозе 3 мг/кг внутривентриально. Выбранная доза эзерина является летальной для 100% новорожденных крысят (по данным, полученным в нашей лаборатории В.А. Сизоновым и Л.Е. Дмитриевой [4]) и среднесмертельной — для взрослой крысы. При выборе дозы исходили из соображения о необходимости наличия выраженной реакции сердечно-сосудистой системы плода на действие эзерина при минимальных изменениях состояния самки. Общее время наблюдения составляло 70–80 мин (30 мин — фоновая запись и 40–50 мин — после введения препарата, регистрацию физиологических показателей начинали сразу после инъекции). Ввод сигналов в компьютер осуществляли посредством АЦП E14-440

(фирма L-card, Россия) программа “Power Graph” (ООО “ДИСофт”, Россия). Период дискретизации АЦП составлял 0.5 мс, в дальнейшем прореживалось до 1 мс, эпоха анализа 10 мин. Общее время исследования для каждого плода составляло от 40 до 120 мин. Преобразование ЭКГ в периодограмму и другую цифровую обработку регистрируемых сигналов проводили в программах “PowerGraph 3.3.8” и “Origin 7.5” (OriginLab Corporation, США) с помощью разработанных в нашей лаборатории оригинальных алгоритмов с использованием пакета анализа данных этих программ. Для анализа фона выбирали 10-ти минутные фрагменты, наиболее близкие к моменту введения эзерина и не содержащие экстрасистол, а также значительных колебаний ЧСС, связанных с изменениями в сердечной или дыхательной деятельности самки. После введения эзерина анализу подвергались 10-ти минутные фрагменты, выбранные из участка записи с 6-й по 20-ю минуту (период максимального эффекта эзерина). Спектральный анализ периодограмм ритма сердца (32 768 точек) осуществляли по алгоритму быстрого преобразования Фурье (БПФ) с использованием окна Уолша (Welch), с последующей нормализацией и усреднением спектров. Сердечную деятельность оценивали по частоте сердечных сокращений (ЧСС) и по показателям вариабельности сердечного ритма (ВСР). Анализ показателей ВСР применяется для выявления и оценки периодических составляющих колебаний сердечного ритма. Анализ выполняли по трем частотным диапазонам, выбранным на основании литературных и собственных экспериментальных данных [5]: HF 0.8–2.5 Гц, LF 0.3–0.8 Гц, VLF 0.03–0.3 Гц. Колебания HF принято считать высокочастотной составляющей, физиологически связанной с парасимпатическим влиянием на сердце. LF – низкочастотные колебания, преимущественно связанные с симпатическим фактором. Колебания VLF позволяют судить о присутствии гуморально-метаболического влияния на сердечно-сосудистую систему. Статистическая обработка данных осуществлялась стандартными методами в программе “Origin7.5”. Использовали парный тест Стьюдента с поправками Холма. Статистически обработанные данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Все изменения рассматривали по отношению к фоновым показателям тех же плодов до введения препарата. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

В сердечной деятельности интактных плодов крыс между 18 и 20 днями гестации происходят изменения, отражающие процесс развития сердечной системы и установления ее связей с другими функциональными системами [6]. В этот период на 34% увеличивается ЧСС, у плодов на E20 происходит снижение выраженности медленноволновых колебаний сердечного ритма, характерных для плодов на E18. Децелерации, являющиеся характерной реакцией сердца на движение у плодов на

E18, сменяются акселерациями на E20. Различия в сердечной деятельности плодов на E18 и E20 выявил и анализ ВСР. В фоне на E18 в спектре преобладает VLF диапазон. На E20 отмечен рост всех показателей ВСР (табл. 1). Общая мощность спектра (T_0) увеличивается на 83%, мощность LF увеличивается в 2 раза, HF в 5 раз. Меньше всего меняется мощность VLF, она возрастает всего на 5.3%. Плоды на E20 были разделены на 2 подгруппы, так как между ними наблюдались достоверные различия (рис. 1 (а, 3, 4)). Распределение животных осуществляли, опираясь на анализ ВСР. У первой группы (22% плодов) спектр смещен в сторону HF диапазона и T_0 в несколько раз превышает этот же показатель второй группы (78% плодов), в которой преобладает диапазон VLF. Таким образом, у плодов исследованных возрастов доминирующими являются гуморально-метаболические влияния. По мере увеличения гестационного срока влияние холинергической системы увеличивается.

Введение эзерина вызывает уменьшение ЧСС на E18 – на 30%, а на E20 – на 24%. Визуальный анализ периодограмм свидетельствует о появлении периодических децелераций у 18-ти и 20-ти суточных плодов в течение всего времени наблюдения, максимальная амплитуда отмечена в первые несколько минут после инъекции. Существенные изменения наблюдали в спектре ВСР. У плодов на E18 происходит рост как T_0 , так и всех ее составляющих. Доля HF после введения эзерина увеличивается на 60%, VLF – на 20%. Самое значительное увеличение претерпевает LF на 175%, что приводит к увеличению почти в 2 раза коэффициента LF/HF. Несмотря на перераспределение регуляторных влияний, преобладающим все равно остается гуморально-метаболическое (рис. 1а, 1б). На E20 реакция плодов на введение эзерина полностью меняется. Общая мощность спектра уменьшается более чем в 5 раз у плодов первой подгруппы и в полтора – у второй. Больше всего снижается вклад холинергических и симпатических воздействий. Мощность HF уменьшается на 97% у первой подгруппы и на 90% у второй, LF – на 88 и 62% соответственно. Сильно сокращается их доля в общем спектре, особенно HF – в среднем в 7 раз, что приводит к росту коэффициента LF/HF. Снижение HF также приводит к значительному уменьшению коэффициента HF/ T_0 . Мощность VLF уменьшаются на 27% у животных первой подгруппы и на 10% – у второй. Вместе с тем следует учитывать, что доля VLF-диапазона в общей мощности спектра возрастает после инъекции эзерина на 290 и 25% соответственно. Таким образом, введение эзерина плодам на 18–20-й плодный день вызывает разнонаправленные изменения в работе холинореактивных структур. У плодов на E18 происходит рост общей мощности спектра и всех его составляющих, а на E20, наоборот, снижение всех показателей. При этом у плодов обеих возрастных групп преобладающим остается гуморально-метаболическое влияние. Ра-

Таблица 1. Показатели вариабельности сердечного ритма и ЧСС плодов разного срока гестации после инъекции эзерина (3 мг/кг)

| Показатели | Срок гестации | | | | | | | | | | | |
|--------------|----------------|------------------|----------------|------------------|-------------------|-----------------|-------------------|------------------|--|--|--|--|
| | E18 | | E20 | | E20 (Подгруппа 1) | | E20 (Подгруппа 2) | | | | | |
| | фон | опыт | фон | опыт | фон | опыт | фон | опыт | | | | |
| VLF (y.e.) | 7.491 ± 0.52 | 8.95 ± 1.462** | 7.902 ± 1.071 | 6.687 ± 0.636 | 10.438 ± 3.356 | 7.591 ± 0.049 | 7.177 ± 1.019 | 6.428 ± 0.802*** | | | | |
| LF (y.e.) | 0.912 ± 0.408 | 2.508 ± 0.972 | 1.895 ± 0.944 | 0.344 ± 0.106 | 6.507 ± 2.078 | 0.774 ± 0.329* | 0.577 ± 0.139 | 0.221 ± 0.054* | | | | |
| HF (y.e.) | 1.758 ± 0.845 | 2.815 ± 1.422 | 8.857 ± 5.002 | 0.348 ± 0.117 | 33.484 ± 10.508 | 0.916 ± 0.168* | 1.821 ± 0.705 | 0.186 ± 0.047* | | | | |
| To (y.e.) | 10.161 ± 1.635 | 14.272 ± 3.125* | 18.654 ± 6.707 | 7.379 ± 0.75 | 50.429 ± 15.941 | 9.281 ± 0.209* | 9.575 ± 1.79 | 6.835 ± 0.86** | | | | |
| VLF (% к To) | 74 | 63 | 42 | 90 | 21 | 82 | 75 | 94 | | | | |
| LF (% к To) | 9 | 17 | 10 | 5 | 13 | 8 | 6 | 3 | | | | |
| HF (% к To) | 17 | 20 | 48 | 5 | 66 | 10 | 19 | 3 | | | | |
| LF/HF (y.e.) | 0.518 | 0.891 | 0.214 | 0.986** | 0.194 | 0.845 | 0.317 | 1.184** | | | | |
| HF/To (y.e.) | 0.173 ± 0.037 | 0.197 ± 0.045*** | 0.475 ± 0.079 | 0.047 ± 0.012*** | 0.664 ± 0.002 | 0.099 ± 0.02*** | 0.19 ± 0.036 | 0.027 ± 0.005*** | | | | |
| ЧСС (уд/мин) | 227.8 ± 5.9 | 158.9 ± 10.4*** | 305.3 ± 4.5 | 231 ± 12.4*** | 292.6 ± 1.4 | 226.6 ± 20.8*** | 308.9 ± 5.0 | 232.2 ± 15.6*** | | | | |

Примечание. Значения показателей VLF, LF, HF, To даны в нормированном виде (максимумы мощности индивидуальных спектров приняты за 1). Дополнительно диапазоны VLF, LF, HF представлены в процентах к общей мощности спектра. Коэффициенты HF/To, LF/HF рассчитаны исходя из нормализованных показателей LF, HF и To.

Звездочками отмечена достоверность различий между фоном и опытом: * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.001$. Достоверность различий для показателя LF/HF рассчитывалась по усредненным индивидуальным значениям для каждого животного.

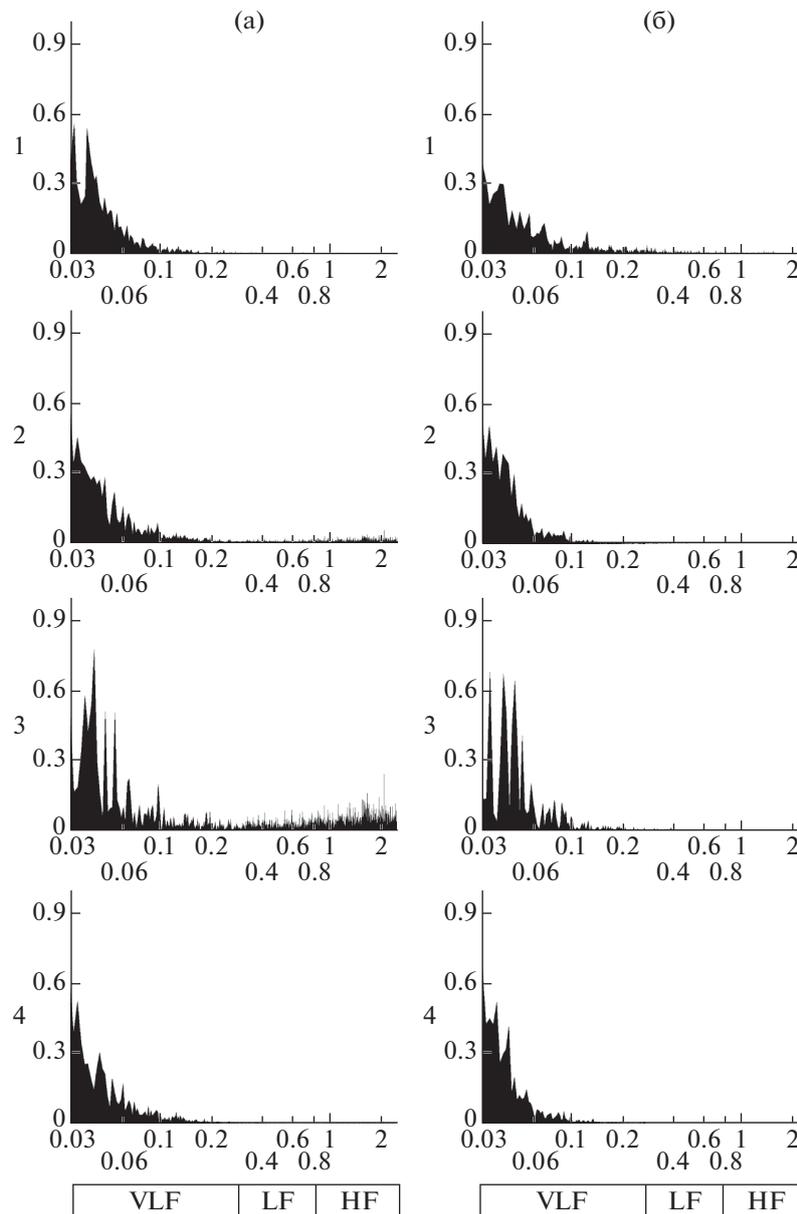


Рис. 1. Усредненные спектры периодограмм сердечного ритма в фоне (а) и после введения эзерина (б) у плодов разного срока гестации: 1 – на E18, 2 – на E20, 3 – у 1-й подгруппы плодов на E20, 4 – у 2-й подгруппы плодов на E20.

По оси абсцисс – частота колебаний (Гц), под шкалой показано деление спектра на частотные диапазоны для анализа ВСР. По оси ординат – мощность спектра, нормализованная до 1 (у.е.). Ось абсцисс представлена логарифмической шкалой от 0.03 до 2.5.

нее было показано, что у однодневных новорожденных крысят реакция сердечно-сосудистой системы на введение эзерина сходна с наблюдаемой нами на E20 [7].

Функциональное созревание периферического нервного аппарата миокарда заканчивается в эмбриональном периоде до возникновения центральных симпатических и парасимпатических влияний. Парасимпатическая иннервация в сердце крыс выявляется еще в эмбриональный период и полностью формируется ко второму месяцу постнатального онтогенеза, тогда как признаки функ-

циональной зрелости симпатической иннервации выявляются к 3–4-й неделе после рождения [1, 2, 8, 9]. Из анализа полученных нами данных видно, что уже на E18 активация холинергической системы вызывает отрицательный хронотропный эффект, что может свидетельствовать о достаточном созревании холинорецепторов и их включении в регуляцию ритма сердца плодов крыс. Увеличение мощности высокочастотных (HF) колебаний, а также их доли в общем спектре на 20-й день гестации могут быть первыми признаками начала работы парасимпатической системы. Вместе с тем зна-

чительную роль в регуляции сердечного ритма продолжают играть гуморально-метаболические факторы. В пользу этого свидетельствует усиление мощности VLF-диапазона после инъекции животным эзерина, связанное с избытком АХ, который может оказывать несинаптическое действие на холинореактивные структуры сердца [10].

Таким образом, установлено, что в последние дни пренатального развития у плодов крыс наблюдаются первые признаки созревания парасимпатической регуляции сердечного ритма, сосуществующей на E20 с доминирующими более ранними гуморальными влияниями.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (“Механизмы формирования физиологических функций в фило- и онтогенезе и влияние на них эндогенных и экзогенных факторов”, тема № АААА-А18-118012290373-7).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hasan W.* Autonomic cardiac innervations. *Organogenesis*. 9 (3): 176–193. 2013.
2. *Швалев В.Н., Сосунов А.А., Гуски Г.* Морфологические основы иннервации сердца. М. Наука. 1992. [*Shvalev V.N., Sosunov A.A., Guski G.* Morfologicheskie osnovy innervatsii serdtsa [Morphological bases of cardiac innervation]. Moscow. Nauka. 1992.]
3. *Чиглинцев В.М.* Влияние стимуляции блуждающих нервов на показатели сердечной деятельности и содержание оксида азота у растущих гипокинезированных и десимпатизированных крыс. Нижневартовск. Изд-во Нижневарт. гос. ун-та. 2013. [*Chiglintsev V.M.* Vliyanie stimulyatsii bluzhdayushchikh nervov na pokazateli serdechnoy deyatelnosti i soderzhanie oksida azota u rastushchikh gipokinezirovannykh i desimpatizirovannykh kryis [Effect of vagus stimulation on indicators of cardiac activity and content of nitrogen oxide in growing rats of hypokinesis and desympatized]. Nizhnevartovsk. Izdatelstvo Nizhnevartovskogo gosudarstvennogo universiteta. 2013. (in Russ.)]
4. *Сизонов В.А., Дмитриева Л.Е.* Нарушения ритма сердца, вызванные инъекцией ингибитора холинэстеразы эзерина в раннем онтогенезе крыс. *Бюл. exper. биол. и мед.* 165 (1): 52–56. 2018. [*Sizonov V.A., Dmitrieva L.E.* Heart rhythm disturbances caused by injection of cholinesterase inhibitor physostigmine to rats during the early ontogeny. *Bull. Exp. Biol. Med.* 165 (1): 44–47. 2018. (in Russ.)]
5. *Кузнецов С.В., Гончаров Н.В., Глашкина Л.М.* Изменение параметров функционирования сердечно-сосудистой и дыхательной систем у крыс разного возраста под воздействием малых доз ингибитора холинэстераз фосфакола. *Ж. эвол. биохим. и физиол.* 41 (2): 160–167. 2005. [*Kuznetsov S.V., Goncharov N.V., Glashkina L.M.* Changes of parameters of functions of respiratory and cardiovascular systems of different age rats under influence of small doses of cholinesterase inhibitor Phosphacol. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 41 (2): 201–210. 2005. (in Russ.)]
6. *Тимофеева О.П., Вдовиченко Н.Д., Кузнецов С.В.* Динамика становления ритмической активности сердца у плодов и новорожденных крыс. *Бюл. exper. биол. и мед.* 152 (10): 373–378. 2011. [*Timopheeva O.P., Vdovichenko N.D., Kuznetsov S.V.* Dynamics of the formation of rhythmic activity of the heart in fetuses and newborn rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 152 (4): 397–401. 2012. (in Russ.)]
7. *Сизонов В.А., Дмитриева Л.Е., Кузнецов С.В.* Влияние блокады М-холинорецепторов на функциональную активность моторной, сердечной и дыхательной систем новорожденных крысят при активации холинореактивных структур. *Ж. эвол. биохим. физиол.* 55 (3): 179–187. 2019. [*Sizonov V.A., Dmitrieva L.E., Kuznetsov S.V.* The Effect of M-Cholinoreceptor Blockade on Functional Activity of Somatomotor, Cardiovascular and Respiratory Systems in Newborn Rats upon Activation of Cholinoreactive Structures. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 55 (3): 198–207. 2019. (in Russ.)]
8. *Чумасов Е.И., Евлахов В.И., Коржевский Д.Э.* Современные представления об иннервации сердца и ее участии в регуляции системной гемодинамики. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 11 (1): 9–14. 2012. [*Chumasov Ye.I., Yevlakhov V.I., Korzhevskiy D.E.* Sovremennyye predstavleniya ob innervatsii serdtsa i yego uchastii v regulyatsii sistemnoy gemodinamiki. *Regionarnoye krovoobrashcheniye i mikrot-sirkulyatsiya*. 11 (1): 9–14. 2012. (in Russ.)]
9. *Olshansky B., Sabbah H.N., Hauptman P.J., Colucci W.S.* Parasympathetic nervous system and heart failure: pathophysiology and potential implications for therapy. *Circulation*. 118 (8): 863–871. 2008.
10. *Abramochkin D.V., Borodinova A.A., Rosenshtraukh L.V., Nikolsky E.E.* Both neuronal and non-neuronal acetylcholine take part in non-quantal acetylcholine release in the rat atrium. *Life Sci*. 91 (21–22): 1023–1026. 2012.

Changes in Heart Rhythm Parameters in Rat Fetuses (*Rattus norvegicus F. Domestica*) after Activation of Cholinoreactive Structures

N. D. Vdovichenko^{a,*} and P. A. Gaidukova^a

^a *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*
*e-mail: vdona@mail.ru