

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НАРУШЕНИЙ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ
СЕРДЕЧНОГО РИТМА, ВЫЗВАННЫХ У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС
ХЛОРИДОМ НИКЕЛЯ И ИНГИБИТОРОМ
АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЭЗЕРИНОМ

© 2023 г. С. В. Кузнецов¹, *, Н. Н. Кузнецова¹

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

*E-mail: ksv@iephb.ru

Поступила в редакцию 10.05.2023 г.

После доработки 02.07.2023 г.

Принята к публикации 04.07.2023 г.

В экспериментах на 3-дневных новорожденных крысятах проведен сравнительный анализ показателей variability сердечного ритма (ВСР) после инъекции животным ингибитора ацетилхолинэстеразы (АХЭ) эзерина ($\frac{3}{4}$ LD₅₀) и блокатора кальциевых каналов Т-типа (Т-VDCC) Ni²⁺ (ED₁₀₀). Оба препарата вызывают возникновение феноменологически сходного патологического сердечного ритма с выраженными брадикардическими комплексами (ПСРБК). Анализ показателей ВСР показал, что нарушение механизмов регуляции сердечного ритма при отравлении крысят NiCl₂ и при активации холинореактивных структур, вызванных ингибированием АХЭ, развиваются по сходной схеме. В обоих случаях наблюдается падение общей мощности спектра и абсолютных значений мощности диапазонов LF (преимущественно симпатические) и HF (парасимпатические влияния). Значительное падение уровня нервных влияний приводит к тому, что доминирующую роль в регуляции сердечного ритма начинают играть нейрогуморальные факторы (VLF-диапазон). Установлено, что в условиях премедикации Н- или М-холинолитиками, в тех случаях, когда у крысят не развиваются нарушения сердечного ритма, общим является первоначальное снижение выраженности нейрогуморальных и последующее увеличение симпатических и, в меньшей степени, парасимпатических влияний. При этом состояние вагосимпатического баланса не является определяющим. В том случае, когда после премедикации влияние нейрогуморальных факторов усиливается, то в дальнейшем происходит снижение доли нервных влияний и возникновение ПСРБК. Полученные данные позволяют полагать, что у новорожденных крысят как прямая блокада Т-VDCC, так и опосредуемое через М₃-подтип мускариновых холинорецепторов изменение тока I_{CaT}, приводит к нарушению работы пейсмекеров и развитию ПСРБК.

Ключевые слова: новорожденные крысы, дизритмия, variability сердечного ритма, кальциевые каналы, хлорид никеля, холинэргическая система, эзерин, холинолитики

DOI: 10.31857/S0869813923080058, EDN: LQQYSP

ВВЕДЕНИЕ

В раннем перинатальном онтогенезе крыс у 60% плодов и 25% интактных новорожденных животных наблюдается возникновение нерегулярных брадикардиче-

ских колебаний сердечного ритма с длительностью в несколько секунд [1, 2]. Количество и амплитуда брадикардических комплексов резко усиливается после инъекции животным ингибиторов ацетилхолинэстеразы (АХЭ) фосфакола или эзерина, что приводит к развитию патологического сердечного ритма с выраженными брадикардическими комплексами (ПСРБК) и часто становится причиной гибели животного [2, 3]. При изучении влияния на сердечный ритм новорожденных крысят никеля, являющегося блокатором низкоамплитудных кальциевых каналов Т-типа (T-type voltage-dependent Ca^{2+} channel, T-VDCC), мы обнаружили, что его введение также приводит к возникновению ПСРБК, феноменологически сходного с “эзериновой” аритмией. Вызванный хлоридом никеля (NiCl_2) ПСРБК имеет отчетливую возрастную динамику, возникает у 100% 3-дневных крысят и не наблюдается после 15-го дня постнатального развития [4].

В мировой литературе отсутствуют исследования, посвященные изучению нарушений механизмов регуляции сердечного ритма у новорожденных животных после отравления ионами никеля. Более того, имеется крайне мало публикаций, касающихся влияния никеля на вариабельность сердечного ритма (ВСР) у взрослых животных и человека. Имеющиеся работы рассматривают последствия подострых и хронических интратрахеальных воздействий сульфата никеля [5] или мелкодисперсных твердых частиц, включающих в том числе и никель [6, 7].

Таким образом, основной задачей нашего исследования стало проведение анализа динамики изменения показателей ВСР у 3-дневных крысят в условиях блокады ионами никеля кальциевых каналов. Это должно способствовать раскрытию механизмов, приводящих к развитию у новорожденных патологической аритмии. Учитывая тот факт, что возникновение ПСРБК, вызванного эзеринном, может быть остановлено предварительной блокадой М- (М-ХР) [8] или Н-холинорецепторов (Н-ХР) [9], мы предположили, что премедикация холиноблокаторами может оказаться эффективной и при отравлении крысят никелем. Поэтому дополнительное внимание было уделено изучению сдвигов показателей ВСР после премедикации животных холинолитиками с последующим введением NiCl_2 .

МЕТОДЫ ИСЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования

Работа выполнена на крысятах *Rattus norvegicus f. domestica* 3-дневного возраста. Всего в опытах использовано 58 крысят с массой тела 9.2 ± 0.2 г без разделения по полу. Все экспериментальные процедуры соответствовали требованиям Комитета по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (Протокол № 7-2/2020), 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 и 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 экскурсии грудной клетки с использованием пьезоэлектрического датчика VP-102 (RTF, Германия). В экспериментах использовали усилители био-

потенциалов ИУ-40 (производство ЭПМ НИИЭМ РАМН). ЧДД регистрировали при полосе пропускания усилителя от 0.15 до 30 Гц, ЭКГ – от 5 до 150 Гц. Для ввода аналоговых сигналов в компьютер использовали АЦП Е14-440 (L-card, Россия) с периодом дискретизации 1 мс. Построение периодограмм сердечного ритма и анализ регистрируемых сигналов проводили в программе “PowerGraph 3.3.11” (ООО “ДИСофт”, Россия) и “Origin 2019” (OriginLab Corporation, США). Спектральный анализ периодограмм осуществляли по алгоритму быстрого преобразования Фурье по 32768 точкам с использованием окна Уолша (Welch). Сердечную деятельность оценивали по двум параметрам – средней частоте сердечных сокращений (ЧСС) и показателям ВСР. Анализ ВСР осуществляли, исходя из адаптированного для новорожденных крысят [3, 8, 9] разделения спектра периодограмм на следующие диапазоны: VLF – 0.03–0.3 Гц; LF – 0.3–0.8 Гц; HF – 0.8–2.5 Гц.

Использованные фармакологические препараты

В процессе исследования было проведено 7 серий экспериментов. У интактных крысят после 15-минутного периода адаптации в течение 30 мин регистрировали сердечный и дыхательный ритм. После регистрации фоновых физиологических показателей первой группе крысят внутрибрюшинно вводили шестиводный хлористый никель (7791-20-0, Sigma-Aldrich) в дозе 109 мг/кг (в пересчете на безводный NiCl_2). По полученным нами ранее данным, эта доза вызывает у 100% 3-дневных крысят единообразные изменения сердечного и дыхательного ритма [4]. Второй группе крысят осуществлялось внутрибрюшинное введение ингибитора АХЭ эзерина (Physostigmine, “MP Biomedical”, США) в дозе 1.3 мг/кг ($\frac{3}{4}$ LD₅₀), которая позволяла получить четкую реакцию исследуемых систем на действие эзерина при минимальном (менее 20%) уровне смертности животных [2]. Регистрацию сердечного и дыхательного ритмов проводили в течение 30 мин. Данная эпоха анализа была выбрана исходя из ранее полученных данных о длительности максимально выраженной реакции крысят на введение эзерина и хлорида никеля [2, 4]. Для оценки динамики развития изменений физиологических показателей (ЧСС, ВСР) 30-минутную запись разбивали на 3 фрагмента по 10 мин. При последующей обработке часть записей была отбракована из-за наличия артефактов в периодограммах сердечного ритма во время аритмии, в итоге для окончательного анализа были отобраны данные, полученные на 44 крысятах.

В дополнительных сериях экспериментов перед введением крысятам NiCl_2 осуществляли премедикацию животных одним из нижеперечисленных препаратов: Н-холинолитиком бензогексонием (Hexamethonium, гексаметония бензосульфонат “Вектор ГНЦ вирусологии и биотехнологии”, Россия) внутрибрюшинно в дозах 1 и 20 мг/кг; селективным Н-холинолитиком преимущественно центрального действия этерофеном (1-(diethylamino)butan-2-yl 2,2-diphenylacetate, (ИЭМ-506)) в дозе 10 мг/кг в/бр; неселективным М-холинолитиком атропином (A0132 Sigma-Aldrich, США) (1 мг/кг, в/бр). Введение хлорида никеля проводили через 15 мин при премедикации этерофеном и через 20 мин – в случае бензогексония или атропина. Расчеты показателей ЧДД, ЧСС и ВСР осуществляли по 10-минутным фрагментам записей, сделанным непосредственно перед инъекцией NiCl_2 . Общее время исследования каждого животного составляло от 90 до 95 мин.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных осуществляли в программе “Origin 2019”. Статистически обработанные данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка ($M \pm SEM$). После проверки нормальности распределения, выполненной

по критерию Шапиро–Уилка, для определения достоверности различий между группами использовали парный тест Стьюдента и, в ряде случаев, однофакторный дисперсионный анализ, при отсутствии нормального распределения и при анализе показателей ВРС использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Все изменения рассматривали по отношению к фоновым показателям до введения препарата. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ ВРС после инъекции эзерина и хлорида никеля

Возникновение ПСРБК после инъекции новорожденным крысам ингибиторов АХЭ было подробно описано нами ранее [2, 3]. В настоящем исследовании введение эзерина, как препарата сравнения, выполнялось с целью сопоставления динамики изменения показателей ВРС после повышения уровня активации холинореактивных структур (ХРС) и после введения крысам NiCl_2 , осуществляемых в одинаковых условиях проведения экспериментов. Анализ полученных данных показал, что после введения препаратов у животных наблюдаются качественно и количественно сходные изменения как периодограмм сердечного ритма, так и их спектров (рис. 1).

При отравлении крысят эзеринотом ЧСС достоверно падает за время наблюдения в среднем на 47% (с 248.7 ± 4.8 до 132.5 ± 16.8 в мин), а ЧДД – на 55% (с 81.3 ± 2.7 до 36.9 ± 3.4 в мин). Сопоставимое снижение частоты сердцебиений и дыхания наблюдаются у животных на протяжении 30 мин после инъекции хлорида никеля. Предварительное введение холиноблокаторов также приводит к снижению ЧСС и ЧДД, которое продолжается и после инъекции крысам NiCl_2 (табл. 1). Видно, что практически во всех случаях угнетение частоты дыхания оказывается более выраженным, чем степень развивающейся брадикардии.

Развитие брадикардии у крысят может быть связано с изменениями вагосимпатического баланса (ВСБ). Вместе с тем известно, что у новорожденных крысят созревание парасимпатических и симпатических влияний на сердце еще окончательно не закончено. Для оценки баланса гуморально-метаболических и нервных влияний на активность сердечных пейсмекеров нами был проведен анализ ВРС.

Следует отметить, что даже у взрослых животных интерпретация генеза волн разных частотных диапазонов различается при трактовке результатов разными исследователями. При работе с новорожденными крысами эта проблема становится еще более острой. Поэтому, основываясь на данных литературы и наших собственных исследований [3, 8–10], при дальнейшем обсуждении мы будем придерживаться следующей классификации: диапазон VLF отражает вклад различных нейрогуморальных (церебральных эрготропных, гуморально-метаболических и др.) факторов и центральных симпатoadреналовых влияний; LF формируется преимущественно симпатическими влияниями с возможным включением и парасимпатического элемента; HF-диапазон в значительной мере является отражением дыхательной аритмии и связан преимущественно с парасимпатическими влияниями.

Установлено, что при интоксикации эзеринотом идет постепенное развитие реакции, достигающее максимума в последний триместр наблюдения. Максимум реакции после инъекции хлорида никеля наблюдается в первые 20 мин после инъекции. В обоих случаях мы наблюдаем падение общей мощности спектра и абсолютных значений мощности диапазонов LF и HF (табл. 2, рис. 2а, б). Значительное, на 70–76%, снижение уровня нервных влияний приводит к тому, что доминирующую роль в регуляции сердечного ритма начинают играть нейрогуморальные факторы. Падение парасимпатических влияний на 54–55% приводит к смещению ВСБ в сторону усиления симпатических нервных влияний (табл. 2, рис. 3а, б). В целом,

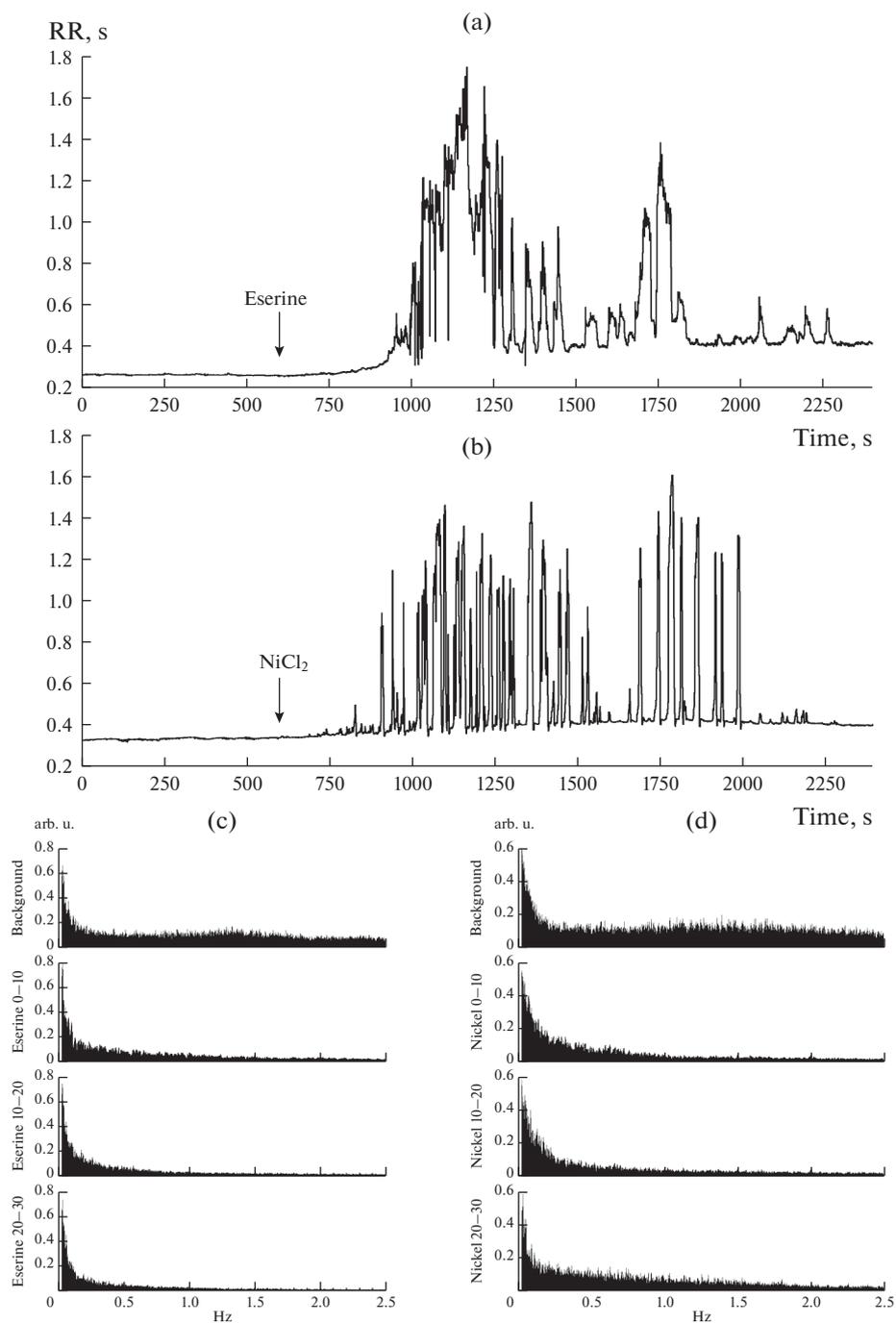


Рис. 1. Индивидуальные периодограммы сердечного ритма у 3-дневных крысят после введения им эзерина (а) и NiCl₂ (б). Усредненные спектры периодограмм до и после введения эзерина (с) и NiCl₂ (д). Стрелки на (а) и (б) указывают момент инъекции препаратов.

Таблица 1. ЧСС и ЧДД у интактных 3-дневных крысят до и после фармакологических воздействий

Показатель (в мин)	Группа, (эпоха анализа)				
	Фон (10 мин)	Премедикация (10 мин)	% к фону	Никель (<i>n</i> = 9) (30 мин)	% к фону
ЧСС	268.6 ± 24.6	—	—	188.8 ± 12.0*	70
ЧДД	75.8 ± 7.4	—	—	35.6 ± 3.7*	51
Бензогексоний 1 мг/кг (<i>n</i> = 7)					
ЧСС	307.8 ± 5.7	270.5 ± 12.5*	88	246.0 ± 6.0*	80
ЧДД	80.1 ± 2.4	61.8 ± 5.8*	77	23.3 ± 1.8*	29
Бензогексоний 20 мг/кг (<i>n</i> = 6)					
ЧСС	287.3 ± 16.0	206.0 ± 16.2*	70	203.6 ± 11.1*	70
ЧДД	82.5 ± 7.3	73.0 ± 8.7	90	35.7 ± 2.4*	46
Этерофен (<i>n</i> = 7)					
ЧСС	266.0 ± 12.7	221.7 ± 15.9	83	189.7 ± 14.8*	71
ЧДД	73.5 ± 7.2	63.3 ± 7.3	86	40.5 ± 3.6*	56
Атропин (<i>n</i> = 8)					
ЧСС	305.7 ± 16.7	245.3 ± 17.3*	81	202.5 ± 11.2*	67
ЧДД	81.3 ± 14.8	60.0 ± 7.8	78	47.0 ± 5.8	63

Здесь и в табл. 2–5: * $p < 0.05$ – достоверность различий между фоном и опытом. ЧДД – частота дыхательных движений, ЧСС – частота сердечных сокращений.

анализ ВСР показал, что нарушение механизмов регуляции сердечного ритма при отравлении крысят NiCl_2 и при активации ХРС, вызванных ингибированием АХЭ, развиваются по очень сходной схеме.

Начиная свое исследование, мы рассматривали возникновение ПСРБК, вызванное активацией ХРС после ингибирования АХЭ, как в определенной степени эталонный процесс, который может иметь общие звенья или общие конечные точки приложения с патологической аритмией, наблюдаемой у крысят после инъекции NiCl_2 . Известно, что к моменту рождения у крысы существует период потенциального вегетативного дисбаланса, когда парасимпатическая иннервация сердца установлена, но симпатическая иннервация еще не развита. В этот период у крысят отмечается положительный хронотропный ответ при активации М-ХР, а в крови могут циркулировать катехоламины из мозгового слоя надпочечников, и это будет в первую очередь адреналин, а не норадреналин [11]. В экспериментах на 2-дневных крысятах нами было установлено, что после однократного введения ингибитора АХЭ фосфакола (параоксона) в дозе 1 мг/кг ($1/25$ ЛД₅₀) наблюдается достоверное, на 68% угнетение активности АХЭ эритроцитов и на 93% от уровня интактных животных – бутирилхолинэстеразы плазмы крови, что должно сопровождаться повышением количества вне- и внутрисинаптического АХ [3].

В экспериментах на 1–8-недельных крысятах была показана важная роль М₃-под-типа холинорецепторов в регуляции сердечного ритма новорожденных крысят. Установлено, что именно М₃-, а не М₂-ХР участвуют в регуляции хронотропной функции сердца. Установлено, что в отличие от 3-недельных и более взрослых крыс, у 7-дневных животных блокада М₃-ХР вызывает урежение ЧСС, что может

Таблица 2. Изменение показателей ВСП у 3-дневных крысят после введения NiCl₂ и эзерина

Показатели	Фон	Препарат, период исследования		
		0–10	10–20	20–30
		NiCl₂ (n = 9)		
VLF (y.e.)	33.23 ± 4.44	34.84 ± 5.57	32.33 ± 5.89	27.30 ± 3.59*
LF (y.e.)	30.67 ± 3.89	21.94 ± 6.88*	16.93 ± 4.84*	26.07 ± 7.07*
HF (y.e.)	103.29 ± 10.65	22.53 ± 5.53*	23.27 ± 7.54*	39.56 ± 13.51*
To (y.e.)	167.18 ± 12.50	79.32 ± 17.20*	72.53 ± 17.21*	92.93 ± 23.21*
VLF, %	19.9	43.9	44.6	29.4
LF, %	18.3	27.7	23.3	28.0
HF, %	61.8	28.4	32.1	42.6
LF/HF, y.e.	0.297	0.974	0.727	0.659
ЧСС в мин	268.6 ± 24.6	222.9 ± 16.0	176.1 ± 17.5*	167.3 ± 14.1*
		Эзерин (n = 7)		
VLF (y.e.)	29.23 ± 3.44	31.39 ± 2.88	31.03 ± 1.74	26.54 ± 1.56
LF (y.e.)	26.21 ± 3.17	22.29 ± 3.72*	15.82 ± 1.21*	12.02 ± 1.42*
HF (y.e.)	81.66 ± 8.78	28.89 ± 7.25*	17.09 ± 1.21*	14.02 ± 1.13*
To (y.e.)	137.10 ± 14.52	82.57 ± 10.14*	63.94 ± 3.85*	52.58 ± 3.32*
VLF, %	21.3	38.0	48.6	50.4
LF, %	19.1	27.0	24.7	22.9
HF, %	59.6	35.0	26.7	26.7
LF/HF, y.e.	0.321	0.772	0.926	0.858
ЧСС в мин	248.7 ± 4.8	161.9 ± 13.5*	103.9 ± 11.2*	131.6 ± 9.7*

Здесь и в табл. 3–5: эпоха анализа 10 мин. 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 от общей мощности спектра.

быть связано с особенностями иннервации сердца в этом возрасте [12, 13]. Эти данные нашли подтверждение в экспериментах, выполненных на препаратах предсердного и желудочкового миокарда однодневных, трехнедельных и взрослых крыс. Стимуляция M₃ подтипа холинорецепторов (M₃-XP) в предсердном миокарде вызывает уменьшение длительности потенциалов действия, приблизительно одинаково выраженное у новорожденных и взрослых крыс, в то время как в желудочковом миокарде новорожденных крысят, более чем в 3 раза превосходящее эффект у взрослых животных. Установлено, что количество мРНК гена M₃-XP как в предсердном, так и в желудочковом миокарде снижается по мере взросления животного. Можно заключить, что вклад M₃-рецепторов в реализацию холинергических воздействий на миокард снижается в постнатальном онтогенезе, что связано с уменьшением экспрессии гена M₃-XP по сравнению с геном M₂-XP [14].

Основываясь на данных литературы [14, 15] можно полагать, что увеличение уровня АХ, образующегося в организме новорожденных крысят после ингибирования АХЭ, опосредованно через M₃-XP запускает каскад внутриклеточных реакций,

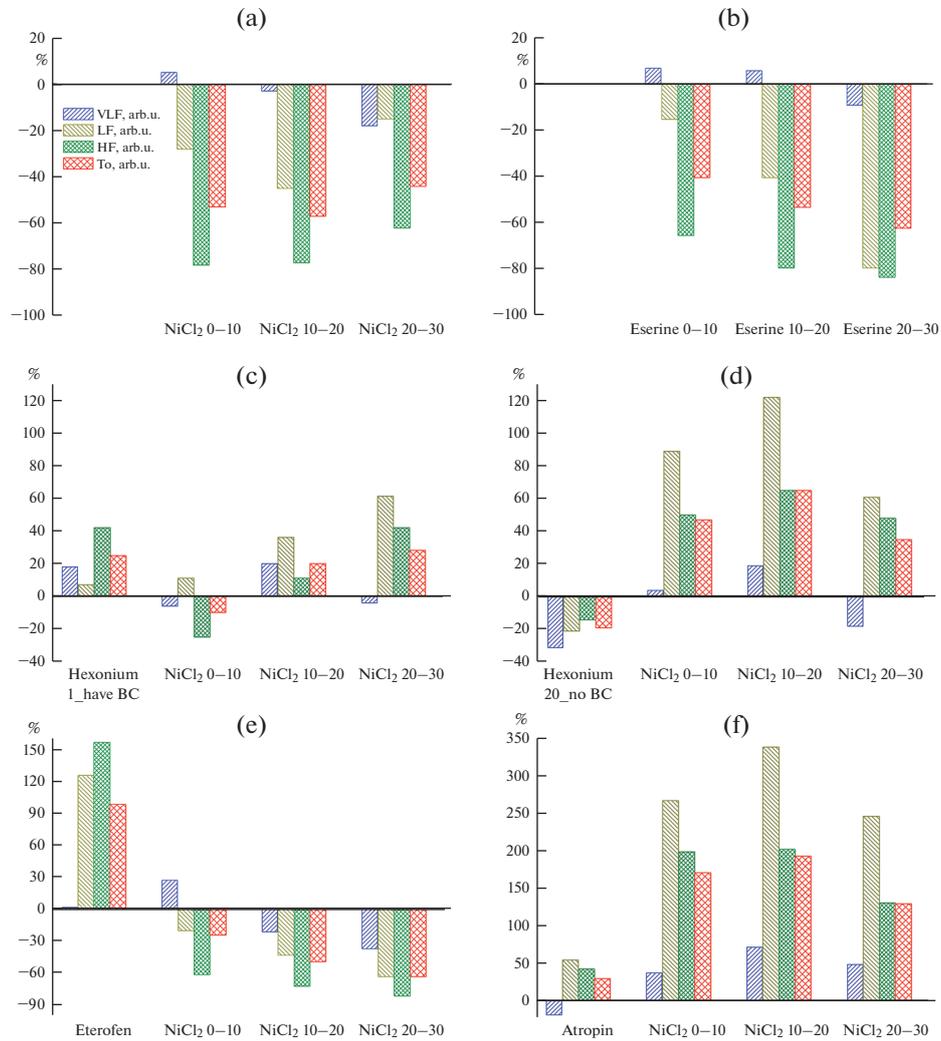


Рис. 2. Сдвиг показателей ВСП у 3-дневных крысят после фармакологических воздействий в % от исходного (фонового) уровня, принятого за 100%. Значения показателей VLF, LF, HF, To даны в нормированном виде (максимумы мощности индивидуальных спектров приняты за 1). Информация о наличии или отсутствии достоверности различий между фоном и опытом представлена в табл. 2–5.

которые в конечном итоге меняют активность T-VDCC и, как следствие, работу пейсмейкеров. Однако, если в случае холинергической активации происходит усиление кальциевого тока T-типа, то Ni²⁺ его, наоборот, угнетает.

Мы установили, что изменение баланса между нервными и нейрогуморальными факторами регуляции сердечного ритма может являться триггером для развития патологической аритмии. Если в случае с активацией холинергической системы сдвиги показателей ВСП в целом объяснимы, то механизмы, влияющие на ВСП после введения крысятам никеля, требуют отдельного рассмотрения. Показано, что эффекты, наблюдающиеся у взрослых крыс после острого воздействия NiCl₂, вы-

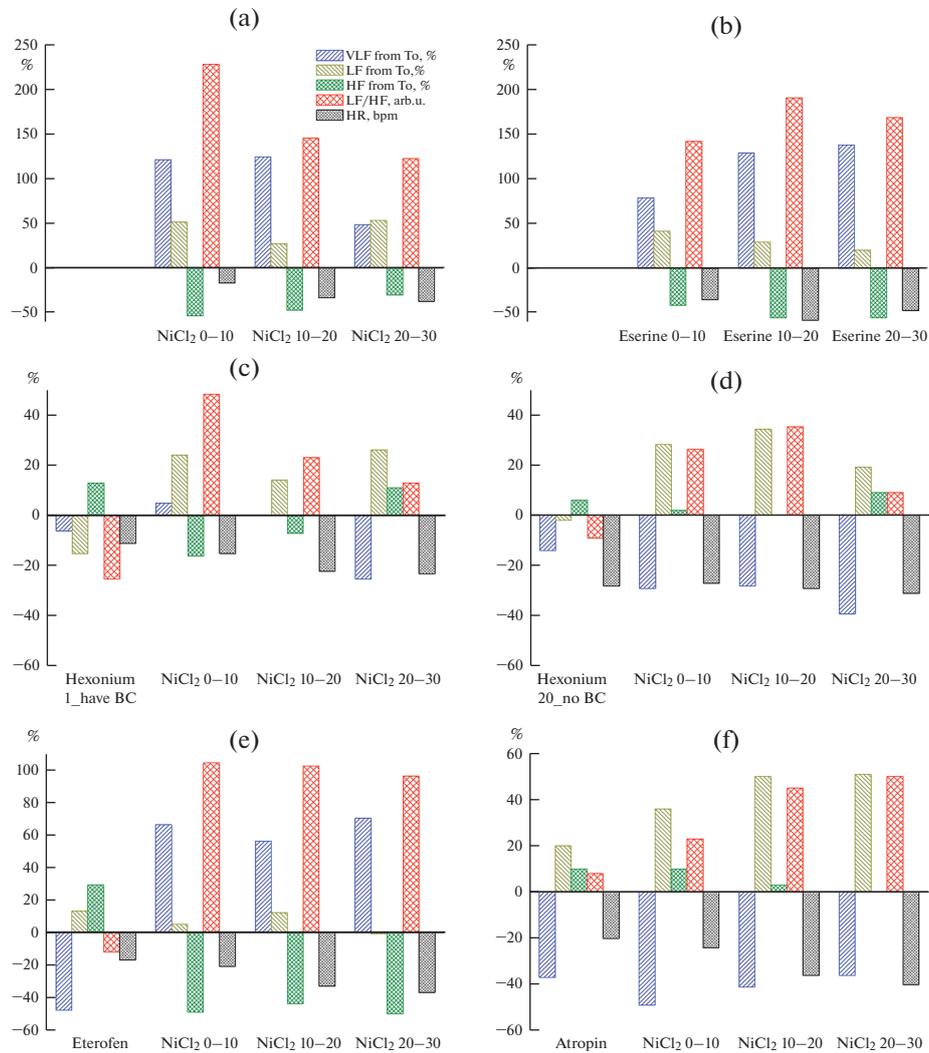


Рис. 3. Сдвиг показателей ВСП у 3-дневных крысят после фармакологических воздействий в % от исходного (фонового) уровня, принятого за 100%. Диапазоны VLF, LF, HF представлены в % от общей (To) мощности спектра. Коэффициент LF/HF рассчитан исходя из усредненных нормированных показателей LF и HF. ЧСС (HR) представлена в уд./мин.

званы комбинированным действием катехоламинов, высвобождаемых надпочечниками, и катехоламинов, высвобождаемых из эфферентных нервов [16]. Однако механизмы, лежащие в основе потенцирующего действия никеля на адренергические структуры не раскрыты. С другой стороны, известно, что дифференциальная секреция адреналина и норадреналина из медуллы надпочечников жестко регулируется центральными и периферическими механизмами. АХ вызывает выброс катехоламинов хромаффинными клетками через М- и Н-ХР [17, 18]. Было показано, что в хромаффинных клетках взрослой крысы цАМФ-рекрутированные кальциевые каналы $\alpha 1H$ (Cav3.2) усиливают секреторную активность и оказываются эф-

фективно связанными с секреторным аппаратом, контролируя быстрый экзоцитоз катехоламинов [19]. Вместе с тем, следует отметить, что несмотря на то, что у 19–20-дневных эмбрионов крыс около 50% хромаффинных клеток демонстрируют наличие I_{CaT} , эффективно блокируемого Ni^{2+} , данный ток оказался неспособным индуцировать экзоцитоз катехоламинов, но, по мнению авторов работы, это связано не с недостаточным притоком Ca^{2+} через $Ca_v3.2$, а обусловлено функциональной незрелостью механизма экзоцитоза [20]. Таким образом, нельзя исключить, что колебания уровня нейрогуморальных влияний, наблюдаемых нами у крысят после инъекции эзерина или $NiCl_2$, могут быть вызваны изменением секреторной активности хромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников, но окончательные выводы об участии в этом процессе кальциевых каналов Т-типа могут быть сделаны только после проведения дополнительных исследований.

Премедикация холинолитиками

Ранее было показано, что премедикация новорожденных крысят М- или Н-холинолитиками позволяет блокировать развитие патологического сердечного ритма после инъекции эзерина. Наиболее эффективных результатов удалось достичь при использовании Н-холиноблокатора бензогексония и М-холиноблокатора метацина [8, 9]. Премедикация атропином при ингибировании АХЭ оказала менее стабильный защитный эффект. Вместе с тем, наши предварительные эксперименты показали, что эффективность применения атропина для премедикации отравления никелем оказалась выше, чем метацина. При выборе препаратов для предотвращения развития ПСРБК, вызванной $NiCl_2$, мы исходили из задачи воздействовать на максимально возможный спектр рецепторов, участие которых в механизмах регуляции сердечного ритма может иметь критическое значение.

Таким образом, следующим этапом нашей работы стало исследование эффекта блокады Н-ХР бензогексонием. Введение препарата в дозе 1 мг/кг должно заблокировать только парасимпатические ганглии. Проведенный анализ показал, что первоначальное повышение мощности всех диапазонов спектра периодограмм, особенно диапазона HF, сменяется преобладанием симпатических влияний. Премедикация холинолитиком не устраняет возникновения ПСРБК при последующем введении крысятам $NiCl_2$. Повышение дозы бензогексония до 20 мг/кг вызывает блокаду как парасимпатических, так и симпатических ганглиев. При этом премедикация бензогексонием в этой дозе, как это было показано нами ранее в экспериментах с последующей инъекцией эзерина [8], препятствует возникновению ПСРБК. Анализ ВСР показал, что основным отличием по сравнению с реакцией на малую дозу препарата является наблюдаемое уже с первых минут после введения никеля снижение роли нейрогуморальных факторов и усиление нервных влияний, преимущественно симпатических (табл. 3; рис. 2с, d, 3с, d). Нарушений синусового ритма сердца не возникает и брадикардические комплексы не наблюдаются.

Как и в случае с инъекцией низкой дозы бензогексония, введение Н-холинолитика центрального действия этерофена сопровождается усилением общей мощности спектра периодограмм и в 2.6 раза более выраженным усилением парасимпатических влияний. Последующее введение $NiCl_2$ приводит к изменениям показателей ВСР, качественно не отличающимся от наблюдаемых после воздействия хлорида никеля без премедикации (табл. 2, 4; рис. 2е, 3е).

Расположение Н-ХР в структурах головного мозга обуславливает их основную модулирующую функцию, приводящую к усилению высвобождения нейротрансмиттеров и влияющую на возбудимость нейронов. Имеющиеся данные свидетель-

Таблица 3. Изменение показателей ВСП у 3-дневных крысят после введения NiCl₂ на фоне премедикации бензогексонием

Показатели	Препарат, период исследования				
	Фон	Бензогексоний	NiCl ₂		
			0–10	10–20	20–30
Подгруппа 1 (n = 7), доза 1 мг/кг С брадикардическими комплексами					
VLF (y.e.)	29.15 ± 2.94	34.29 ± 4.37	27.37 ± 3.93	34.91 ± 8.03*	28.02 ± 7.28
LF (y.e.)	14.52 ± 1.89	15.46 ± 3.16*	16.12 ± 3.39*	19.76 ± 5.50*	23.38 ± 5.79*
HF (y.e.)	29.37 ± 6.15	41.67 ± 13.55*	21.99 ± 8.29*	32.64 ± 6.08*	41.72 ± 4.94*
To (y.e.)	73.04 ± 10.34	91.42 ± 18.67*	65.47 ± 9.82*	87.30 ± 16.64*	93.13 ± 17.80*
VLF, %	39.9	37.5	41.8	40.0	30.1
LF, %	19.9	16.9	24.6	22.6	25.1
HF, %	40.2	45.6	33.6	37.4	44.8
LF/HF, y.e.	0.494	0.371	0.733	0.605	0.560
ЧСС в мин	307.8 ± 5.7	270.5 ± 12.5*	262.0 ± 9.4*	240.8 ± 7.4*	235.3 ± 2.6*
Подгруппа 2 (n = 6), доза 20 мг/кг Без брадикардических комплексов					
VLF (y.e.)	25.92 ± 2.21	17.97 ± 2.04*	27.05 ± 3.27	30.71 ± 2.02*	21.26 ± 5.04*
LF (y.e.)	22.42 ± 6.54	17.64 ± 4.10*	42.44 ± 6.37*	49.65 ± 8.23*	36.08 ± 5.42*
HF (y.e.)	63.28 ± 23.79	54.18 ± 11.55*	94.92 ± 9.35*	104.24 ± 15.33*	93.65 ± 25.53*
To (y.e.)	111.62 ± 28.47	89.80 ± 14.77*	164.42 ± 7.39*	184.60 ± 19.20*	150.99 ± 34.14*
VLF, %	23.2	20.0	16.5	16.6	14.1
LF, %	20.1	19.7	25.8	26.9	23.9
HF, %	56.7	60.3	57.7	56.5	62.0
LF/HF, y.e.	0.354	0.326	0.447	0.476	0.385
ЧСС в мин	287.3 ± 16.0	206.0 ± 16.2*	208.5 ± 14.6*	203.0 ± 10.2*	199.3 ± 18.6*

ствуют о том, что Н-ХР способны регулировать функции сердечно-сосудистой системы (ССС) через нервную систему и ненейрональные ткани. Показано, что активация Н-ХР ствола мозга у взрослых крыс приводит к изменению спектральных показателей вагосимпатического баланса (к сдвигу коэффициента LF/HF) [21]. Одним из важных звеньев регуляции сердечного ритма является так называемый “центральный контур регуляции” — многоуровневая система, включающая в себя многочисленные звенья от подкорковых центров продолговатого мозга до гипоталамо-гипофизарного уровня вегетативной регуляции и коры головного мозга [10]. Проведенная нами в ходе экспериментов премедикация крысят центральным Н-холинолитиком этерофеном, показавшим свою высокую эффективность при блокаде центральных Н-ХР [22], оказалась неэффективной при отравлении крысят NiCl₂, что может служить основанием для исключения центрального контура регуляции сердечного ритма из основных источников возникновения ПСРБК.

Премедикация атропином вызывает первоначальное снижение мощности спектра VLF-диапазона, которое после инъекции NiCl₂ сменяется усилением, несопоставимым с ростом мощности спектра LF и, несколько меньше, HF диапазонов. Это приводит к значительному уменьшению доли нейрогуморальных влияний и усилению доли нервных влияний с преобладанием симпатических (табл. 5; рис. 2f, 3f).

Таблица 4. Изменение показателей ВСР у 3-дневных крысят после введения NiCl₂ на фоне премедикации этерофеном

Показатели	Препарат, период исследования				
	Фон	Этерофен (n = 7)	NiCl ₂		
			0–10	10–20	20–30
VLF (y.e.)	32.73 ± 5.18	33.48 ± 2.32	41.47 ± 5.01*	25.84 ± 1.76*	20.63 ± 1.40*
LF (y.e.)	17.96 ± 4.59	40.41 ± 11.38*	14.37 ± 2.26*	10.15 ± 0.70*	6.62 ± 0.91*
HF (y.e.)	45.99 ± 8.20	117.82 ± 21.72*	18.00 ± 3.14*	12.88 ± 1.59*	8.62 ± 1.07*
To (y.e.)	96.68 ± 15.30	191.70 ± 33.20*	73.84 ± 10.26*	48.87 ± 2.70*	35.87 ± 3.03*
VLF, %	33.9	17.5	56.2	52.9	57.5
LF, %	18.6	21.1	19.5	20.8	18.5
HF, %	47.6	61.5	24.4	26.4	24.0
LF/HF, y.e.	0.391	0.343	0.799	0.788	0.768
ЧСС в мин	266.0 ± 12.7	221.7 ± 15.9	210.0 ± 17.3	177.3 ± 12.8*	181.3 ± 14.6*

Таблица 5. Изменение показателей ВСР у 3-дневных крысят после введения NiCl₂ на фоне премедикации атропином

Показатели	Препарат, период исследования				
	Фон	Атропин (n = 8)	NiCl ₂		
			0–10	10–20	20–30
VLF (y.e.)	26.03 ± 5.80	21.13 ± 3.44*	35.64 ± 3.22*	44.55 ± 6.68*	38.46 ± 5.62*
LF (y.e.)	18.01 ± 2.39	27.69 ± 4.64*	65.83 ± 12.41*	78.73 ± 23.46*	62.08 ± 15.83*
HF (y.e.)	60.51 ± 11.87	85.73 ± 17.96*	180.52 ± 33.02*	182.09 ± 54.82*	139.20 ± 30.11*
To (y.e.)	104.55 ± 12.47	134.56 ± 21.31*	281.99 ± 45.11*	305.38 ± 83.18*	239.74 ± 48.69*
VLF, %	24.9	15.7	12.6	14.6	16.0
LF, %	17.2	20.6	23.3	25.8	25.9
HF, %	57.9	63.7	64.0	59.6	58.1
LF/HF, y.e.	0.298	0.323	0.365	0.432	0.446
ЧСС в мин	305.7 ± 16.7	245.3 ± 17.3*	230.7 ± 14.6*	194.0 ± 10.5*	182.8 ± 11.7*

Атропин является неселективным блокатором M-XP и его афинность к M₂-XP несколько ниже, чем к M₃. В отличие от M₃-XP, активация M₂-XP приводит к снижению уровня цАМФ и внутриклеточного Ca²⁺. Соответственно, результирующий эффект блокады M-XP атропином будет зависеть от целого ряда факторов, включая плотность каждого из подтипов M-XP в предсердиях и желудочках [23].

Мы установили, что премедикация ганглиоблокатором бензогексонием купировала развитие аритмии при условии блокады не только парасимпатических ганглиев, но и преганглионарных окончаний симпатических ганглиев. Вместе с тем, сравнение динамики показателей ВСР, наблюдаемой после введения крысятам высокой дозы бензогексония и после инъекции атропина свидетельствует о наличии качественных различий в характере развивающихся изменений. Это может быть связано с различиями в локализации блокируемых холинорецепторов. Как было показано П.П. Денисенко [24], бензогексоний, в отличие от атропина, бло-

кирует Н-ХР надпочечников, что приводит к снижению выброса адреналина хромаффинными клетками. В экспериментах, выполненных на изолированном перфузируемом надпочечнике крысы, также было установлено, что блокада Н-ХР бензогексонием ингибирует вызванное трансмуральной электрической стимуляцией увеличение выработки адреналина и норадреналина, в то время как блокада М-ХР атропином практически не угнетает секреции катехоламинов. Эти результаты показывают, что секреция катехоламинов, вызванная выбросом эндогенного АХ, преимущественно опосредована никотиновыми рецепторами [25].

В свете развития дальнейших исследований, требуется отметить еще один момент. Известно, что Ni^{2+} может блокировать не только кальциевые каналы Т-типа, но и натрий-кальциевый обменник (Na^+/Ca^{2+} exchanger, NCX). Для блокады NCX необходима концентрация никеля, более, чем в 10 раз выше, чем в случае с T-VDCC [26–28]. Использованная в нашей работе доза хлорида никеля 109 мг/кг соответствует максимальному расчетному значению концентрации $NiCl_2$ в цельной крови 5.1 мМ (~2.3 мМ в пересчете на плазму крови), что достаточно для ингибирования Cav3.2, но, вероятно, мало для блокады NCX. Однако, учитывая, что в экспериментах *ex vivo*, выполненных на препаратах ткани предсердий мышей с нокаутом по NCX, было обнаружено наличие периодических всплесков Ca^{2+} -переходов, сопровождавшихся ростом диастолического Ca^{2+} и перемежающихся длительными паузами [29], вопрос об участии NCX в патогенезе ПСРБК остается открытым.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами впервые проведен анализ показателей ВСР в условиях интоксикации новорожденных крысят $NiCl_2$. Установлено, что инъекции крысятам эзерина или $NiCl_2$ вызывают возникновение ПСРБК и развиваются по сходной схеме. В обоих случаях наблюдается падение общей мощности спектра и абсолютных значений мощности диапазонов LF (преимущественно симпатические) и HF (парасимпатические влияния). Значительное падение уровня нервных влияний приводит к тому, что доминирующую роль в регуляции сердечного ритма начинают играть нейрогуморальные факторы (VLF-диапазон). Если после премедикации Н- или М-холинолитиками мощность спектра VLF-диапазона снижается, то развития ПСРБК у крысят не происходит. Если же мощность спектра VLF-диапазона увеличивается, то в дальнейшем происходит снижение доли нервных влияний, особенно парасимпатических, и у крысят возникает ПСРБК (рис. 2, 3). Усиление влияния нейрогуморальных факторов, в частности циркулирующего в крови адреналина, может играть роль триггера, повышающего чувствительность T-VDCC и приводящего в итоге к нарушениям кальциевого тока, что в свою очередь вызывает нарушение работы пейсмекеров и развитие патологического сердечного ритма. Нельзя исключить, что наблюдаемое у интактных плодов и новорожденных крыс возникновение нерегулярных брадикардических колебаний сердечного ритма также может быть связано с периодическим изменением уровня нейрогуморальных влияний.

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 Комитета по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской ака-

демии наук (Протокол № 7-2/2020), основанным на директиве Европейского парламента 2010/63/EU “О защите животных, используемых в экспериментальных целях”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00967-23-00.

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. *Timopheeva OP, Vdovichenko ND, Kuznetsov SV* (2012) Dynamics of the formation of rhythmic activity of the heart in fetuses and newborn rats. *Bull Exp Biol Med* 152 (4): 397–401. <https://doi.org/10.1007/s10517-012-1537-7>
2. *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>
3. *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 phosphacol. *J Evol Biochem Physiol* 41(2): 201–210. <https://doi.org/10.1007/s10893-005-0055x>
4. *Kuznetsov SV, Kuznetsova NN* (2022) Effects of Ni²⁺ on Heart and Respiratory Rhythms in Newborn Rats. *J Evol Biochem Physiol* 58(5): 1367–1380. <https://doi.org/10.1134/S0022093022050088>
5. *Chuang HC, Hsueh TW, Chang CC, Hwang JS, Chuang KJ, Yan YH, Cheng TJ* (2013) Nickel-regulated heart rate variability: the roles of oxidative stress and inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol* 266(2): 298–306. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.11.006>
6. *Hu J, Fan H, Li Y, Li H, Tang M, Wen J, Huang C, Wang C, Gao Y, Kan H, Lin J, Chen R* (2020) Fine particulate matter constituents and heart rate variability: A panel study in Shanghai, China. *Sci Total Environ* 747: 141199. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141199>
7. *Liberda EN, Zuk AM, Tsuji LJS* (2021) Heart rate variation and human body burdens of environmental mixtures in the Cree First Nation communities of Eeyou Istchee, Canada. *Environ Int* 146: 106220. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106220>
8. *Sizonov VA, Dmitrieva LE, Kuznetsov SV* (2019) 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. <https://doi.org/10.1134/S0022093019030050>
9. *Sizonov VA, Dmitrieva LE* (2019) Changes in Activities of Somatovisceral Systems in Newborn Rats under Conditions of Nicotinic Cholinoreceptor Blockage and Activation of Cholinoreactive Structures. *Bull Exp Biol Med* 167(2): 220–226. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04495-z>
10. *Baevsky RM, Chernikova AG* (2017) Heart rate variability analysis: physiological foundations and main methods. *Cardiometry* 10: 66–76. <https://doi.org/10.12710/CARDIOMETRY.2017.10.6676>
11. *Robinson RB* (1996) Autonomic receptor – effector coupling during post-natal development. *Cardiovasc Res* 31 (Issue supp1): E68–E76. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(95\)00151-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(95)00151-4)
12. *Zefirov TL, Gibina AE, Salman MAH, Ziyatdinova NI, Zefirov AL* (2007) M₃ cholinergic receptors are involved in postnatal development of cholinergic regulation of cardiac activity in rats.

- Bull Exp Biol Med 144(8): 171–173.
<https://doi.org/10.1007/s10517-007-0281-x>
13. *Ziyatdinova NI, Sergeeva AM, Dementieva RE, Zefirov TL* (2012) Peculiar Effects of Muscarinic M₁, M₂, and M₃ Receptor Blockers on Cardiac Chronotropic Function in Neonatal Rats. Bull Exp Biol Med 154(1): 1–2.
<https://doi.org/10.1007/s10517-012-1859-5>
 14. *Tapilina SV, Abramochkin DV* (2016) Decrease in the Sensitivity of Myocardium to M₃ Muscarinic Receptor Stimulation during Postnatal Ontogenesis. Acta Naturae 8(2): 127–131.
<https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-2-127-131>
 15. *Wang Y, Morishima M, Ono K* (2022) Protein Kinase C Regulates Expression and Function of the Cav3.2 T-Type Ca²⁺ Channel during Maturation of Neonatal Rat Cardiomyocyte. Membranes (Basel) 12(7): 686.
<https://doi.org/10.3390/membranes12070686>
 16. *Alvarez C, Bladé C, Cartaña J* (1993) α₂-adrenergic blockade prevents hyperglycemia and hepatic glutathione depletion in nickel-injected rats. Toxicol Appl Pharmacol 121(1): 112–117.
<https://doi.org/10.1006/taap.1993.1135>
 17. *De Diego AM, Gandía L, García AG* (2008) A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. Acta Physiol (Oxf) 192(2): 287–301.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01807.x>
 18. *Criado M* (2018) Acetylcholine nicotinic receptor subtypes in chromaffin cells. Pflugers Arch – Eur J Physiol 470: 13–20.
<https://doi.org/10.1007/s00424-017-2050-7>
 19. *Giancippoli A, Novara M, de Luca A, Baldelli P, Marcantoni A, Carbone E, Carabelli V* (2006) Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited Cav3.2 (α_{1H}) channels in rat chromaffin cells. Biophys J 90(5): 1830–1841.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.105.071647>
 20. *Bournaud R, Hidalgo J, Yu H, Jaimovich E, Shimahara T* (2001) Low threshold T-type calcium current in rat embryonic chromaffin cells. J Physiol 537(1): 35–44.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0035k.x>
 21. *Sallam MY, El-Gowilly SM, Fouda MA, Abd-Alhaseeb MM, El-Mas MM* (2019) Brainstem cholinergic pathways diminish cardiovascular and neuroinflammatory actions of endotoxemia in rats: Role of NFκB/α₇/α₄β₂AChRs signaling. Neuropharmacology 157: 107683.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107683>
 22. *Лосев НА, Сапронов НС, Хныченко ЛК, Шабанов ПД* (2015) Фармакология новых холинэргических средств (фармакология – клинике). СПб. Арт-Экспресс. [*Losev NA, Sapronov NS, Khnychenko LK, Shabanov PD* (2015) Pharmacology of new cholinergic agents (pharmacology to the clinic). SPb. Art-Express. (In Russ)].
 23. *Wang Z, Shi H, Wang H* (2004) Functional M₃ muscarinic acetylcholine receptors in mammalian hearts. Br J Pharmacol 142(3): 395–408.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705787>
 24. *Денисенко ПП* (1959) Ганглиолитики. Л. Медгиз. [*Denisenko PP* (1959) Gangliolitiki. L. Medgiz. (In Russ)].
 25. *Nagayama T, Matsumoto T, Kuwakubo F, Fukushima Y, Yoshida M, Suzuki-Kusaba M, Hisa H, Kimura T, Satoh S* (1999) Role of calcium channels in catecholamine secretion in the rat adrenal gland. J Physiol 520(2): 503–512.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.00503.x>
 26. *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>
 27. *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>
 28. *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>
 29. *Torrente AG, Zhang R, Zaini A, Giani JF, Kang J, Lamp ST, Philipson KD, Goldhaber JI* (2015) Burst pacemaker activity of the sinoatrial node in sodium-calcium exchanger knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A 112(31): 9769–9774.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1505670112>

Comparative Analysis of Disorders of Heart Rhythm Regulation Mechanisms Induced in Newborn Rats by Nickel Chloride and the Acetylcholinesterase Inhibitor Physostigmine (Eserine)

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*

A comparative analysis of heart rate variability (HRV) indices after injection of the acetylcholinesterase inhibitor (AChE) physostigmine ($\frac{3}{4}$ LD₅₀) and the T-type calcium channel blocker (T-VDCC) Ni²⁺ (ED₁₀₀) into animals was performed in experiments on 3-day-old newborn rats. Both drugs cause phenomenologically similar pathological heart rhythm with significant bradycardia complexes (PHRBC). Analysis of HRV indices showed that the disturbance of heart rhythm regulation mechanisms in NiCl₂ poisoning of rats and in cholinoreactive structure activation caused by AChE inhibition develop according to a similar pattern. In both cases there is a decrease in the total power of the spectrum and the absolute power values of the LF (predominantly sympathetic) and HF (parasympathetic influences) bands. Significant decrease in the level of nerve influences leads to the fact that the dominant role in the regulation of heart rhythm begins to play neurohumoral factors (VLF-band). It was found that under conditions of premedication with H- or M-cholinolytics, when rats do not develop cardiac rhythm disturbances, the initial decrease in the severity of neurohumoral and subsequent increase in sympathetic and, to a lesser extent, parasympathetic influences is common. In this case, vagosympathetic balance is not decisive. In case the influence of neurohumoral factors increases after premedication, then later there is a decrease in the proportion of nerve influences and the occurrence of PHRBC. The obtained data suggest that in newborn rats both direct blockade of T-VDCC and changes in I_{CaT} current mediated through M₃-subtype muscarinic cholinoreceptors lead to disruption of pacing and development of PHRBC.

Keywords: newborn rats, dysrhythmia, heart rate variability, calcium channels, nickel chloride, cholinergic system, physostigmine (eserine), cholinolytics