

## МЕХАНИЗМ ВОЗНИКНОВЕНИЯ АРИТМИЙ НА ЭКСПЛАНТАТАХ ЭМБРИОНАЛЬНОГО МИОКАРДА ПРИ РАЗОБЩЕНИИ ДЫХАНИЯ И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

М.В. ЛЬВОВ, Л.М. ОВСЕПЯН, Е.Г. ДЖАНПОЛЯДЯН

*Институт молекулярной биологии НАН РА, 0014, Ереван*

Изучали особенности нарушений ритмической спонтанной автоматии импульсов в культуре ткани эмбрионального миокарда при разобщении дыхания и окислительного фосфорилирования динитрофенолом. Последним в концентрации  $2 \cdot 10^4$  г/мл вызывает аритмию эксплантатов эмбрионального миокарда без существенного влияния на амплитуду сокращений. Если динитрофенол вводили в субаритмической концентрации, лобаклеточные аритмогенные вещества - строфантин и аконитин - в неаритмической концентрации вызывало выраженное нарушение ритма, типичное для каждого аритмогенного вещества. Таким образом, динитрофенол в неаритмической концентрации значительно повышает чувствительность эксплантатов к аритмогенным веществам. На фоне динитрофеноловой аритмии наилучшие лечебные результаты получены с новоканнамидом.

Գետազոտվել են ազդակների ինքնածին ինքնագործունեությունը սաղմնային միոկարդի հյուսվածքային կուլտուրայում, դինիտրոֆենոլով տարաբաժանված շնչառության և օքսիդային ֆոսֆորիլացման պայմաններում: Դինիտրոֆենոլի  $2 \cdot 10^4$  գ/մլ խտությունը սաղմնային միոկարդի արտապատրաստուկներում առաջացնում է առիթմիա առանց լական ազդեցության մկանաթելիկների կծկումների ամպլիտուդի վրա: Եթե դինիտրոֆենոլը ներարկվում էր ենթաառիթմային ուտությամբ, առիթմածին նյութերի ստրոֆանտինի և ակոնիտինի առիթմիա չառաջացնող խտություններն, առաջացնում էին առիթմածին նյութերին բնորոշ ռիթմի արտահայտված խանգարումներ: Այսպիսով, դինիտրոֆենոլային առիթմիա չառաջացնող խտությունը նշանակալի չափով բարձրացնում էր արտապատրաստուկների զգայունակությունն առիթմածին նյութերի նկատմամբ: Դինիտրոֆենոլային առիթմիայի մոդելի առավել արդյունավետ բուժական արդյունքներն ստացվել են նովոկանամիդի կիրառման դեպքում:

The disturbances of rhythmic spontaneous of impulses in the tissue culture of the embryonic myocardium at dissociation of respiration and oxidative phosphorylation by dinitrophenol have been studied. In concentration of  $2 \cdot 10^4$  g/ml it caused arrhythmia of the explants of the embryonic myocardium without any significant influence on the amplitude of contractions. Whereas dinitrophenol was administrated in subarrhythmic concentrations, addition of arrhythmogenic substances - strophantin and aconitin in nonarrhythmic concentrations caused marked disturbance of the rhythm, typical of each of the arrhythmogenic substances. Thus, in nonarrhythmic concentrations of dinitrophenol increased considerably sensitivity of the explants to the arrhythmogenic agents. On a model of dinitrophenol arrhythmia the best therapeutic results were obtained with novocainamide.

*Гипоксия - окислительное фосфорилирование - эксплантаты миокарда - динитрофеноловая аритмия*

Известно, что в условиях гипоксии миокарда при угнетении окислительно-восстановительных процессов и связанным с этим нарушением кислотно-щелочного равновесия изменяется соотношение внутри- и внеклеточного содержания электролитов - значительно снижается содержание К и повышается концентрация Na в клетке, что может привести к различным нарушениям ритма сердечных сокращений.

Показано, что при разобщении процессов дыхания и окислительного фосфорилирования изменяются электрофизиологические параметры сердечной мышцы путем изменения соотношения длительности потенциалов покоя и действия [7, 8, 12, 14, 15]. Большинство экспериментальных данных о влиянии изменения уровня метаболизма и гипоксии на функциональные показатели сердечной мышцы получены на интактных животных и поэтому тесно связаны с нервной регуляцией и уровнем её кровоснабжения [3].

Нами проведена попытка выяснить особенности нарушений ритмической спонтанной автоматии импульсов в культуре ткани эмбрионального миокарда при введении динитрофенола, так как он приводит к разобщению дыхания и окислительного фосфорилирования [6, 9, 11, 18].

Изучали следующие вопросы: можно ли путем разобщения дыхания и окислительного фосфорилирования вызвать нарушение ритма спонтанно сокращающихся экплантатов; как изменяется порог чувствительности клеток миокарда к аритмогенным веществам (аконитину и строфантину) при введении динитрофенола; как влияют некоторые проаритмические вещества на нарушенный динитрофенолом ритм спонтанных сокращений.

**Материал и методика.** Опыты проведены на культуре ткани миокарда куриного эмбриона 6-9-дневной инкубации. Способ приготовления экплантатов и объективный метод регистрации спонтанных сокращений монослой клеток при помощи фотоэлектрического эффекта описаны [1]. Через верхнее отверстие специально сконструированных из органического стекла камер, где содержалось 0,9 мл питательной среды (80% среды Игла и 20% лошадиной сыворотки), добавляли 0,1 мл изучаемого вещества, растворенного в такой же питательной среде. Регистрацию сокращений вели с 3-минутными интервалами в течение 45-60 мин. Опыты проведены на 85 экплантатах.

**Результаты и обсуждение.** Введение динитрофенола в концентрации  $1 \cdot 10^{-10}$  -  $1 \cdot 10^{-4}$  г/мл не оказывало определенного влияния на характер спонтанных сокращений эмбрионального миокарда. При дальнейшем увеличении концентрации динитрофенола у 70% экплантатов вызывал нарушение ритмических сокращений и концентрации  $2 \cdot 10^{-4}$  г/мл без существенного влияния на амплитуду (рис. 1, а, б). Аритмия возникла через 15 мин после введения динитрофенола и длилась 5-6 мин, затем следовала остановка спонтанных сокращений (рис. 2 а, б). В 35% случаев типичной аритмии не наступало и развивалось резкое учащение, а потом остановка спонтанной активности.

Если предварительно вводили динитрофенол в субаритмической концентрации  $1 \cdot 10^{-4}$  г/мл., добавление в неаритмической концентрации аконитина  $1 \cdot 10^{-10}$  -  $1 \cdot 10^{-14}$  г/мл и строфантина  $1 \cdot 10^{-6}$  -  $1 \cdot 10^{-7}$  г/мл вызывало выраженное нарушение ритмических сокращений ( $p < 0,001$ ) по изменению амплитуды, характерное для данного аритмогенного вещества (рис.3). На не

обработанных динитрофенолом эксплантатах аконитин вызывал аритмию только в концентрации  $1 \cdot 10^{-5}$  -  $1 \cdot 10^{-6}$  г/мл.

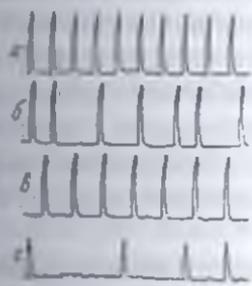


Рис. 1. Фотоэлектрограмма сокращений эксплантата эмбрионального миокарда.

а - нормальный ритм;  
б - нарушение ритма после введения динитрофенола в концентрации  $2 \cdot 10^{-4}$  г/мл;  
в - временное снятие аритмии под влиянием препарата 7351 ( $2 \cdot 10^{-4}$  г/мл).  
г - появление аритмии вновь, спустя 2 мин.

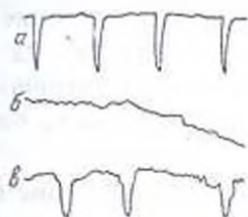


Рис. 2. Фотоэлектрограмма сокращений эксплантата эмбрионального миокарда.

а - нормальный ритм;  
б - полная остановка сокращения после 5-6 мин аритмии, вызванной динитрофенолом ( $2 \cdot 10^{-4}$  г/мл).  
в - постепенное восстановление сокращений эксплантата после введения новокаинамида в концентрации  $2 \cdot 10^{-4}$  г/мл.

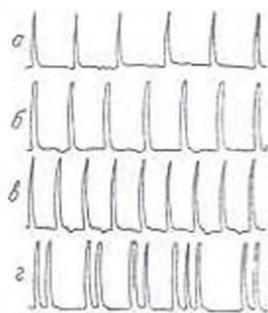


Рис. 3. Фотоэлектрограмма сокращений эксплантата эмбрионального миокарда.

а - нормальные сокращения;  
б - введение динитрофенола в субаритмической концентрации ( $1 \cdot 10^{-4}$  г/мл), вызывающей только учащение сокращений;  
в - введение строфантина К в концентрации, не вызывающей аритмии ( $1 \cdot 10^{-3}$  г/мл).  
г - развитие аритмии спустя 2 мин.

Для изучения профилактического или лечебного действия на динитрофеноловую аритмию различных веществ были использованы некоторые новые и известные препараты, оказавшие антиаритмическое действие на модели строфантинной и аконитиновой аритмии в культуре ткани [4].

Оказалось, что антиаритмические вещества, обладающие холинолитическими свойствами, на динитрофеноловой модели ведут себя неодинаково.

Так, диэтиламинопропиловый эфир дифенилизопропокснуксусной кислоты, обладающий выраженными холинолитическими свойствами, в концентрации  $2 \cdot 10^{-6}$  г/мл временно устранял динитрофеноловую аритмию, но через 1-2 мин она возникала вновь (рис. 1, в, г). В 50% случаев этот препарат в различной концентрации был не эффективен. Профилактическим действием при динитрофеноловом нарушении ритма он не обладал.

Новокаинамид в концентрации  $3 \cdot 10^{-4}$  г/мл устранял динитрофеноловую аритмию почти во всех опытах ( $p < 0.005$ ). В тех случаях, когда без первоначальной аритмии сейчас же наступала остановка сокращений, новокаинамид в концентрации  $2 \cdot 10^{-6}$  г/мл восстанавливал сокращения, хотя и не всегда ритмичные (рис. 2, в). Профилактическим действием новокаинамид не обладал. Пропранолол (индерал, обсидан), изученный в различной концентрации, ни профилактическим, ни лечебным действием не обладал.

В настоящее время мнения относительно четкой взаимосвязи между

процессами фосфорилирования и возбудимостью расходятся [6, 7]. Холджин и Кейнес [10] считают, что данные, полученные на какой-нибудь одной ткани, нельзя распространять как закономерность на другие, так как существует разница в течении этих процессов даже в нервной проводнике и нервной клетке. Авторы объясняют это различной функциональной активностью ткани. Безусловно одно, что нарушение процессов окислительного фосфорилирования нарушает нормальное течение метаболических процессов и должно оказывать определенное влияние на формирование процесса возбуждения, так как он тесно связан с активностью некоторых тканевых ферментов, регулирующих проницаемость биологических мембран и транспорт ионов.

Естественно, что клетки, существующие *in vitro*, отличаются рядом особенностей, и полученные нами данные о возникновении и купировании аритмий вряд ли можно безоговорочно переносить на клетки, существующие в условиях организма. Однако клетки, основная функциональная деятельность которых - спонтанная пульсация - сохранена, безусловно гораздо ближе стоят к переживающим клеткам, где процессы специфического обмена ткани нарушены меньше, чем в длительно культивируемых клетках тканевых культур. В клетках тканевых культур, даже повторно и длительно культивируемых в соответствующей питательной среде, сохраняется низкая окислительная активность, наряду с высоким уровнем аэробного и анаэробного гликолиза [5].

Действие динитрофенола на клетку многогранно, однако можно предположить, что в наших опытах появление аритмии под его влиянием обусловлено разобщением процессов дыхания и окислительного фосфорилирования, так как известно, что в изученных концентрациях динитрофенол в основном действует как разобщающий агент [13, 18]. Подобные нарушения процесса фосфорилирования резко изменяют энергетическое обеспечение активного транспорта ионов через мембраны миокардиальных клеток, благодаря значительному торможению синтеза АТФ [17].

Даже наличие определенной активности мембранной АТФ-азы оказывается недостаточным для сохранения ионного градиента и нормальной функциональной активности ритмично пульсирующей клетки. Эти данные согласуются с результатами исследований некоторых авторов [5, 14], которые под влиянием динитрофенола при 25° наблюдали уменьшение потенциала действия сердечной мышцы лягушки от 660-700 мВ до 200 мВ без уменьшения потенциала покоя. В дальнейших опытах [14] при помощи других ингибиторов метаболизма - азидата натрия и нейтрального красного также было отмечено укорочение длительности плато потенциала действия. Авторы заключают, что длительность плато, по-видимому, связана с обеспечением энергии макроэргических фосфатов. В условиях определенной гипоксии и нарушения окислительного потенциала при введении динитрофенола вероятно, нарушается и проницаемость миокардиальных мембран, что значительно повышает чувствительность клеток к различным экзогенным и эндогенным веществам [4]. В результате этого развивается аритмия от 10

100 раз меньших доз строфантина и аконитина, чем аритмогенные. Показано [17], что на фоне динитрофенола увеличенный отток из мышечных клеток ещё более возрастает при добавлении строфантина.

Это подтверждается данными *in vivo*, когда под влиянием динитрофенола уже малые дозы уабана действуют токсически, значительно понижая содержание КРФ и аденозинфосфатов в сердечной мышце [18].

По данным Rothsuh [16], при гипоксии преобладают холинэргические влияния, однако определенную активность, проявленную препаратом (диэтиламинопропиловый эфир дифенилизопропоксенуеуеной кислоты) и наших опытах, едва ли можно объяснить наличием у него холинолитических свойств. Этот вывод подтверждается тем фактом, что новоканнамид, будучи намного слабее по холинолитическим свойствам вышеуказанного препарата, оказался значительно эффективнее его на динитрофеноловой модели аритмии. По-видимому, это связано с особенностями сугубо тканевых эффектов новоканнамида, ещё не изученных в аспекте механизма его антиаритмического действия.

Изучение тканевых эффектов известных и новых противоритмических средств может оказать большую помощь в деле избирательного применения в клинике этих веществ при этиологически различных видах нарушения ритма. Все приведенные данные свидетельствуют о существенной роли изменения метаболических процессов и развития гипоксии в механизме возникновения нарушения ритмической автоматии импульсов в культуре ткани эмбрионального миокарда.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Львов М.В. Автореф. канд. дисс. Ереван, Армения, 1972.
2. Райскина М.Е. Биохимия нервной регуляции сердца. М., с. 266, 1982.
3. Райскина М.Е. В кн.: Корреляция кровоснабжения с метаболизмом и функцией. Тбилиси, с. 263, 1979.
4. Самвелян В.М., Львов М.В., Джантоладян Е.Г. Тезисы 3-го Всесоюзного съезда фармакологов СССР, Киев, 1971.
5. Этингер Р.Н. Вopr. мед. химии, в. 5, с. 12, 1972.
6. Abood L.G., Koketsu K., Noda K. Am. J. Physiol. 200, p. 431, 1972.
7. Brown M.R., Currens J.H., Marschand J.F. J. A. M. A., 124, p. 545, 1965.
8. Bull G.M., Carter A.B., Lowe K.G. Lancet, 2, p. 60, 1975.
9. Fawar G., Hawa E.S., Tutunji B. Brit. J. Pharmacol. 12, p. 270, 1970.
10. Hodgkin A.L., Keynes R.D. J. Physiol. (Lond.), 128, p. 28, 1971.
11. Goodford P.J. Brit. J. Pharmacol. 13, p. 144, 1978.
12. Lorente de No R.A. Studies from Rockefeller Institute for Med. Res., 131, p. 132, 1959.
13. Loomis W.F., Lipman F. J. boil. Chem., 173, p. 807, 1951.
14. Macfarlane W.V. Nature, 178, p. 1050, 1980.
15. Macfarlane W.V., Meares J.D. Ibid., 176, p. 403, 1985.
16. Rothsuh K.E. Цит. [2].
17. Schatzman H.J., Witt P.N. J. Pharmacol. exp. Ther. 112, p. 501, 1975.
18. Wollenberger A., Harsch M. Ibid. 105, p. 477, 1980.