

ДИНАМИКА ЗАВИСИМОСТИ ИНТЕРВАЛ — СИЛА ПАПИЛЛЯРНЫХ МЫШЦ КРЫС ПРИ ОСТРОМ И КУРСОВОМ ПРИМЕНЕНИИ АМИОДАРОНА

Д. С. Кондратьева, С. А. Афанасьев, С. В. Попов¹

Исследовали динамику зависимости интервал — сила папиллярных мышц крыс при остром и курсовом применении амиодарона. Обнаружено, что как острое, так и курсовое использование амиодарона снижает амплитуду экстрасистолических сокращений. Вместе с тем только острое применение амиодарона приводит к дополнительному усилению “потенциации” сократительного ответа при экстрасистолических воздействиях и после кратковременного прекращения электрической стимуляции. Авторы делают выводы, что при остром и курсовом применении амиодарона происходит снижение возбудимости миокардиальных клеток, но только курсовое использование антиаритмического препарата увеличивает эффективный рефрактерный период миокарда. Кратковременное применение амиодарона может изменять функциональное состояние саркоплазматического ретикулаума кардиомиоцитов.

Ключевые слова: амиодарон, саркоплазматический ретикулум, миокард, крысы

ВВЕДЕНИЕ

Амиодарон является одним из наиболее эффективных антиаритмических препаратов в терапии угрожающих жизни желудочковых тахикардий. Этот препарат относят к III классу антиаритмических средств. Вместе с тем его эффект не ограничивается блокадой калиевых каналов: препарат оказывает комплексное воздействие на электрофизиологические свойства кардиомиоцитов [10]. Так, амиодарон способен частично блокировать натриевые и кальциевые каналы [11]. Проявление эффектов амиодарона существенно зависит от длительности его применения [10, 11]: показано, что при кратковременном его использовании ингибируются быстрые калиевые токи, а при длительном — медленные [9]. Кроме того, кратковременное применение амиодарона приводит к снижению активности Na^+ - K^+ -АТФ-азы [7] и частичной блокаде входящих натриевых и кальциевых токов, что сопровождается подавлением натрий- и кальций-зависимой проводимости и возбудимости [11]. Поскольку модуляция электрофизиологических свойств кардиомиоцитов под влиянием амиодарона реализуется в зависимости от длительности применения, то и действие этого препарата на инотропные свойства сердечной мышцы также может зависеть от продолжительности его применения. Следует отметить что, механизм действия амиодарона и многих других антиаритмических препаратов рассматривается только с позиции влияния их на ионные каналы сарколеммы. Вместе с тем вопрос об их влиянии на функцию внутриклеточных систем, регулирующих гомеостаз ионов в клетках, остается

открытым. Одной из внутриклеточных структур, ответственных за регуляцию гомеостаза кальция в клетках сердца, является саркоплазматический ретикулум (СР) [3], от функционального состояния которого во многом зависит контрактильная способность миокарда. Показано, что анализ сократительной активности миокарда при изменениях режимов электрической стимуляции в условиях физиологического эксперимента позволяет исследовать функциональную активность СР [2, 12 – 15]. Этот подход используют для оценки способности СР кардиомиоцитов освобождать и поглощать Ca^{2+} в ходе одиночного цикла сокращение-расслабление изолированных мышечных препаратов сердца. Целью нашего исследования было изучение динамики зависимости интервал-сила миокарда крыс при остром и курсовом применении амиодарона.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 22 половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 200 – 250 г. 12 животных включили в контрольную группу, которым в течение 14 дней давали дистиллированную воду при помощи желудочного катетера. Остальным животным 2 раза в день в желудок вводили амиодарон в дозе 10 мг/кг в течение 14 суток. По окончании срока кормления крыс брали в эксперимент. Для этого животных, находящихся под легким эфирным наркозом, обездвигивали смещением шейного отдела позвоночника, вскрывали грудную клетку, выделяли сердце и помещали его в охлажденный физиологический раствор Кребса-Хензеля следующего состава (в мМ): NaCl — 120; KCl — 4,8; CaCl_2 — 2; MgSO_4 — 1,2; KH_2PO_4 — 1,2; NaHCO_3 — 20; глюкоза — 10. Полость сердца и коронарные сосуды промывали в специальной проточной камере через аорту. Папиллярные мышцы поперечным

¹ Лаборатория молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики (зав. — С. А. Афанасьев) ГУ НИИ кардиологии СО РАМН, 634041, Томск, ул. Киевская, 111а.

сечением не более 1 мм выделяли из левого желудочка и помещали в термостабилизируемую проточную камеру. Один конец мышцы фиксировали неподвижно к стенке камеры, второй — закрепляли на штоке изометрического датчика (механоэлектрический преобразователь 6МХ1С). Перфузию мышц осуществляли при 36,5 °С раствором Кребса-Хензеляйта. Для оксигенации раствора использовали газовую смесь — карбоген (O₂ — 95 %, CO₂ — 5 %). Стимуляцию мышц проводили электрическими импульсами прямоугольной формы длительностью 5 мс, подаваемыми на два массивных серебряных электрода, расположенных в перфузионной камере. Частота стимулирующих импульсов составляла 0,5 Гц.

Изучали инотропную реакцию папиллярных мышц на изменение режимов электрической стимуляции. Исследовали следующие хроноинотропные эффекты.

Экстрасистолическое воздействие. Наблюдали изменение амплитуды сокращения после нанесения однократного внеочередного стимула на фоне стимуляции с интервалом 2 с. Величина экстрасистолического интервала (время между регулярным и экстрасистолическим стимулом) менялась от 0,2 до 1,5 с [2, 13].

Механическая релаксация. На фоне базовой стимуляции прекращали стимуляцию на фиксированное время от 4 до 60 с (пауза). Кривую механической релаксации получали как зависимость между длительностью паузы и амплитудой первого после паузы сокращения. Из полученной релаксационной кривой с помощью программы STATISTICA 6.0 вычисляли $t_2(T_{50})$ — время покоя, соответствующее первому после паузы сокращению с приростом амплитуды, составляющим 50 % от максимального прироста. Показатель $t_2(T_{50})$ использовали для оценки скорости захвата Ca²⁺ СР кардиомиоцитов [8].

Экстрасистолические воздействия и механическую релаксацию выполняли после адаптации папиллярных мышц к режиму перфузии. В эксперимент включили 1 — интактные мышцы; 2 — интактные мышцы, перфузированные физиологическим раствором, содержащим амиодарон в дозе 1 мкМ/л (“Sanofi Pharm”, Франция), в течение 15 мин; 3 — папиллярные мышцы крыс, получавших 14 дней амиодарон в дозе 20 мг/кг/сут.

Для регистрации изометрического сокращения использовали АЦП и персональный компьютер. С помощью специально разработанного программного обеспечения вычисляли максимально развиваемое мышцей напряжение — амплитуду. Данные обрабатывали с помощью компьютерной программы STATISTICA 6.0, достоверность полученных результатов оценивали по *t*-критерию Стьюдента и критерию Вилкоксона для парных значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Стимуляция мышечных полосок интактного миокарда внеочередным электрическим импульсом через

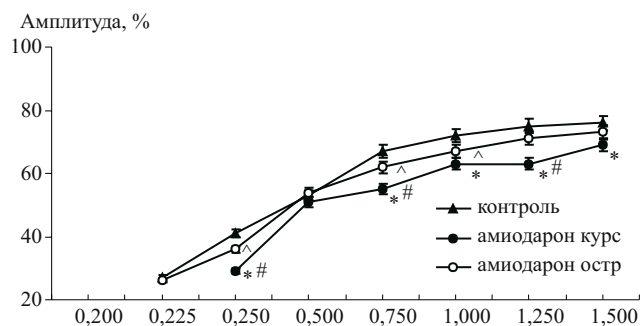


Рис. 1. Экстрасистолические сокращения папиллярных мышц крыс на фоне острого и курсового применения амиодарона.

“Амиодарон курс” — инотропная реакция миокарда на фоне курсового использования амиодарона, “амиодарон остр” — инотропная реакция миокарда на фоне острого применения амиодарона. Различия достоверны по сравнению: с контролем ^ — $p < 0,05$ и * — $p < 0,01$, между группами с острым и курсовым применением амиодарона, # — $p < 0,01$. По оси ординат — амплитуда сокращений в процентах по отношению к исходным значениям; по оси абсцисс — экстрасистолический интервал (в сек).

0,2 с от начала регулярного цикла не вызывала появление экстрасистол, однако при этом увеличивалась длительность регулярного цикла сокращение-расслабление. По данным литературы [1, 2, 13], это свидетельствует о том, что внеочередной электрический импульс попадал в фазу абсолютной рефрактерности и, вероятно, поэтому при использовании такого воздействия мы не наблюдали появление дополнительного экстрасистолического сокращения. Вместе с тем внеочередной стимул через 0,2 с индуцировал поступление в миоплазму кардиомиоцитов дополнительных ионов кальция, что и вызвало увеличение длительности цикла сокращение — расслабление. Нанесение электрического стимула через 0,225 с индуцировало появление экстрасистол с амплитудой сокращения $27 \pm 1,42\%$ от значений регулярного цикла (рис. 1). Как видно из рис. 1, при дальнейшем увеличении интервала времени до внеочередного стимулирующего импульса амплитуда экстрасистолы нарастала.

Известно, что импульс электрической стимуляции, попадающий в 3-ю фазу потенциала действия, приводит к удлинению плато потенциала, во время которого поступает дополнительное количество ионов внешнего кальция в миоплазму кардиомиоцитов, которые аккумулируются в СР и участвуют в первом постэкстрасистолическом цикле сокращение-расслабление [1, 2, 13]. В нашем эксперименте такой эффект наиболее наглядно проявился во время самого короткого экстрасистолического интервала (0,2 с). Постэкстрасистолическое сокращение в этом случае превышало амплитуду регулярного сокращения на $23 \pm 1,78\%$ (рис. 2). С появлением самостоятельной экстрасистолы и повышением ее амплитуды мы наблюдали снижение постэкстрасистолической потенциации, при этом при самых длинных экстрасистолических интервалах выраженность постэкстрасистолической потенциации становилась минимальной (рис. 1, 2).

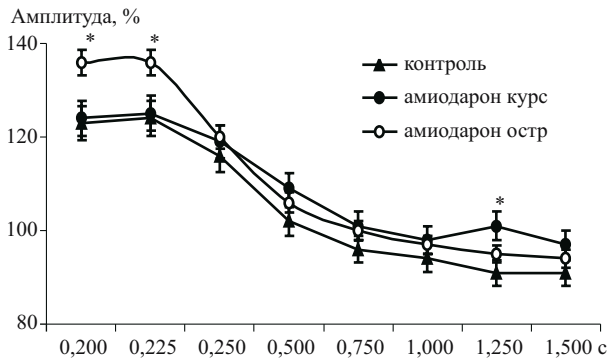


Рис. 2. Эффект острого и курсового применения амиодарона на постэкстрасистолическое сокращение папиллярных мышц крыс.

Обозначения те же, что на рис. 1.

Обработка мышц амиодароном в течение 15 мин вызвала снижение амплитуды экстрасистол, индуцированных внеочередными электрическими импульсами через 0,25, 0,75; 1,0; 1,25; 1,5 с ($p < 0,05$, рис. 1). Длительное (курсовое) применение амиодарона приводило к более значимому изменению инотропной реакции папиллярных мышц крыс на экстрасистолическое воздействие. Так, амплитуда экстрасистол была меньше, чем в контрольной группе на 9–12 % ($p < 0,05$, рис. 1). Кроме того, внеочередной импульс через 0,225 с в этом случае не вызывал появления экстрасистол (рис. 1), что указывает на удлинение эффективного рефрактерного периода. Полученные результаты позволяют утверждать, что использование амиодарона снижает возбудимость миокарда, причем, при курсовом применении этот эффект проявляется в большей степени. Известно, что электрофизиологические эффекты амиодарона связаны с ингибированием как входящих, так и выходящих ионных токов [10, 11]. Одним из эффектов, отмеченных при курсовом использовании амиодарона, является снижение активности $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ -азы в кардиомиоцитах [4, 7]. Кроме того, длительное использование амиодарона приводит к электрофизиологическому ремоделированию кардиомиоцитов, связанному с экспрессией генов ионных каналов и функциональных белков [10]. Вероятно, эти изменения обеспечивают эффективное снижение возбудимости кардиомиоцитов.

Амплитуда постэкстрасистолического сокращения в условиях острой обработки мышц амиодароном превысила контрольные значения на 12 % ($p < 0,05$) после экстрасистолического воздействия, оказанного через 0,2 и 0,225 с. Вместе с тем при пролонгированном использовании амиодарона эти параметры не отличались от контрольных значений (рис. 2). Согласно литературным данным [1, 5, 13], эти результаты могут свидетельствовать о влиянии амиодарона на функции СР, связанные с повышением способности захватывать ионы кальция или/и уменьшать свободный ток утечки из СР. Кроме того, не исключена возможность боль-

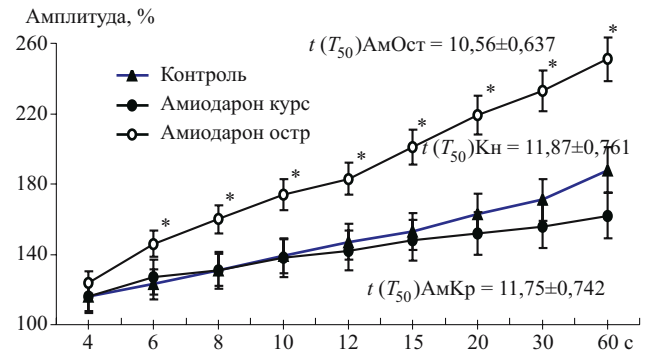


Рис. 3. Изменение динамики механической релаксации папиллярных мышц крыс при остром и курсовом применении амиодарона

* — $p < 0,01$, различия достоверны по сравнению с контролем и группой с курсовым применением амиодарона. $t(T_{50})$ — время, необходимое для достижения половины максимальной амплитуды сокращения. $t(T_{50})_{\text{Кн}}$ — для контрольной группы, $t(T_{50})_{\text{АмОстр}}$ — для группы с острым воздействием амиодарона, $t(T_{50})_{\text{АмКр}}$ — для группы с курсовым применением амиодарона. По оси ординат — амплитуда сокращений в процентах по отношению к исходным значениям; по оси абсцисс — продолжительность периода прекращения стимуляции мышц (в сек).

шей мобилизации ионов кальция из внутриклеточного депо во время постэкстрасистолического сокращения. Поскольку курсовое применение амиодарона не оказывает подобного эффекта, можно предположить, что действие амиодарона на функциональную активность СР имеет кратковременный характер.

Известно, что прекращение стимуляции мышечных препаратов миокарда крыс после регулярной стимуляции приводит к накоплению ионов кальция в СР [2, 14, 15]. Поэтому при возобновлении стимуляции мышечных полосок амплитуда первого сокращения превышает амплитуду регулярного цикла [2, 14, 15]. Наши эксперименты показали, что независимо от длительности используемых пауз амплитуда первого после паузы сокращения интактных мышц превышала базовый уровень. При этом с увеличением длительности паузы потенциация росла (рис. 3). Однако скорость прироста амплитуды сокращений релаксационной кривой после длинной паузы значительно снижалась, что свидетельствует о насыщении саркоплазматического ретикула ионами кальция. Максимальная амплитуда сокращения мышц после 60 с паузы в контроле была $187,8 \pm 12,12$ %. Перфузия мышечных полосок амиодароном вызвала значительное усиление потенциации (рис. 3). Так, потенциация инотропного ответа миокарда крыс с кратковременной обработкой амиодароном на всех интервалах пауз была достоверно больше ($p < 0,01$) потенциации в контроле. Максимальная амплитуда сокращения составляла $251,2 \pm 10,61$ %, что почти в 2 раза больше контрольного значения. Вместе с тем, как видно на рис. 3, время, необходимое для достижения половины максимума прироста амплитуды $t(T_{50})$ [5], на фоне амиодарона и в контрольных условиях достоверно не различалось и составляло $10,56 \pm 0,637$ с и $11,87 \pm 0,761$ с, соответственно. Дан-

ный факт может свидетельствовать о том, что после обработки мышц амиодароном скорость захвата ионов кальция в миоплазму кардиомиоцитов осталась такой же, как в контрольных условиях [5]. Вместе с тем на фоне изучаемого препарата происходило увеличение потенциации сокращения после возобновлении электрической стимуляции, что может говорить о большем количестве кальция, выброшенном из СР в момент сокращения [2]. Эти факты позволили нам предположить, что амиодарон может способствовать более эффективному “удержанию” ионов кальция в СР и тем самым препятствовать свободному току утечки Ca^{2+} из СР во время паузы. Динамика механической релаксации миокарда крыс, получавших 14 дней амиодарон, значимо не отличалась от контрольных значений. Анализируя эти результаты, можно предположить, что в условиях длительного применения амиодарона происходит своеобразная “балансировка” внутриклеточных структур кардиомиоцитов к изменившемуся гомеостазу кальция. В результате инотропная реакция миокарда на кратковременное прекращение электрической стимуляции и проявление феномена усиления постэкстрасистолы не отличается от контрольных значений.

ВЫВОДЫ

1. При курсовом и однократном применении амиодарона происходит снижение возбудимости миокардиальных клеток, при этом длительное его использование увеличивает эффективный рефрактерный период миокарда.

2. Инотропный ответ мышц, кратковременно обработанных амиодароном, и миокарда, длительно подвергавшегося воздействию амиодарона, на изменение частоты стимуляции при экстрасистолических воздействиях и использование эффекта пауз существенно различаются.

3. Острый эффект амиодарона влияет на процессы внутриклеточного гомеостаза ионов кальция, способствуя более эффективному “удержанию” ионов кальция в саркоплазматическом ретикулуме (СР), и/или препятствуя свободному току утечки Ca^{2+} из СР.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. С. Мархасин, П. Б. Цыпьян, О. Г. Артемьева и др., *Физиол. ж. СССР*, **10**, 1339 – 1344 (1987).
2. О. Э. Соловьева, В. С. Мархасин, П. Б. Цыпьян, Б. Б. Келлер, *Биофизика*, **44**(2), 337 – 349 (1999).
3. *Физиология и патофизиология сердца*, Н. Сперелакис (ред.), Медицина, Москва (1990).
4. M. Bergman, F. Cohen, H. Schlesinger, and G. Kessler-Icekson, *Gen. Pharmacol.*, **26**(2), 285 – 290 (1995).
5. W. Bluhm, M. Meyer, E. Swanaon, and W. Dillmann, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **16**(853), 304 – 307 (1998).
6. J. D. Gallagher, J. Bianchi, and L. J. Gessman, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **13**(5), 723 – 729 (1989).
7. D. F. Gray, A. S. Mihailidou, P. S. Hansen et al., *Pharmacol. and Exper. Therap.*, **284**(1), 75 – 82 (1998).
8. H. He, F. J. Giorgano, R. Hilan-Dandan, et al., *J. Clin. Invest.*, **100**, 380 – 389 (1997).
9. K. Kamiya, A. Nishiyama, K. Yasui, et al., *Circulation*, **103**, 1317 (2001).
10. I. Kodama, K. Kamiya, and J. Toyama, *Cardiovasc. Res.*, **35**(1), 13 – 29 (1997).
11. I. Kodama, K. Kamiya, and J. Toyama, *Am. J. Cardiol.*, **84**(9A), 20R – 28R (1999).
12. L. S. Maier, D. M. Bers, and B. Pieske, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **32**(12), 2249 – 2258 (2000).
13. F. D. Marengo, M. T. Marquez, P. Bonazzola, and J. E. Ponce-Hornos, *Am. J. Physiol.*, **276**(1), H309 – H316 (1999).
14. U. Ravens, C. Mahl, S. M. C. Hardman, and M. I. M. Noble, *Basic Res. Cardiol.*, **91**, 123 – 130 (1996).
15. S. N. Wu, A. Y. Shen, and T. L. Hwang, *Chin. J. Physiol.*, **39**(1), 23 – 29 (1996).

Поступила 13.05.05

ACUTE AND CHRONIC AMIODARONE EFFECTS ON THE FORCE – INTERVAL RELATIONSHIP IN RAT PAPILLARY MUSCLE

D. S. Kondrat'eva, S. A. Afanas'ev, and S. V. Popov

Institute of Cardiology, Tomsk Scientific Center of the Russian Academy of Medical Sciences, ul. Kievskaja 111a, Tomsk, 634012 Russia

Effects of acute and chronic amiodarone treatment on the force – interval relationship were investigated in rat papillary muscle. It was found that both acute and chronic amiodarone treatment decreased the amplitude of extrasystoles. At the same time, only short-term administration of amiodarone increased postextrasystoles and post-rest potentiations of twitch force in rat myocardium. It is concluded that the acute and chronic amiodarone treatment suppress the excitability of cardiomyocytes, but only the chronic treatment increases the effective refractory period. The results suggest that the acute administration of amiodarone can influence the intracellular calcium homeostasis.