

ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ МЕДЛЕННЫХ Кальциевых КАНАЛОВ L-ТИПА НА ПОКАЗАТЕЛИ СЕРДЕЧНОЙ, ДЫХАТЕЛЬНОЙ И МОТОРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ У ИНТАКТНЫХ И ПОДВЕРГШИХСЯ ИНТОКСИКАЦИИ ЭЗЕРИНОМ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫСЯТ

УДК 612.648:612.174:612.284:615.017
<https://doi.org/10.7816/RCF17339-49>

© С.В. Кузнецов¹, Н.Н. Кузнецова^{1,2}, П.А. Гайдукова¹

¹ ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» Российской академии наук, Санкт-Петербург;

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

Для цитирования: Кузнецов С.В., Кузнецова Н.Н., Гайдукова П.А. Влияние блокады медленных кальциевых каналов L-типа на показатели сердечной, дыхательной и моторной деятельности у интактных и подвергшихся интоксикации эзеринем новорожденных крысят // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* – 2019. – Т. 17. – № 3. – С. 39–49. <https://doi.org/10.7816/RCF17339-49>

Поступила: 09.07.2019

Одобрена: 14.08.2019

Принята: 11.09.2019

С целью выявления роли кальциевых каналов в развитии нарушений сердечного и дыхательного ритма у новорожденных крысят при введении им ингибиторов ацетилхолинэстеразы (АХЭ), на 3–30-дневных крысятах исследовано влияние блокады кальциевых каналов (БКК) L-типа верапамилом и нифедипином. Изучены показатели функциональной активности сердечной, дыхательной и соматомоторной систем при БКК и в условиях активации холинореактивных структур, вызванной введением крысятам ингибитора АХЭ эзерина на фоне предварительной БКК. Показано, что инъекция блокаторов провоцирует развитие брадикардии, причем верапамил вызывает более выраженное нарушение сердечного ритма у крысят младшего возраста, в то время как блокада дигидропиридиновых рецепторов нифедипином не имеет онтогенетической

специфики. Сходная возрастная динамика касается и реакции дыхательной системы. Верапамил оказывает выраженное, вплоть до остановки, угнетение дыхания у 3–7-дневных и в меньшей степени у 16–30-дневных крысят. Нифедипин незначительно снижает частоту дыхания у младших и повышает у старших крысят. Инъекция нифедипина в большей степени, по сравнению с верапамилом, изменяет уровень и паттерн моторной активности у крыс. Предварительная блокада кальциевых каналов L-типа не оказывает значимого изменения характера реакции на последующее введение животным эзерина.

◆ **Ключевые слова:** крысы; онтогенез; медленные кальциевые каналы; верапамил; нифедипин; эзерин; сердечный ритм; дыхание; моторная активность.

INFLUENCE OF L-TYPE SLOW CALCIUM CHANNELS BLOCKERS ON CARDIAC, RESPIRATORY AND MOTOR ACTIVITY AT THE INTACT AND POISONED BY PHYSOSTIGMINE (ESERINE) OF RATS DURING THE EARLY ONTOGENY

© S.V. Kuznetsov¹, N.N. Kuznetsova^{1,2}, P.A. Gaydukova¹

¹ Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia;

² Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

For citation: Kuznetsov SV, Kuznetsova NN, Gaydukova PA. Influence of L-type slow calcium channels blockers on cardiac, respiratory and motor activity at the intact and poisoned by physostigmine (eserine) of rats during the early ontogeny. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy.* 2019;17(3):39-49. <https://doi.org/10.7816/RCF17339-49>

Received: 09.07.2019

Revised: 14.08.2019

Accepted: 11.09.2019

The effects of calcium-channel blockers (CCBs) (verapamil, nifedipine) on heart rate, respiration rate and motor activity were studied in 3-30-day-old rats. The role of calcium channels in development of disturbances of a heart and respiratory rhythms after introduction to newborn rats of acetylcholinesterase (AChE) inhibitor of physostigmine was revealed. Parameters of functional activity of heart, respiratory and somatomotor systems in case of blockade of calcium channels were studied also under conditions of the

activation of cholinceptive structures caused by an injection to infant rats of AChE inhibitor after premedication by CCBs. It is shown that use of calcium channels blockers leads to development of bradycardia, and verapamil causes more expressed disturbance of a heart rhythm in rats of younger age, while blockade of dihydropyridinic receptors by nifedipine has no ontogenetic specifics. Similar ontogenetic dynamics concerns also reaction of respiratory system. Verapamil have a detrimental effect on respiration, up to

a stop, in 3-7-day-old and to a lesser extent in 16-30-day-old infant rats. Nifedipine slightly reduces a respiration rate at younger infant rats, but raises it at the mature rats. The nifedipine injection more in comparison with verapamil changes the level and a pattern of motor activity. Preliminary blockade of calcium channels does not render

significant change of reaction at the subsequent introduction of physostigmin.

◆ **Keywords:** early ontogenesis of rats; slow calcium channel; verapamil; nifedipine; physostigmine; heart and respiratory rhythm; motor activity.

ВВЕДЕНИЕ

В проведенных нами ранее исследованиях, направленных на изучение последствий введения новорожденным крысятам ингибиторов ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и последующей активации холинореактивных структур, было показано, что у животных возникают нарушения сердечного и дыхательного ритмов. На фоне развивающейся брадикардии сердечный ритм подвергается трансформации, заключающейся в возникновении комплексов еще более медленных сердечных сокращений, возникающих с периодом от 10–15 с до 60–90 мин. По мере развития реакции у крысят могут появиться длительные периоды асистолии, при которой сохраняется сократительная активность предсердий. Это позволяет предполагать, что основной «страдающей мишенью» являются не пейсмекеры и клетки проводящей системы сердца, а кардиомиоциты, имеющие медленные кальциевые каналы. Показано, что инъекция эзерина, так же как и фосфакола, способна спровоцировать возникновение у крысят брадикардических комплексов [1, 19, 28].

Характерные для отравления ингибиторами АХЭ нарушения дыхательного ритма у новорожденных крысят носят более длительный и устойчивый характер, чем нарушения сердечного ритма. В подавляющем числе случаев именно остановка дыхания становится причиной гибели животных.

Медленные кальциевые каналы L-типа локализованы преимущественно в кардиомиоцитах и миоцитах сосудистой стенки. В сердечно-сосудистой системе (ССС) они участвуют в поддержании электрической и механической активности кардиомиоцитов и гладкомышечных клеток сосудов.

Известно, что ацетилхолин (АХ) участвует в регуляции кальциевого метаболизма [2, 27], поэтому нельзя исключить участия кальциевых каналов в механизмах развития патологических нарушений ритмической активности сердечно-сосудистой и дыхательной систем.

Задача данного исследования — изучение возможной роли медленных кальциевых каналов L-типа в развитии нарушений ритма дыхания и сердцебиений, а также паттерна моторной активности (МА) в раннем постнатальном онтогенезе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На новорожденных и препубертатных крысах проведено исследование функциональной активности

сердечной, дыхательной и соматомоторной систем в норме и после блокады медленных кальциевых каналов L-типа. Дополнительно проведен анализ изменений физиологических показателей крысят в условиях активации холинореактивных структур после применения ингибитора АХЭ эзерина, осуществленного на фоне предварительной блокады кальциевых каналов.

Работа выполнена на крысятах линии Вистар 3-, 7-, 16- и 30-дневного возраста (P3–30). В каждой экспериментальной группе было по 12–14 животных, всего — 268 крысят. Исследования проводили в острых опытах в соответствии с правилами, рекомендованными Физиологической секцией Российского национального комитета по биологической этике.

Животных помещали в экранированную камеру с температурой $26 \pm 0,5$ °С. Контроль температуры осуществляли с помощью цифрового термометра RST-02100 (RST, Швеция). Регистрацию физиологических показателей проводили на ненаркотизированных крысятах в условиях мягкой фиксации животных. Исследование начинали через 15 минут, после адаптации крысенка к окружающей среде.

Исследовали ЭКГ, показатели внешнего дыхания, ЭМГ мышц задней лапы (икроножная мышца). В целях снижения уровня артефактов, при регистрации ЭКГ у 3- и 7-дневных крысят применяли нестандартное отведение от теменной части головы и крестцовой области, у 16- и 30-дневных — II стандартное отведение. Для анализа частоты дыхания (ЧДД) осуществляли регистрацию экскурсии грудной клетки с использованием пьезоэлектрического датчика (датчик VP-102, РФ, ФРГ). В экспериментах использовали усилители биопотенциалов ИУ-40 (ЭПМ НИИЭМ РАМН, Россия). ЧДД регистрировали при полосе пропускания усилителя от 0,15 до 30 Гц, ЭКГ — от 5 до 50 Гц, ЭМГ — от 5 до 150 Гц. Для ввода аналоговых сигналов в компьютер использовали АЦП Е14–440 (L-card, Россия) с периодом дискретизации 1 мс. Общее время исследования каждого животного составляло от 90 до 120 минут. Анализ регистрируемых сигналов проводили в программе «PowerGraph 3.3.9».

У интактных крысят перед введением препаратов в течение 30 мин определяли показатели МА, сердечного и дыхательного ритмов.

В ходе исследования было проведено три серии экспериментов. В первой серии после 30-минутной регистрации показателей у интактных животных, крысятам вводили блокатор кальциевых каналов

верапамил (ПАО «Биосинтез», Россия) в дозах 5, 12,5 и 25 мг/кг внутривенно.

Во второй серии осуществляли инъекцию животным блокатора кальциевых каналов нифедипина (N7634 Sigma, США) в дозах 10, 20 и 30 мг/кг внутривенно. Препарат растворяли в смеси ДМСО (АО «Татхим-фармпрепараты», Россия) с водой в соотношении 1 : 1.

В третьей серии экспериментов осуществляли премедикацию животных верапамилом (12,5–25 мг/кг) или нифедипином (30 мг/кг), а через 5 мин вводили ингибитор ацетилхолинэстеразы эзерин (05211751 MP Biomedicals, США) в летальной дозе $3/4$ LD₅₀.

В проведенных ранее исследованиях для крысят разного возраста были установлены LD₅₀ эзерина [28]. Основываясь на этих данных, мы осуществляли внутривенную инъекцию эзерина в дозе 1,3 мг/кг ($3/4$ LD₅₀) для возраста P3–P7 и 0,7 мг/кг ($3/4$ LD₅₀) — для P16–P30.

Статистическая обработка данных осуществлялась в программе «Origin 2015». Использовался парный тест Стьюдента с поправками Холма и однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Тьюки. Статистически обработанные данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. Все изменения рассматривались по отношению к фоновым показателям до введения препаратов. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Расчеты временных показателей ЧСС и ЧДД осуществлялись в периоды с правильным (регулярным) ритмом.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было проведено предварительное скрининговое исследование влияния различных доз блокаторов кальциевых каналов (БКК) на ряд физиологических показателей 3–16-дневных крысят. Верапамил вводили внутривенно в дозах 2,5–100 мг/кг, нифедипин — 10–40 мг/кг. При введении верапамила в дозе 2,5–25 мг/кг происходит развитие брадикардии, степень которой зависит от дозы препарата и существенно различается у крысят разного возраста. Начиная с дозы 50 мг/кг, значимых возрастных различий не наблюдается, а изменения носят токсический характер.

■ Таблица 1. Изменение частоты дыхания и сердцебиения у крысят в фоне, после инъекции верапамила и последующем введении животному эзерина

Возраст, сутки	Показатели					
	ЧСС, мин			ЧДД, мин		
	фон	верапамил	эзерин	фон	верапамил	эзерин
3-и	292,5 ± 23,2	174,5 ± 29,3*	58,2 ± 6,2*	68,7 ± 2,8	50,4 ± 5,1	30,3 ± 9,1*
7-е	314,0 ± 16,8	222,9 ± 25,0*	137,5 ± 38,9*	70,4 ± 6,2	62,3 ± 3,7	41,0 ± 5,2*
16-е	440,3 ± 12,3	226,5 ± 30,2*	137,7 ± 32,7*	104,8 ± 8,1	83,0 ± 7,5*	76,0 ± 5,0*
30-е	545,0 ± 11,2	483,3 ± 26,7	148,7 ± 25,5*	112,0 ± 6,7	110,8 ± 2,6	29,3 ± 0,7*

Примечание: * $p \leq 0,05$ — достоверность различий между фоном и препаратом. ЧДД — частота дыхательных движений, ЧСС — частота сердечных сокращений.

На основании полученных результатов для дальнейшей работы были выбраны дозы 12,5 и 25 мг/кг для верапамила и 30 мг/кг — для нифедипина. Инъекции препаратов в меньших дозах не вызывали у крысят стабильной однонаправленной реакции, в больших — приводили к гибели животных. Указанные дозы БКК сопоставимы с дозами, используемыми в экспериментальных работах другими исследователями [15].

Анализ физиологических показателей, полученных в последующих экспериментах с введением верапамила, показал отсутствие значимых различий в характере реакций на введение препарата в дозах 12,5 и 25 мг/кг, поэтому мы сочли возможным объединить их в одну группу.

1. Влияние верапамила

Введение верапамила крысам всех исследованных возрастных групп сопровождается развитием брадикардии, максимально выраженной у крысят младшего возраста (табл. 1, рис. 1). У 67 % крысят 16-дневного возраста через 7–15 мин наблюдается возникновение атриовентрикулярной блокады по типу Мобиц II, сменяющейся у 25 % крысят предсердной бигеминией. Сходная картина нарушений наблюдалась у одного семидневного и одного 30-дневного животного. Нарушений проводимости у трехдневных крысят мы не обнаружили.

Анализ дыхательного ритма показал, что после инъекции верапамила у крысят происходит замедление дыхательного ритма (табл. 1, рис. 2), возникает тахи-брадиаритмия, проявляющаяся в периодическом изменении частоты дыхания. На третьи сутки тахи-брадиаритмия дыхания наблюдается у 20 %, на седьмые — у 27 %, на 16-е — у 63 %, на 30-е — у 22 % животных. У крысят младших возрастных групп может усиливаться пачечная форма дыхания, периодически встречающаяся и в норме на ранних стадиях постнатального развития. У 30 % семидневных и 80 % 16-дневных крысят аритмия дыхания сопровождается периодами апноэ. Кроме того, у части 16–30-дневных крыс возникает дополнительный поверхностный вдох в промежутках между основными дыхательными движениями.

Через 10–20 мин после введения верапамила у 15 % трех- и 30-дневных, а также 50 и 75 % семи-

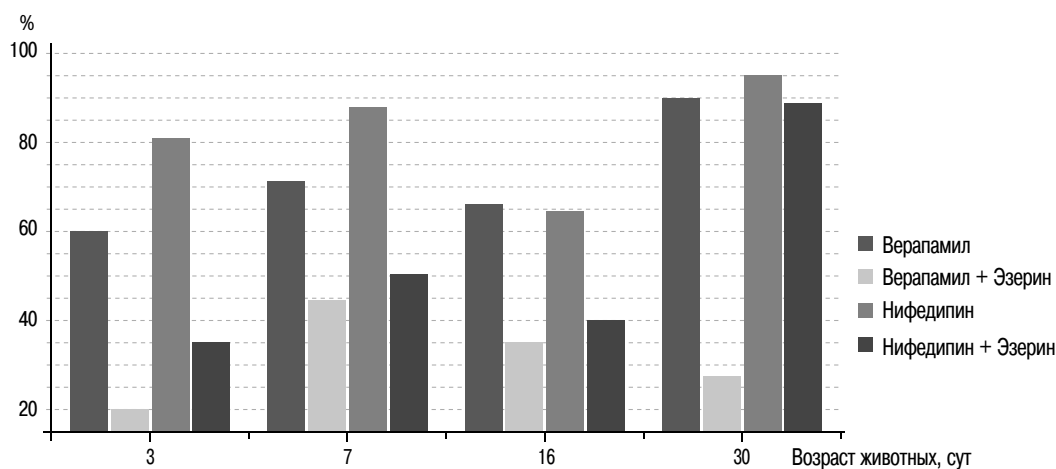


Рис. 1. Изменение частоты сердечных сокращений у крысят разного возраста после фармакологических воздействий в процентах относительно фонового уровня

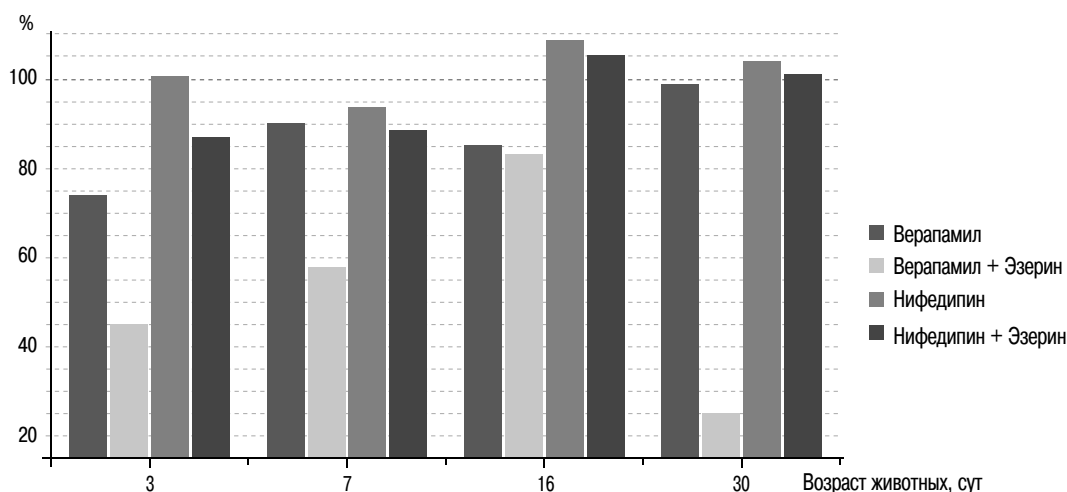


Рис. 2. Изменение частоты дыхания у крысят разного возраста после фармакологических воздействий в процентах относительно фонового уровня

и 16-дневных крысят соответственно амплитуда дыхательных движений резко падает, возникает декасекундный ритм высокоамплитудных судорожных вздохов с периодом от 2 до 20 с. Сходная картина нарушения дыхательного ритма представлена ниже на рис. 4.

Блокада кальциевых каналов верапамилом у трехдневных крысят не вызывает значимых изменений в паттерне и выраженности спонтанной периодической моторной активности (СПМА). У 28 % животных наблюдается увеличение количества джерков, возникающих каждые 7–10 с. Начиная с седьмых суток у подавляющего числа крысят инъекция блокатора сопровождается снижением МА, а у 35–40 % животных эффект отсутствовал.

2. Влияние нифедипина

Введение нифедипина крысятам всех исследованных возрастных групп не вызывает значимых нарушений сердечного ритма за исключением брадикардии, начинающейся с первых минут после инъекции препарата (табл. 2, рис. 1).

В отличие от верапамила, вызывающего снижение ЧДД, инъекция животным нифедипина приводит к слабому учащению дыхания. Исключением являются семидневные крысята, у которых введение препарата вызывает уменьшение частоты дыхания на 6 % (см. табл. 2, рис. 2). Нарушение ритма дыхания выражено в меньшей степени, чем это происходит после введения верапамила. Так, на третьи сутки тахи-брадиаритмия дыхания наблюдается у 40 % животных, а на седьмые — у 14 %, на 16-е и 30-е сутки нарушений дыхательного ритма не зафиксировано. У трехдневных крысят снижение частоты дыхания может сопровождаться появлением пачечной формы дыхания.

У 25 % трехдневных крысят после кратковременного снижения уровня МА наблюдается ее усиление, происходит замещение околоминутного ритма декасекундным; на седьмые сутки у 57 % крысят в паттерне СПМА устанавливается преобладание декасекундной периодики, а у 14 % усиливается околоминутный ритм с выраженной околосекундной (локомоторной) составляющей внутри комплексов

■ **Таблица 2. Изменение частоты дыхания и сердцебиения у крысят в фоне, после инъекции нифедипина в дозе 30 мг/кг и последующем введении животному эзерина**

Возраст, сутки	Показатели					
	ЧСС, мин			ЧДД, мин		
	фон	нифедипин	эзерин	фон	нифедипин	эзерин
3-и	222,5 ± 19,8	179,0 ± 27,9	77,3 ± 3,4*	50,3 ± 2,0	50,8 ± 7,1	43,5 ± 8,7
7-е	307,4 ± 13,7	268,6 ± 19,1*	151,2 ± 21,5*	72,1 ± 4,0	67,6 ± 4,3	62,9 ± 6,8
16-е	450,7 ± 13,5	302,7 ± 38,4*	175,0 ± 11,5*	84,3 ± 7,7	91,0 ± 6,7	89,3 ± 11,8
30-е	518,0 ± 10,1	477,3 ± 4,8	441,3 ± 31,5	127,3 ± 9,6	131,3 ± 3,9	128,7 ± 21,0

Примечание: * $p \leq 0,05$ — достоверность различий между фоном и препаратом. ЧДД — частота дыхательных движений, ЧСС — частота сердечных сокращений.

активности; у 16- и 30-дневных крысят инъекция нифедипина не вызывает значимых изменений интенсивности и паттерна СПМА.

3. Последствия блокады АХЭ эзеринном

Анализ влияния эзерина на показатели функциональной активности 1–30-дневных крысят был подробно изложен в ранее опубликованных статьях [1, 3, 28]. Основными последствиями блокады АХЭ у новорожденных (однодневных) крысят являются серьезные нарушения ритма сердца и ритмической активности дыхательной системы. Реакция на введение препарата развивается постепенно и проходит две стадии развития дисфункции.

1. Стадия брадикардической аритмии, во время которой происходит значительное замедление текущего сердечного ритма, с появлением комплексов еще более выраженной брадикардии, следующих в декасекундном и околominутном ритме. Характерной особенностью брадикардических комплексов в этот период является то, что при максимально низкой частоте сердцебиений их амплитуда может составлять более 1 с (приблизительно 600–700 % по сравнению с фоновым уровнем). К 16-м суткам постнатального развития стадия брадикардической аритмии в 67 % случаев полностью отсутствует, а в остальных — укорачивается. Амплитуда брадикардических комплексов становится всего в 1,5–2 раза больше, чем до введения препарата.

2. Стадия постаритмии, в которую у крысят младшего возраста амплитуда брадикардических комплексов уменьшается, а период их возникновения составляет несколько минут. На 16-е сутки стадия постаритмии представлена низкоамплитудными, уменьшенными по размаху комплексами. Восстановление правильного синусового ритма происходит быстрее, чем у однодневных животных [28].

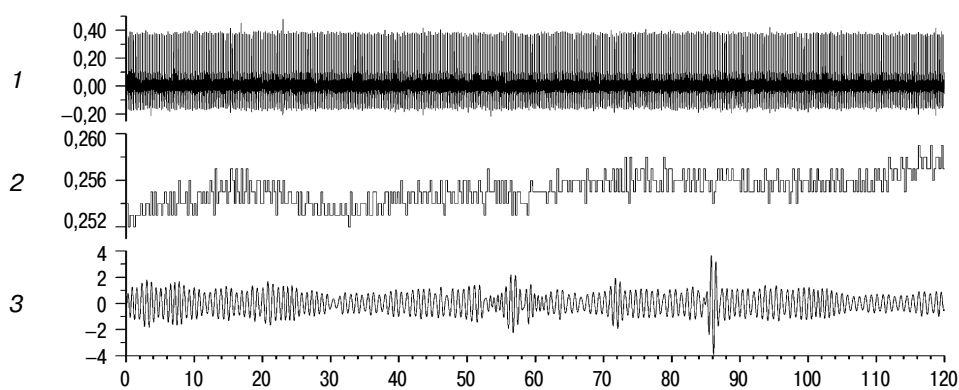
Активация холинореактивных структур вызывает снижение частоты и регулярности дыхания, а также приводит к изменениям паттерна и параметров моторной активности. У одно- и 16-дневных крысят дыхательная система реагирует на введение эзерина на несколько минут раньше, чем сердечно-сосудистая система. Наблюдается потенциация моторной активности у однодневных и угнетение у 16-дневных крысят.

Анализ вариабельности сердечного ритма показал, что инъекция эзерина крысятам обеих возрастных групп приводит к перераспределению регуляторных влияний и их усилению со стороны центральных и гуморально-метаболических факторов. Вместе с тем имеются определенные возрастные различия. Доля регуляторных симпатических влияний после введения эзерина увеличивается на 3,7 % у однодневных и снижается на 2,2 % у 16-дневных животных. Сдвиг вагосимпатического баланса сопровождается нарушениями синусового ритма сердца, особенно выраженными у крысят младшего возраста [3].

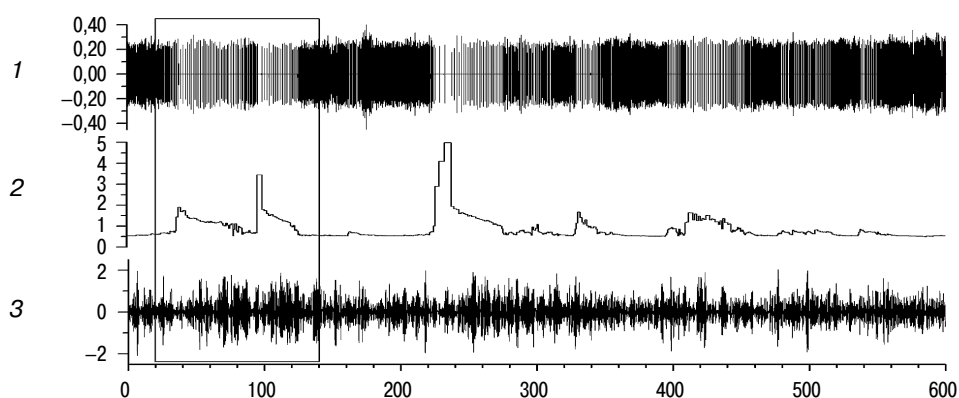
4. Действие эзерина на фоне блокады медленных кальциевых каналов верапамилом

Премедикация верапамилом сопровождается развитием брадикардии с ее последующим углублением после инъекции эзерина (табл. 1, рис. 1). У 57 % трехдневных крысят возникают медленные брадиаритмические комплексы (рис. 3). С седьмых суток такие комплексы у крысят практически не наблюдаются, в то время как без БКК встречаются после введения эзерина у животных всех возрастных групп. У отдельных животных регистрируется возникновение атриовентрикулярной блокады или бигеминии.

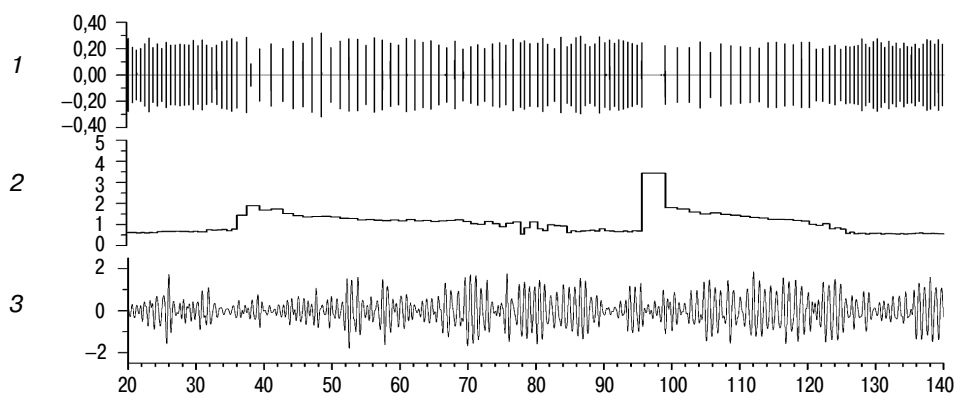
У подавляющего большинства трех- и 30-дневных крысят имеет место снижение ЧСС (табл. 1, рис. 2) и нарушение дыхательного ритма («развал» дыхания), характерное для отравления эзеринном. У 43 % трехдневных и 50 % семидневных крысят происходит снижение амплитуды и частоты дыхания. Регистрируются высокоамплитудные вздохи, следующие в декасекундном (20–40 с) или околominутном (60–120 с) ритме. Такой ритм дыхания может быть, как синхронизирован с возникновением джерков (вздрагиваний), так и независим от МА. Патологический ритм дыхания может длиться до 40–45 мин, после чего наступает полная остановка дыхания. У 60 % 16- и 30-дневных крысят наблюдается нарушение дыхательного ритма с возникновением периодов апноэ и замедлением ЧДД до 20 дыхательных движений в минуту. Проводившиеся нами ранее без премедикации верапамилом инъекции новорожденным крысятам ингибиторов АХЭ (фосфакол, армин, эзерин), не вызывали возникнове-



а



б



в

Рис. 3. Регистрация ЭКГ (1), периодограммы сердечного ритма (2) и дыхания (3) у интактного (а) трехдневного крысенка и через 20 мин после инъекции ему эзерина (б) на фоне премедикации верапамилом. На в — фрагмент записи (б), отмеченный прямоугольником. *Примечание:* по оси абсцисс — время наблюдения (с), по оси ординат: 1 — амплитуда ЭКГ (мВ); 2 — амплитуда периодограммы сердечного ритма (с); 3 — амплитуда пьезограммы дыхания (В)

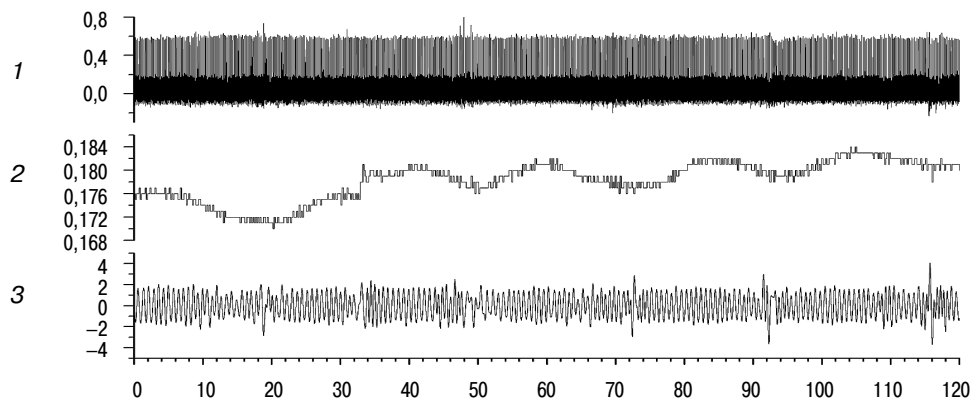
ния такого типа дыхания. Особый интерес заслуживает синхронизированная с медленным дыхательным ритмом модуляция сердечного ритма (см. рис. 4). Анализ механизмов такой синхронизации требует проведения дополнительных исследований.

Премедикация верапамилом и последующая инъекция эзерина 3–7-дневным крысятам приводят к снижению общего уровня моторного возбуждения и усилению в паттерне МА декасекундной и околоми-

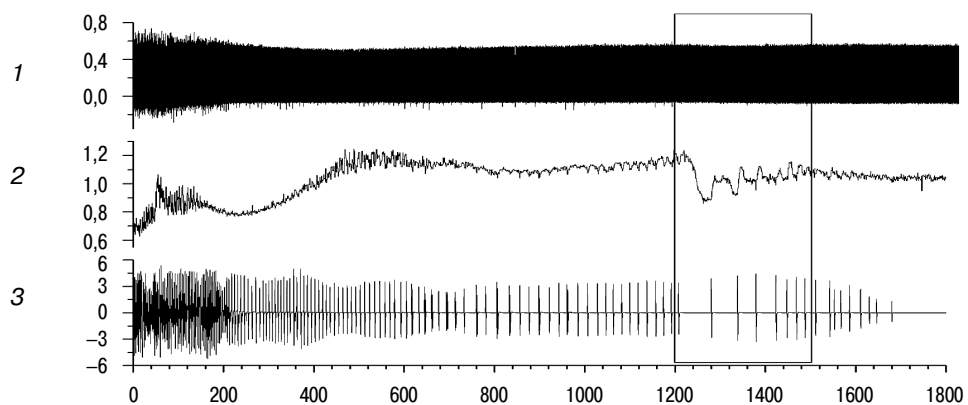
нутной периодики моторных вспышек. На 16-е сутки МА снижается, а на 30-е сутки у подавляющего числа животных регистрируется низкоамплитудная асинхронная МА.

5. Действие эзерина на фоне блокады медленных кальциевых каналов нифедипином

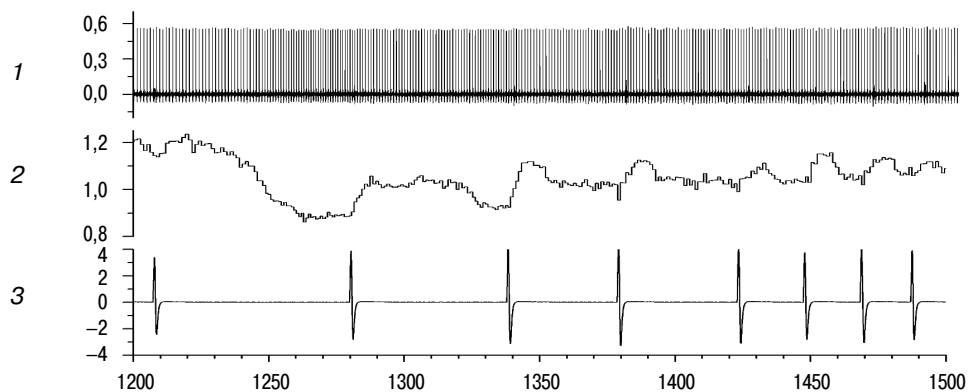
У подавляющего числа 3–7-дневных животных на фоне снижения ЧСС (см. табл. 2, рис. 1) наблю-



а



б



в

Рис. 4. Регистрация ЭКГ (1), периодограммы сердечного ритма (2) и дыхания (3) у интактного (а) трехдневного крысенка и через 5 мин после инъекции ему эзерина (б) на фоне премедикации верапамилом. На в — фрагмент записи (Б), отмеченный прямоугольником. *Примечание:* по оси абсцисс — время наблюдения (с), по оси ординат: 1 — амплитуда ЭКГ (мВ); 2 — амплитуда периодограммы сердечного ритма (с); 3 — амплитуда пьезограммы дыхания (В)

дается возникновение брадикардических комплексов, характерных для отравления эзерином и описанных нами ранее. Брадикардические комплексы возникают у 30 % 16-дневных крысят и не регистрируются у животных месячного возраста. Анализ изменений дыхательного ритма в ответ на блокаду АХЭ не выявил определенной онтогенетической динамики. Частота дыхания меняется незначительно (см. табл. 2, рис. 2). Первоначальное нарушение

ритма дыхания, возникшее в ответ на инъекцию нифедипина, переходит в выраженную тахи-брадиаритмию, сопровождающуюся возникновением дополнительных нерегулярных дыхательных движений, накладывающихся на фазу выдоха. Следует отметить, что, в отличие от верапамила, нифедипин не вызывает возникновения декасекундной дыхательной ритмики и остановки дыхания. Не наблюдается патологических форм дыхания и при последующем вве-

дении эзерина. Активация холинореактивных структур, осуществляемая на фоне действия нифедипина, приводит к возникновению низкоамплитудной асинхронной МА у трехдневных и, в меньшей степени, семидневных крысят. На 16-е сутки интенсивность МА немного снижается, а на 30-е — не отличается от исходного фонового уровня.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ионы кальция Ca^{2+} , по биологическому закону единообразия действия, выполняют ключевую роль при реализации функции различных отделов ССС: контролируют частоту ритма возбуждения пейсмерных и скорость проведения возбуждения специализированных клеток сердца, сократительную функцию миоцитов — структурных клеточных единиц ССС. Известно, что кальциевый ток в нормальных физиологических условиях изменяется под влиянием нейротрансмиттеров: адреналин его увеличивает (поддерживает каналы в открытом состоянии), ацетилхолин (АХ) — уменьшает (закрывает каналы). Поступление избыточного количества Ca^{2+} или нарушение его выведения из клетки сопровождается нарушением специфической функции клетки (проведение, сокращение), что интегрально приводит к дефекту насосной деятельности сердца или подъему артериального давления [5].

Показано, что передозировка верапамила сопровождается гипотензией, брадиаритмией, блокадами атриовентрикулярной проводимости и остановкой сердца [10, 11].

БКК первого поколения, к которым относятся верапамил и нифедипин, имеют короткий период действия, обладают отрицательным инотропным влиянием на миокард, замедляют атриовентрикулярную проводимость. Это делает их недостаточно эффективными в качестве лечебных средств, но позволяет моделировать эффекты воздействия больших доз АХ [5].

Начиная свое исследование, мы допускали, что введение блокаторов медленных кальциевых каналов может вызвать со стороны сердечно-сосудистой и дыхательной систем реакции, сходные с наблюдаемыми нами у крысят после инъекции им фосфакола или эзерина [19, 28].

Однако этого не произошло. Не считая брадикардии, ни представитель группы фенилалкиламинов верапамил, ни препарат дигидропиридинового ряда нифедипин не вызвали значимых нарушений синусового ритма сердца. Исключением стали 16-е сутки, когда у крысят после введения верапамила возникали эпизоды экстрасистолии и атриовентрикулярной блокады. Премедикация верапамилем, но не нифедипином, в большинстве случаев предотвращает развитие медленных брадикардических комплексов, возникающих после инъекции эзерина.

Следует обратить внимание и на тот факт, что инъекция БКК, осуществляемая на фоне уже появившихся у крысят после ингибирования АХЭ периодов тахи-брадикардии, оказывается не эффективной, не устраняя и не сглаживая развившуюся патологическую периодику. Возможно, это может быть связано с тем, что АХ снижает биодоступность верапамила, уменьшает его антиангинальное, гипотензивное и противоаритмическое действие. Показано, что эндогенный АХ может модулировать содержание Ca^{2+} в пресинаптическом окончании за счет воздействия на никотиновые и мускариновые рецепторы [4]. Ранее нами было показано, что ингибирование АХЭ и последующая активация холинореактивных структур приводит у новорожденных животных к развитию серьезных нарушений сердечного и дыхательного ритмов [19]. Нерегулярные брадикардические комплексы сердечного ритма, в ряде случаев наблюдаемые и у интактных животных, возможно, обусловлены колебаниями уровня активности парасимпатического отдела вегетативной нервной системы [28]. Учитывая, что у животных старшего возраста периоды выраженной брадикардии коррелируют с появлением всплеск моторной активности, нельзя исключить и участие межсистемных взаимодействий в механизмах возникновения брадикардических комплексов сердечного ритма.

Действие блокаторов кальциевых каналов на миокардиальную мышцу достаточно верифицировано, но их влияние на скелетную мышцу понятно значительно хуже. Авторы проведенных исследований получили противоречивые результаты, продемонстрировавшие как постсинаптические курареподобные эффекты, так и пресинаптическое торможение выброса АХ или сочетанные пре- и постсинаптические эффекты [6, 7, 22, 26].

В нашем исследовании после инъекции верапамила у крысят выявились нарушения частоты и паттерна дыхания. В мировой литературе имеется ограниченное количество публикаций, свидетельствующих о возможном побочном действии этого ингибитора кальциевых каналов на дыхательную систему.

Известно, что у больных с тяжелой дисфункцией левого желудочка при внутривенном введении верапамила может развиваться электромеханическая диссоциация с остановкой дыхания при сохранении электрической активности сердца. Аналогичные нарушения могут возникнуть и при отравлении высокими дозами верапамила [17].

Анализ описанных клинических случаев серьезных нарушений дыхания после введения больным верапамила свидетельствует о том, что в терапевтических дозах препарат не блокирует кальциевые каналы в скелетных мышцах, но может обладать курареподобным эффектом в высоких дозах или при наличии каких-либо нарушений нервно-мышечной передачи, например, при мышечной дистрофии Дюшенна, миастеническом синдроме Ламберта – Итона

или при умеренно тяжелой обобщенной миастении. Было высказано мнение, что даже минимального нарушения синаптической передачи достаточно, чтобы спровоцировать у пациента острую декомпенсацию с терминальной стадией [8, 18, 30]. По мнению других авторов, верапамил может оказывать переходящее негативное влияние на сокращение скелетной мышцы даже при отсутствии явных признаков соматических расстройств [13, 24].

Применение блокаторов медленных кальциевых каналов в концентрациях, превышающих терапевтические уровни, может привести к побочным действиям, таким как чрезмерное сосудорасширение, отрицательная инотропия и центральное нарушение атриовентрикулярного проведения [10]. Исследование, проведенное в Академическом медицинском центре в Амстердаме, показало, что при приеме большими нифедипина в дозе более 60 мг/день значительно повышается риск внезапной остановки сердца [9].

Интоксикация верапамилом может вызывать тяжелую гемодинамическую нестабильность, требующую вазопрессорной поддержки. Имеются зарегистрированные истории болезни с развитием некардиогенного отека легких после передозировки верапамила. Однако точные механизмы, ответственные за отек легких, остаются неясными [16]. Более того, есть определенные противоречия между результатами, полученными в условиях *in vivo* и *in vitro*. В экспериментах *in vitro* показано, что в изолированной трахее холиномиметик карбохолин вызывает стимуляцию М-холинорецепторов и открытие L-каналов, что вызывает увеличение кальция внутри клетки и развитие бронхоспазма [25]. В то же время премедикация верапамилом уменьшает спазм мышц трахеи, вызванный введением АХ [12].

В проведенном нами исследовании предварительное введение крысам верапамила или нифедипина перед инъекцией эзерина не предотвращало развитие патологических реакций со стороны дыхательной системы. Опубликованная информация не позволяет однозначно и аргументированно интерпретировать полученные нами данные, что требует проведения дополнительных исследований.

Возрастная реакция на эзерин после премедикации верапамилом не выражена, в то время как на нифедипин имеет ряд особенностей. Это может быть связано с более широким спектром точек приложения нифедипина. Известно, что нифедипин проявляет часть своих физиологических эффектов через потенцирование аденозина, а результирующее действие оказывается намного более сложным, чем при простой блокаде кальциевого канала [14, 29]. Нельзя исключить, что структурное или функциональное созревание какой-либо из точек приложения препарата изменяет конечную (результирующую) реакцию на его воздействие.

Кроме того, различия в выраженности сердечной и дыхательной аритмии у крысят после блока-

ды у них кальциевых каналов может быть связана с рядом других факторов: гетерохронией развития как различных подтипов кальциевых каналов в миокарде [20], так и альфа-2-субъединицы натрий-кальциевого насоса [21], возрастной гетерогенностью ионных каналов и проходящих через них кальциевых и натриевых токов [23].

Таким образом, в ходе проведенного нами исследования показано, что в раннем постнатальном онтогенезе крыс блокада кальциевых каналов L-типа сопровождается брадикардией. Отрицательный хронотропный эффект максимально выражен в первые 16 суток жизни крысят после инъекции им верапамила и, в меньшей степени, нифедипина.

Высокие дозы верапамила могут провоцировать развитие экстрасистолии, особенно у 16-дневных животных. Верапамил замедляет частоту дыхания у крысят, вызывает длительные периоды апноэ вплоть до полной остановки дыхания. Инъекция нифедипина не оказывает значимого влияния на дыхательный ритм. Премедикация БКК перед введением крысам эзерина не только не препятствует развитию брадикардии, но и оказывает синергетическое действие. Характерное для отравления блокаторами АХЭ развитие выраженной тахи-брадикардии сглаживается премедикацией верапамилом. Важным практическим моментом, требующим пристального внимания, является значительно более высокая чувствительность дыхательной системы незрелого животного к высоким дозам верапамила по сравнению с дефинитивным уровнем развития.

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).

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузнецов С.В., Кузнецова Н.Н. Изменение показателей гемодинамики в раннем постнатальном онтогенезе крыс после инъекции ингибитора холинэстеразы эзерина и при премедикации М- и Н-холинолитиками // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2018. – Т. 104. – № 9. – С. 1075–1085. [Kuznetsov SV, Kuznetsova NN. The change of hemodynamic indexes in early postnatal ontogenesis of rats after injection of the inhibitor of ezerin cholinesterase and in premedication of M- and N-cholinolithics. *Russian journal of physiology*. 2018;104(9):1075-1085. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S086981391809006X>.
2. Самигуллин Д.В., Хазиев Э.Ф., Ковязина И.В., и др. Регуляция мускариновыми рецепторами кальциевого транзистента и синаптической передачи в нервно-мышечном соединении лягушки // Гены и клетки. – 2014. – Т. 9. – № 3–2. – С. 242–247. [Samigullin DV, Khaziev EF, Kovyazina IV, et al. Muscarinic regulation of calcium tran-

- sient and synaptic transmission in frog neuromuscular junction. *Genes and cells*. 2014;9(3-2):242-247. (In Russ.)]
3. Сизонов В.А., Дмитриева Л.Е. Изменение деятельности сомато-висцеральных систем у новорожденных крыс в условиях блокады Н-холинорецепторов и активации холинореактивных структур // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 167. – № 2. – С. 168–174. [Sizonov VA, Dmitrieva LE. Changes in the activity of somato-visceral systems of newborn rats under conditions of the blockade of N-cholinergic receptors and the activation of cholinergic structures. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2019;167(2):168-174. (In Russ.)]
 4. Хазаиев Э.Ф. Изменение кальциевого транзита в двигательном нервном окончании под действием холинергических агентов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Казань, 2015. – 22 с. [Khazaiev EF. *Izmenenie kal'tsievogo tranzienta v dvigatel'nom nervnom okonchani pod deystviem kholinergicheskikh agentov*. [dissertation] Kazan'; 2015. 22 p. (In Russ.)]. Доступно по: <https://search.rsl.ru/ru/record/01005568461>. Ссылка активна на 14.04.2019.
 5. Шилов А.М., Дулаева М.С., Осия А.О., Лишута А.С. Лечение пациентов с артериальной гипертонией и метаболическим синдромом. Место комбинированных препаратов // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2014. – Т. 10. – № 1. – С. 92–98. [Shilov AM, Dulaeva MS, Osiya AO, Lishuta AS. Treatment of patients with arterial hypertension and metabolic syndrome. The role of the combination drugs. *Rational pharmacotherapy in cardiology*. 2014;10(1):92-98. (In Russ.)]
 6. Bikhazi GB, Leung I, Foldes FF, et al. Ca-channel blockers increase potency of neuromuscular blocking agents *in vivo*. *Anesthesiology*. 1983;59:A269.
 7. Bondi AY. Effects of verapamil on excitation-contraction coupling in frog sartorius muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 1978;205(1):49-57.
 8. Del Pozo E, Baeyens JM. Effects of calcium channel blockers on neuromuscular blockade induced by aminoglycoside antibiotics. *Eur J Pharmacol*. 1986;128(1-2):49-54. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(86\)90556-x](https://doi.org/10.1016/0014-2999(86)90556-x).
 9. Advancement of Science (AAAS). Commonly used heart drug associated with increased risk of sudden cardiac arrest. Available from: https://www.eurekalert.org/pub_releases/2019-03/esoc-cuh031219.php.
 10. Fermini B, Ramirez DS, Sun S, et al. L-type calcium channel antagonism – Translation from *in vitro* to *in vivo*. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2017;84:86-92. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2016.11.002>.
 11. Friedman T, Feld Y, Adler Z, et al. Acute respiratory distress syndrome associated with intravenous lipid emulsion therapy for verapamil toxicity, successfully treated with venovenous ECMO. *J Develop Drugs*. 2017;6(3):182. <https://doi.org/10.4172/2329-6631.1000182>.
 12. Ghayur MN, Gilani AH, Janssen LJ. Ginger attenuates acetylcholine-induced contraction and Ca²⁺ signalling in murine airway smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008;86(5):264-271. <https://doi.org/10.1139/Y08-030>.
 13. Howard JF, Sanders DB. Neurotoxicology of neuromuscular transmission. Chapter 12. In: Handbook of clinical neurology. Vol. 91. Neuromuscular junction disorders. Amsterdam [Netherlands]: Elsevier; 2008. P. 369-400. [https://doi.org/10.1016/s0072-9752\(07\)01512-6](https://doi.org/10.1016/s0072-9752(07)01512-6).
 14. Janis RA, Silver PJ, Triggler DJ. Drug action and cellular calcium regulation. *Adv Drug Res*. 1987;16:309-591.
 15. Johnson PL, Bhattacharya SK. Regulation of membrane-mediated chronic muscle degeneration in dystrophic hamsters by calcium-channel blockers: diltiazem, nifedipine and verapamil. *J Neurol Sci*. 1993;115(1):76-90. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(93\)90070-f](https://doi.org/10.1016/0022-510x(93)90070-f).
 16. Izdes S, Altintas ND, Soykut C. Acute respiratory distress syndrome after verapamil intoxication: case report and literature review. *Acta Clin Belgica*. 2014;69(2):116-119. <https://doi.org/10.1179/229533714Y.0000000007>.
 17. Kolcz J, Pietrzyk J, Januszewska K, et al. Extracorporeal life support in severe propranolol and verapamil intoxication. *J Intensive Care Med*. 2007;22(6):381-385. <https://doi.org/10.1177/0885066607307528>.
 18. Krendel DA, Hopkins LC. Adverse effect of verapamil in a patient with the Lambert-Eaton syndrome. *Muscle Nerve*. 1986;9(6):519-522. <https://doi.org/10.1002/mus.880090607>.
 19. Kuznetsov SV, Goncharov NV, Glashkina LM. 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*. 2005;41(2):201-210. <https://doi.org/10.1007/s10893-005-0055-x>.
 20. Lu ZJ, Pereverzev A, Liu HL, et al. Arrhythmia in isolated prenatal hearts after ablation of the Cav2.3 (alpha1E) subunit of voltage-gated Ca²⁺-channels. *Cell Physiol Biochem*. 2004;14(1-2):11-22. <https://doi.org/10.1159/000076922>.
 21. Moseley AE, Lieske SP, Wetzel RK, et al. The Na, K-ATPase alpha2 isoform is expressed in neurons, and its absence disrupts neuronal activity in newborn mice. *J Biol Chem*. 2003;278(7):5317-5324. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211315200>.
 22. Oz M, Frank GB. The effects of verapamil on tetanic contractions of frog's skeletal muscle. *Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 1994;107(3):321-329. [https://doi.org/10.1016/1367-8280\(94\)90057-4](https://doi.org/10.1016/1367-8280(94)90057-4).
 23. Protas L, Difrancesco D, Robinson RB. L-type but not T-type calcium current changes during postnatal development in rabbit sinoatrial node. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281(3): H1252-H1259. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.3.h1252>.
 24. Radhakrishnan S, Talwar KK, Kaushal R, Bhatia ML. Respiratory arrest with IV verapamil. *Am Heart J*. 1986;111(3):622. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(86\)90084-0](https://doi.org/10.1016/0002-8703(86)90084-0).
 25. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, et al. Pharmacology. Churchill Livingstone, 8th edition. Edinburgh; New York: Elsevier/Churchill Livingstone; 2015.
 26. Ribera AB, Nastuk WL. The actions of verapamil at the neuromuscular junction. *Comp Biochem Physiol C*. 1989;93(1):137-141. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(89\)90023-6](https://doi.org/10.1016/0742-8413(89)90023-6).

27. Shen JX, Yakel JL. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. *Acta Pharmacol Sin.* 2009;30(6):673-80. <https://doi.org/10.1038/aps.2009.64>.
28. Sizonov VA, Dmitrieva LE. Heart rhythm disturbances caused by injection of cholinesterase inhibitor physostigmine to rats during the early ontogeny. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2018;165(1):44-47.
29. Swanson TH, Green CL. Nifedipine: more than a calcium channel blocker. *Gen Pharmacol.* 1986;17(3):255-260. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(86\)90038-8](https://doi.org/10.1016/0306-3623(86)90038-8).
30. Zalman F, Perloff JK, Durant NN, Campion DS. Acute respiratory failure following intravenous verapamil in Duchenne's muscular dystrophy. *Am Heart J.* 1983;105(3):510-511. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(83\)90371-x](https://doi.org/10.1016/0002-8703(83)90371-x).

♦ Информация об авторах

Сергей Владимирович Кузнецов — главный научный сотрудник, заведующий лабораторией развития нервной деятельности животных в онтогенезе. ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН, Санкт-Петербург. E-mail: ksv@iephb.ru.

Наталья Николаевна Кузнецова — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории развития нервной деятельности животных в онтогенезе, ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН, Санкт-Петербург; старший научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С. В. Аничкова, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. E-mail: nat.kuz@mail.ru.

Полина Андреевна Гайдукова — старший лаборант-исследователь лаборатории развития нервной деятельности животных в онтогенезе. ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН, Санкт-Петербург. E-mail: polina.gaydukova.95@mail.ru.

♦ Information about the authors

Sergey V. Kuznetsov — Dr. Biol. Sci. (Physiology), Chief Researcher, Head of Laboratory of Ontogenetic Development of Animals Nervous Activity. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia. E-mail: ksv@iephb.ru.

Nataliya N. Kuznetsova — Dr. Biol. Sci. (Physiology), Laboratory of Ontogenetic Development of Animals Nervous Activity, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia; Senior Researcher, S.V. Anichkov Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. E-mail: nat.kuz@mail.ru.

Polina A. Gaydukova — Bachelor, Senior Research Assistant, Laboratory of Ontogenetic Development of Animals Nervous Activity. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia. E-mail: polina.gaydukova.95@mail.ru.