

УДК: 612.12:612.17+616-092.4/9

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СЕРДЦА В УСЛОВИЯХ *IN VIVO*

Арутюнян К.Р.¹, Абрамян Э.Т.¹, Адамян С.Г.¹, Худавердян Д.Н.¹, Мкртчян С.², Тер-Маркосян А.С.¹¹ ЕГМУ, кафедра физиологии² Каролинский институт, кафедра физиологии и фармакологии, Стокгольм, Швеция

Получена: 18.03.2022, рецензирована: 08.04.2022, принята: 19.04.2022.

Ключевые слова: липополисахарид бактериального происхождения, сердце, электрокардиографические показатели, сократительная активность.

Про-воспалительные медиаторы – алармины иммунитета (alarmins of immunity) – PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) и DAMPs (damage-associated molecular patterns) вызывают морфо-гистологические изменения в клетках миокарда [11]. Эндогенные медиаторы воспаления DAMPs- цитокины, интерлейкины, интерферон, high-mobility group protein B1 (HMGB1), белки группы S100, выделяются при механических повреждениях, отсутствии перфузии, гипоксии, ишемии, инфаркте миокарда и пр. Указанные факторы провоцируют воспаление сердечной ткани, в результате которой развиваются миокардит и хроническая сердечная недостаточность [6, 15]. Компонент внешней мембраны грамотрицательных бактерий – липополисахарид LPS (PAMP) считается основной причиной возникновения сердечных дисфункций при сепсисе [5]. LPS связывается с “toll-like receptors 4” (TLR 4) с помощью CD14-связывающего белка и приводит к продукции воспалительных цитокинов [14, 26].

На изолированном сердце мышей и на культуре кардиомиоцитов выявлена общность связывания экзогенных и эндогенных аларминов иммунитета с идентичными рецепторами – PRRs (pattern recognition receptors), и TLR [18]. При этом, наблюдаются дисфункции проводящей системы и деструкция сердечной ткани, о чем свидетельствует повышение концентрации тропонина в крови [3, 15, 22]. Высокая концентрация HMGB1 во время сепсиса оказывает отрицательное инотропное воздействие на сердце [4, 12]. Исследова-

ниями Торибио Р. и др. [21] выявлено значительное повышение частоты сердца, дыхания и температуры тела животных (лошади) при экспериментальном LPS-индуцированном сепсисе. В то же время уровень кальция в крови у этих животных заметно уменьшался, а концентрация паратиреоидного гормона - увеличивалась. Эффект усиления продукции HMGA 1 (PAMPs) экзогенным введением LPS наблюдали Цай З. и др. [8]. Патологии сердечно-сосудистой системы, развивающиеся под действием экзогенных/эндогенных аларминов (S100, LPS), могут быть следствием дисбаланса кальция в организме и непосредственно в самом миокарде [23, 24]. В наших предыдущих работах [1, 2], обобщающих данные литературы, мы пришли к заключению о противодействии кальцийрегулирующей гормональной системы влиянию экзо- и эндогенных провоспалительных факторов, с вытекающей отсюда возможностью коррекции кальциевого гомеостаза, а следовательно, патологий сердца указанной гормональной системой.

Целью настоящей работы явилось изучение *in vivo* эффектов LPS на электрокардиографические параметры сердца (сердечный ритм, скорость передачи импульса по атриовентрикулярному узлу, амплитуду и длительность желудочкового комплекса), а также на механическую систолу сердца. Настоящее исследование послужит экспериментальным подтверждением нашей гипотезы [2] о включении воспалительного компонента с возможным нарушением кальциевого гомеостаза в развитие патологий сердца.

Материал и методы исследования

Объектом исследования послужило сердце лягушки (*Rana temporaria*). Выбор объекта оправдан способностью сердца холоднокровных животных экономно расходовать энергию и длительно сохранять функциональную активность вне организма [7, 19].

За 24 часа до проведения эксперимента, экспериментальным животным (10 особей мужского пола) внутрибрюшинно вводили LPS фирмы Sigma в дозе 10

* АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ

К.Р. Арутюнян

ЕГМУ, кафедра физиологии

Адрес: РА, Ереван, 0025, Корюна 2

Эл. почта: knarikharutunyan@yahoo.com

Тел.: (+374) 93 79 02 82

Таблица 1

Электрокардиографические параметры сердца после введения LPS 10 мкг/100 г массы лягушки

	QRS (амплитуда в мВ)	QRS (длительность в мс)	HR (частота сокращений сердца в уд/мин)	PR (длительность в мс)	QT (длительность в мс)
Контроль	0,23±0,04	78,45±2,33	53,01±2,18	224,0±17,84	411,63±37,72
LPS	0,21±0,06	73,40±4,27	69,40±4,20 p<0,01	178,5±16,2	282,25±5,66 p<0,01

мкг/100 г массы животного в 1 мл физиологического раствора по методике Матур и сотр. [18]. Контрольные животные (10 особей мужского пола) получали физиологический раствор в том же объеме. Эксперименты проводили в двух сериях:

- в первой серии в течение 5 минут определяли электрокардиографические показатели ((HR, амплитуду (мВ) и длительность QRS (мс) комплекса, длительность PR и QT интервалов (мс)) с помощью портативного электрокардиографа (Beijing Rongrui-Century Science & Technology Co., Ltd., China), предназначенного для мелких лабораторных животных (модифицированный ООО BioArt, Армения). Анализ и интерпретацию ЭКГ проводили согласно инструкции, предложенной Мартином М. [16]:

P зубец – деполяризация предсердий;

PR интервал – передача возбуждения через атриоventрикулярный узел к желудочкам;

HR – частота сердечной активности, рассчитывается по длительности R-R интервала;

QT интервал – электрическая систола желудочков, выражает возбуждение (деполяризацию и реполяризацию) желудочков;

длительность QRS компонента – развитие деполяризующей волны в желудочках;

амплитуда QRS компонента – амплитуда деполяризующей волны в желудочках.

Поскольку ЭКГ не дает представление о механической систоле сердца, то во второй серии нами исследована динамика изменений амплитуды сокращений изолированного сердца с помощью фоторегистратора (ООО BioArt, Армения). С этой целью после 5-минутной регистрации электрических параметров, сердце лягушки, получившей LPS внутрибрюшинно, извлекалось из организма и сразу помещалось в кювету фоторегистратора, содержащего раствор Рингера для холоднокровных животных (NaCl – 0,65%, KCl – 0,018%, CaCl – 0,02%, NaH₂PO₄ – 0,03%, pH=7,4). Работа фоторегистрирующего прибора основана на принципе рассеивания светового потока от сокращающегося сердца, приводящего к соответствующему изменению

показаний фотоприемника. В качестве источника излучения использовался полупроводниковый лазер (MOD HLDPM10-650-3, Huey Jann Electronics, China), а для оценки интенсивности света – кремниевый фотодиод ФД-256.

После аналого-цифрового преобразования с помощью АЦП, сигналы электрокардиографа и фотоприемника визуализировались на экране дисплея и запоминались в ЭВМ согласно разработанному пакету программ в среде Lab View.

Статистический анализ полученных данных проводили между двумя группами (контрольная и экспериментальная) по программе “Origine-8,5”.

Все действия и вмешательства на животных проводили согласно международным требованиям («The PHS Guide for the Care and Use of Laboratory Animals»).

Результаты и обсуждение

Изменения электрокардиографических показателей сердца под действием внутрибрюшинного введения LPS (*in vivo*) приведены в таблице 1. Динамика сдвигов амплитуды сердечных сокращений представлена графически на рис. 1.

Полученные данные свидетельствуют о следующем:

P зубец – не всегда проявлялся. Подобный факт описан и другими исследователями [16] при проведении ЭКГ у мелких животных;

PR интервал – наблюдался недостоверный отрицательный сдвиг;

HR – под действием LPS частота сердца достоверно повышалась и достигала до 69,40±4,20 уд/мин по сравнению с контролем (53,01±2,18 уд/мин);

Длительность QT интервала – у экспериментальных особей была достоверно ниже и составляла 282,25±5,66 мс по сравнению с контролем (411,6±37,72 мс);

Длительность QRS компонента – по сравнению с показателем контрольных животных его укорочение под действием LPS у экспериментальных животных было недостоверным;

Амплитуда QRS компонента - не менялась;

Механическая систола сердца – амплитуда сокращений сердца под влиянием LPS уменьшалась и к концу эксперимента составила 40% от исходной величины, в то время как у контрольных животных в указанном интервале времени показатель составил – 70% (рис. 1). В контроле изолированное сердце сохраняло жизнеспособность в течение 30 минут, а под действием LPS – 20 минут.

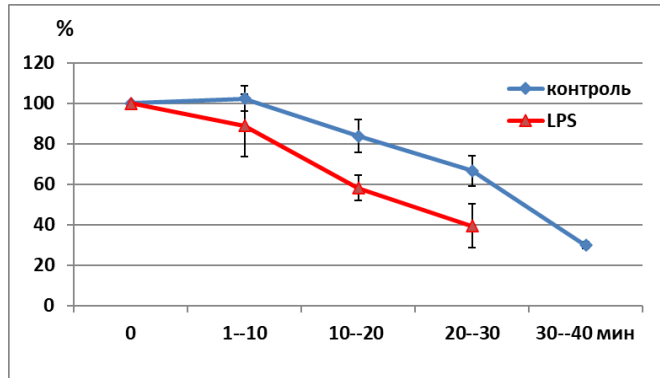


Рис. 1 Динамика изменения амплитуды (в %) сокращений изолированного сердца в контроле и при интраперитонеальном действии LPS (10 мг/100 г массы животного)

Результаты настоящего исследования свидетельствуют об отрицательном инотропном и положительном хронотропном действии LPS в условиях *in vivo*. Увеличение частоты сердечной активности (HR), возможно, связано со скоростью развития желудочкового комплекса, о чем свидетельствует укорочение QT интервала. Хотя полученные результаты не позволяют достоверно оценить изменение PR-интервала, но тенденция его отрицательного сдвига под влиянием LPS может в некоторой мере свидетельствовать об ускорении передачи возбуждения по атриовентрикулярному узлу и по миокарду желудочка (сердце лягушки трехкамерное). Такая гипотеза выдвинута и другими авторами [10], которые связывают возникновение та-

хикардии и аритмии при септической кардиомиопатии с ранним развитием желудочкового комплекса и образованием эктопических очагов в сердце.

Анализируя полученные нами результаты и сопоставляя их с данными литературы [10, 17, 20], предполагается, что причиной развития тахикардии под действием LPS, скорее всего, является учащение пейсмекерной активности сердца, а патологически быстрое распространение волны возбуждения по миокарду (QT) способствует возникновению аритмии. Хорошо известно, что кардиомиопатия, в развитии которой немаловажную роль играют PAMPs и DAMPs, является одним из проявлений полиорганной дисфункции при сепсисе [20]. Несмотря на учащение пульса, заболевание часто сопровождается дилатацией желудочков, снижением их сократительной функции и фракции выброса [25]. В тяжелых случаях кардиомиопатия приводит к смерти. На культуре изолированных кардиомиоцитов крыс установлена выраженная недостаточность сократительной способности сердца [13]. По мнению авторов, эффект LPS связан с ингибированием практически всей оси Ca-ой индукции сократительной функции сердца (сAMP, сGMP, SERKA, RyRs). В то же время другие исследователи полагают, что действие LPS зависит от дозы: низкие дозы стимулируют, а высокие – подавляют сократимость изолированных кардиомиоцитов [9]. Механизм действия LPS на функциональную активность миокарда предполагает вовлечение ионов кальция, натрия, калия, а также различных вторичных мессенджеров (сAMP, сGMP и пр.). Исследование этих механизмов представляет особый интерес для понимания путей развития патологических проявлений в сердце, с целью их дальнейшей коррекции.

Работа проведена при поддержке Государственного тематического финансирования Республики Армения (код № 21Т-3А112).

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян К.Р., Абрамян Э.Т., Адамян С.Г., Минасян А.В., Худавердян Д.Н., Тер-Маркосян А.С. Кардиопротекторная роль кальций-регулирующей гормональной системы. Успехи физиологических наук, 2019, т. 50, 3: 3-13
2. Adamyan S.H., Harutyunyan K.R., Abrahamyan H.T., Khudaverdyan D.N., Mkrtchian S., Ter-Markosyan A.S. Can the calcium regulating hormones counteract the detrimental impact of pro-inflammatory damage-associated molecular patterns in the development of heart failure? Journal of investigative medicine, 2021, 0: 1-5. doi:10.1136/jim-2020-001754
3. Al Abbasi B., Torres P., Ramos-Tuarez F., Dewaswala N., Abdallah A., Chen K., Abdul Qader M., Job R., Aboulenain S., Dziadkowiec K., Bhopalwala H., Pino J.E., Chait R.D. Cardiac Troponin-I and COVID-19: A prognostic tool for in-hospital mortality. Cardiol. Res., 2020, v. 11,6: 398-404. doi:10.14740/cr1159. PMID: 33224386; PMCID: PMC7666590
4. An J., Du J., Wei N., Guan T., Camara A.K., Shi Y. Differential sensitivity to LPS-induced myocardial dysfunction in the isolated brown Norway and Dahl S rat hearts: roles of mitochondrial function, NF- κ B activation, and TNF- α production. J. Shock, 2012, v. 37, 3: 325-332. doi:10.1097/SHK.0b013e31823f146f
5. Bai T., Hu X., Zheng Y., Wang S., Kong J., Cai L. Resveratrol protects against lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction by enhancing SERCA2a

activity through promoting the phospholamban oligomerization. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2016, v. 311, 4: H1051-H1062. doi:10.1152/ajpheart.00296.2016

6. Byszczyk P. Myocarditis in humans and in experimental animal models. *Frontiers in Cardiovasc. Med.*, 2019; v. 6: Article 64. doi: 10.3389/fcvm.2019.00064
7. Burggren W.W., Warburton S. Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. *ILAR Journal*, 2007, v. 48, 3: 260-269. doi.org/10.1093/ilar.48.3.260
8. Cai Z.L., Shen B., Yuan Y., Liu C., Xie Q.W., Hu T.T., Yao Q., Wu Q.Q., Tang Q.Z. The effect of HMGA1 in LPS-induced myocardial inflammation. *Int. J. Biol. Sci.*, 2020, v. 16, 11: 1798-1810. doi:10.7150/ijbs.39947. https://www.ijbs.com/v16p1798.htm
9. Chao W., Shen Y., Zhu X., Zhao H., Novikov M., Schmidt U., Rosenzweig A. Lipopolysaccharide improves cardiomyocyte survival and function after serum deprivation. *J. Biol. Chem.*, 2005, v. 280, 23: 21997-22005. doi:10.1074/jbc.M413676200. PMID: 15793310
10. De Prospero D.J., Adin D.B. Visual representations of canine cardiac arrhythmias with Lorenz (Poincaré) plots. *American Journal of Veterinary Research*, 2020, v. 81, 9: 720-731 doi:https://doi.org/10.2460/ajvr.81.9.720
11. Gnauck A., Lentle R.G., Kruger M.C. Chasing a ghost? Issues with the determination of circulating levels of endotoxin in human blood. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 2016, 53: 197-215
12. Hagiwara S., Iwasaka H., Uchino T., Noguchi T. High Mobility Group Box 1 induces a negative inotropic effect on the left ventricle in an isolated rat heart model of septic shock. *Circ. J.*, 2008, 72: 1012-1017
13. Hobai I.A., Morse J.C., Siwik D.A., Colucci W.S. Lipopolysaccharide and cytokines inhibit rat cardiomyocyte contractility in vitro. *J. Surg. Res.*, 2015, v. 193, 2: 888-901. doi:10.1016/j.jss.2014.09.015
14. Kneuferrmann P., Nemoto S., Misra A., Nozaki N., Defreitas G., Goyert S.M., Carabello B.A., Mann D.L., Vallejo J.G. CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *J. Circulation*, 2002, v. 106, 20: 2608-2615. doi:10.1161/01.CIR.0000038110.69369.4C
15. Lin L., Knowlton A. Innate immunity and cardiomyocytes in ischemic heart disease. *Life Sci.*, 2014, v. 100, 1: 1-8. doi:10.1016/j.lfs.2014.01.062. NIH
16. Martin M. ECG interpretation in small animals: Abnormalities in the conduction system. *In Practice*, 2002, v. 24, 4: 114-123. doi:10.1136/inpract.24.4.194
17. Martinez J.D., Babu R.V., Sharma G. Escherichia coli septic shock masquerading as ST-segment elevation myocardial infarction. *Postgrad. Med.*, 2009, 121: 102-105
18. Mathur S., Walley K., Wang Y., Indrambarya T., Boyd J. Extracellular Heat Shock Protein 70 induces cardiomyocyte inflammation and contractile dysfunction via TLR2. *Circulation Journal. Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 2011, 75: 2445-2452 http://www.j-circ.or.jp.
19. Olejnickova V., Novakova M., Provaznik I. Isolated heart models: cardiovascular system studies and technological advances. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 2015; v. 53, 7: 669-678. doi: 10.1007/s11517-015-1270-2
20. Tan S., Long Z., Hou X., Lin Y., Xu J., You X., Wang T., Zhang Y. H2 protects against lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction via blocking TLR4-mediated cytokines expression. *Frontiers in Pharmacol.*, 2019, v. 10: Article 865 doi:10.3389/fphar.2019.00865.
21. Toribio R.E., Kohn C.W., Hardy J., Rosol T.J. Alterations in serum parathyroid hormone and electrolyte concentrations and urinary excretion of electrolytes in horses with induced endotoxemia. *J. Vet. Intern. Med.*, 2005, v. 19, 2: 223-231. doi: 10.1892/0891-6640(2005)19<223:aispha>2.0.co;2
22. Tzeng H.P., Fan J., Vallejo J.G., Dong J.W., Chen X., Houser S.R., Mann D.L. Negative inotropic effects of High Mobility Box Group Protein 1 in isolated contracting cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2008, v. 294, 3: 1-16. doi:10.1152/ajpheart.00910.2007
23. V lkers M., Loughrey C.M., Macquaide N., Remppis A., DeGeorge B.R., Wegner F.V. et al. S100A1 decreases calcium spark frequency and alters their spatial characteristics in permeabilized adult ventricular cardiomyocytes. *Cell Calcium*, 2007, 41: 135-143
24. Wang X.J., Wang M. The S100 protein family and its application in cardiac diseases. *World J. Emerg. Med.*, 2010, v. 1, 3: 165-168. PMID: 25214961
25. Wondergem R., Graves B.M., Li C., Williams D.L. Lipopolysaccharide prolongs action potential duration in HL-1 mouse cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2012, v. 303, 8: C825-833. doi:10.1152/ajpcell.00173.2012. PMID: 22895260; PMCID: PMC3469715.
26. Zhang Y., Huang Z., Li H. Insights into innate immune signaling in controlling cardiac remodeling. *Cardiovasc. Res.*, 2017, v. 113, 13: 1538-1550. doi:10.1093/cvr/cvx130

ԱՄՓՈՓՈՒՄ

ԲԱԿՏԵՐԻԱՅԻՆ ԲՆՈՒՅԹԻ ԼԻՊՊՈԼԻՍԱԿԱՆԱՐԻԴԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՍՐՏԻ ՖՈՒԿՑԻՈՆԱԿԱՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ IN VIVO ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Հարությունյան Զ.Ռ.¹, Աբրահամյան Հ.Տ.¹, Աղայան Ս.Ս.¹, Խուրդավերդյան Դ.Լ.¹, Սկրտչյան Ս.², Տեր-Մարկոսյան Ա.Ս.¹

¹ ԵՊԲՀ, ֆիզիոլոգիայի ամբիոն

² Կարոլինսկա համալսարան, ֆիզիոլոգիայի և ֆարմակոլոգիայի ամբիոն, Ստոկհոլմ, Շվեդիա

Բանալի բառեր՝ սիրտ, բակտերիային բնույթի լիպոպոլիսախարիդ, էլեկտրասրտագրային ցուցանիշներ, կծկողական ակտիվություն:

Բակտերիային ծագման լիպոպոլիսախարիդը (ԲՃԼ, LPS) պատկանում է PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) խմբին: ԲՃԼ-ն գրամբացասական բակտերիաների արտաբերած թաղանթի բաղադրիչ է: Այն, լինելով նախաբորբոքային գործոն, կապվում է «toll-like receptors 4»-ի (TLR4) հետ՝ ակտիվացնելով ցիտոկինների սինթեզը: Միոկարդիոստների դեպքում ցիտոկինները հանգեցնում են առիթմիայի զարգացմանը, էլեկտրամեխանիկական զուգակցման խանգարմանը՝ առաջացնելով սրտամկանի վնասում:

Յետազոտվել է ԲՃԼ-ի (10մկգ/100գ մարմնի զանգվածի չափաբաժնով) ազդեցությունը գորտերի էլեկտրասրտագրի ցուցանիշների վրա ներորովայնային ներարկման պայմաններում: Յետազոտվել են սրտի հաճախությունը (HR), դեպի փորոք նախասիրտ-փորոքային հանգույցով դրոման հաղորդման արագությունը

(PR), փորոքային համալիրի տատանասահմանը (QRS) և տևողությունը (QT): Հայտնաբերվել է սրտի հաճախության մեծացում, ինչպես նաև փորոքային համալիրի տևողության փոքրացում ստուգիչ խմբի ցուցանիշների համեմատ: Կենդանիների սիրտը մեկուսացնելուց հետո գրանցվել է դրա կծկումների ամպլիտուդի (մեխանիկական սիստոլայի) փոփոխությունների դինամիկան: Այդ դեպքում նկատվել է բացասական ինտրոպ ազդեցություն:

Ստացված արդյունքների հիման վրա բացահայտվել է *in vivo* լիպոպոլիսախարիդով հարուցված սրտի գործառնական ակտիվության (պեյսմեկերային ռիթմի մեծացում, կծկման ուժի անկում) խանգարումների և փորոքային համալիրի արագ ձևավորման միջև կապը: Նշված խանգարումները կարող են հանգեցնել սրտային արտամղման նվազման և բրոնխիկական սրտային անբավարարության զարգացմանը, որը բնորոշ է միոկարդիոստերին:

SUMMARY

THE IMPACT OF LIPOPOLYSACCHARIDE OF BACTERIAL ORIGIN ON THE HEART FUNCTIONAL ACTIVITY *IN VIVO*

Harutyunyan K.R.¹, Abrahamyan H.T.¹, Adamyan S.H.¹, Khudaverdyan D.N.¹, Mkrtchian S.², Ter-Markosyan A.S.¹

¹YSMU, Department of Physiology, Yerevan, Armenia

²Karolinska Institute, Department of Physiology and Pharmacology, Stockholm, Sweden

Keywords: heart, lipopolysaccharide of bacterial origin, electro-cardiographical parameters, contractile activity.

Lipopolysaccharide of bacterial origin (LPS) belongs to the group of PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). LPS is a component of the outer membrane of gram-negative bacteria. As a pro-inflammatory factor, LPS binds to “toll-like receptors 4” (TLR4) and thus activates the production of cytokines. Cytokines are known to provoke the development of arrhythmia, disrupt the processes of electromechanical coupling and lead to the damage of myocardium during myocarditis.

We have investigated the effects of the intraperitoneal administration of LPS (10 g/100g of body mass) on the electrocardiographic parameters of frogs' heart, such as the heart rate (HR), the velocity of impulse transmission through the atrioventricular node to the ventricle (PR), amplitude (QRS), and the

duration of the ventricular complex (QT). LPS induced a significant increase of heart rate and shortening of the duration of the ventricular complex, as compared with the control group. In addition, we have investigated the contraction amplitude (mechanical systole) of the isolated frog heart in the *ex vivo* conditions, where LPS was found to cause a negative inotropic effect.

Based on these results, it can be assumed that the overactivation of the immune system as mimicked by the administration of LPS *in vivo* is responsible for the cross-talk between the altered heart functional activity (increase of pacemaker rhythm, decrease of the amplitude of contractions) and a rapid formation of the ventricular complex. These effects might be responsible for the decrease in cardiac output and chronic heart failure characteristic for myocarditis.