На правах рукописи

АХМАДЕЕВА КСЕНИЯ ЭДУАРДОВНА

КАРДИОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА (II)

03.03.01 – Физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»

Научный руководитель: **Каримова Руфия Габдельхаевна**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Богодвид Татьяна Халиловна**
доктор биологических наук, доцент, доцент кафедры медико-биологических дисциплин ФГБОУ ВО «Поволжская ГАФКСиТ»

Петров Алексей Михайлович
доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биофизики синаптических процессов КИББ КазНЦ РАН

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»

Защита состоится «29» декабря 2020 г. в 10^{00} часов на заседании диссертационного совета Д 220.034.02 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» по адресу: 420029, г. Казань, Сибирский тракт, 35.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и на сайте http://казветакадемия.рф.

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г. и размещен на сайтах http://www.vak.ed.gov.ru и http://www.казветакадемия.рф.

Ученый секретарь
диссертационного совета Р.А. Асрутдинова

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Оксид азота (II) опосредует множество физиологических и патофизиологических процессов в сердечно-сосудистой системе (Каримова, 2011, Karimova, 2018). Фармакологические соединения, которые высвобождают оксид азота (II), стали полезными инструментами для оценки ключевой роли оксида азота (II) в физиологии сердечно-сосудистой системы. На сегодняшний день исследования, проводившиеся почти три десятилетия (Loscalzo, 1995, Massion, 2003, Каримова, 2011), показали, что оксид азота (II) является повсеместным модулятором биологических явлений от клетки к эффектору и от физиологии к патофизиологии. Участие оксида азота (II) в биологии сердечно-сосудистой системы внесло значительный вклад в понимание сложных патологических состояний сердца (Kruzliak, 2014).

Дихотомия эффекторной функции оксида азота (II) представляет собой «палку о двух концах» в биологических системах. Баланс между цитостатическим и цитотоксическим действием оксида азота (II) может заключаться в концентрации продуцируемого оксида азота (II) в тканях, активации конкретной изоформы NO-синтазы и сложном взаимодействии с другими свободными радикалами, такими как супероксид (Beckman, 1992, Pechanova, 2009, Kruzliak, 2014).

Было показано, что в миокарде животных присутствуют три изоформы NO-синтазы – эндотелиальная, нейрональная и индуцибельная. Их активация также происходит в ответ и на патологические состояния. Исследования экспериментального инфаркта миокарда (Lecour, 2001, Roth, 2019) показали повышенную экспрессию iNOS, eNOS и продукцию оксида азота (II) в сердце вместе с повышенными концентрациями в плазме нитратов и нитритов, продуктов окисления оксида азота (II) (Каримова, 2007, 2011). Количество образованного оксида азота (II), специфичное для изоформ, может частично объяснять физиологические и патологические эффекты оксида азота (II):

низкие концентрации связаны с цитостазом, а высокие – с цитотоксичностью (Kruzliak, 2014).

Роль доноров оксида азота (II) в лечении сердечной недостаточности остается спорной, а нужно учитывать, что хроническая сердечная недостаточность поражает каждую третью собаку в возрасте старше 8 лет (Цымбал, 2018, Ахмадеева, 2019), и нет доступных превентивных мер для купирования ранних симптомов и увеличения выживаемости.

Сердечная недостаточность – это не конкретное заболевание или диагноз. Это синдром, при котором тяжелая дисфункция приводит к неспособности сердечно-сосудистой системы поддерживать адекватное кровообращение. При патологических состояниях сердца, таких как ДКМП или эндокардиоз митрального клапана у собак, организм использует определенные механизмы, чтобы попытаться нормализовать его функции и компенсировать негативное воздействие заболевания. Эти механизмы позволяют собаке компенсировать легкое, затем умеренное, а затем даже тяжелое заболевание, часто в течение многих лет. В конечном итоге прогрессирующее изменение сердечной мышцы и длительная активация компенсаторных механизмов в попытке нормализовать кровоток приводят к повреждению сердца и других органов и недостаточности сердечной мышцы (Гирфанов, 2019).

Внедрение в классическую терапию (Сергеев, 2019, Галяува, 2020) доноров оксида азота (II) на ранних стадиях хронической сердечной недостаточности может позволить продлить срок действия компенсаторных механизмов и за счет этого увеличить выживаемость собак с данным диагнозом.

Степень разработанности темы. Изучением кардиотропных эффектов оксида азота и его доноров занимались отечественные ученые Зарипова Р.И. и Зефиров Т.Л. 2018 г., Каримова Р.Г. 2011 г., Ситдикова Г.Ф. и Хаертдинов Н.Н. 2017 г., Нигматуллина Р.Р. 2018 г., а также зарубежные авторы Beckman J.S. 1992 г., Bellisarii F.I. 2014 г., Bonafede R. 2018, Carnicer R. 2013 г., Kruzliak P.

2014 г., Loscalzo J. 1995 г., Massion P.B. 2003 г., Nakamura R. 2001 г., Paulus W.J. 2004 г., Strijdom H. 2009 г., Totzeck M. 2017 г. и др.

Несмотря на большое количество трудов в этой области, неизученным остается влияние оксида азота (II) на больное сердце в целом и возможность применения доноров оксида азота для лечения мелких домашних животных с патологиями сердца в частности.

Цель работы – изучить влияние экзогенного донора оксида азота (II) и субстрата для NO-синтазы L-аргинина на деятельность сердца в норме и в модели хронической сердечной недостаточности.

Исходя из цели, были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить влияние L-аргинина на систолические и диастолические параметры желудочков сердца и частоту сердечных сокращений;
2. Изучить динамику морфометрических параметров сердца при нагрузке донором оксида азота (II) и L-аргинином;
3. Определить активность ферментов и концентрацию ионов в сыворотке крови крыс в модели хронической сердечной недостаточности;
4. Изучить активность ферментов и концентрацию ионов в сыворотке крови крыс в модели хронической сердечной недостаточности при нагрузке донором оксида азота (II) и L-аргинином;
5. Определить возбудимость миокарда крыс в модели хронической сердечной недостаточности;
6. Изучить возбудимость миокарда крыс в модели хронической сердечной недостаточности при нагрузке донором оксида азота (II) и L-аргинином.

Научная новизна. Впервые эхокардиологическим методом были изучены систолические и диастолические параметры желудочков сердца собак при нагрузке L-аргинином. Выявлены изменения биохимического состава крови, морфометрических параметров сердца и возбудимости миокарда крыс в мезатоновой модели хронической сердечной недостаточности. Проведена сравнительная оценка влияния L-аргинина и экзогенного донора оксида азота

(II) – хлофузана на деятельность сердца крыс в модели хронической сердечной недостаточности. Установлено восстановление ионного состава крови и проведения возбуждения в миокарде при нагрузке хлофузаном у крыс с ХСН.

Теоретическая и практическая значимость работы. Значимость работы обусловлена тем, что она расширяет представления о кардиотропных эффектах оксида азота (II). Выявленные изменения в деятельности сердца собак при нагрузке L-аргинином служат основой для изучения доноров NO при хронической сердечной недостаточности собак. Установленные эффекты экзогенного донора оксида азота (II) расширяют представления о вкладе NO в регуляцию сердечной деятельности при хронической сердечной недостаточности.

Практическая значимость работы обусловлена возможностью применения доноров оксида азота (II) для животных с диагнозом хроническая сердечная недостаточность в качестве дополнения к классической терапии.

Методология и методы исследования. Основой методологии явилась научная постановка проблемы изучения роли оксида азота (II) в деятельности сердца при хронической сердечной недостаточности. В процессе проведения исследований были использованы физиологические, морфологические, лабораторные и инструментальные методы исследования, которые включали в себя биохимический анализ крови, рентгенографию, электрокардиографию, эхокардиографию.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. L-аргинин (20 мг/кг) вызывает увеличение систолического объема и частоты сердечных сокращений у собак.

2. Экзогенный донор оксида азота (II) хлофузан (2 мг/кг) усиливает проведение возбуждения, восстанавливает сократительную активность миокарда и ионный состав крови крыс в модели хронической сердечной недостаточности. L-аргинин (20 мг/кг) на возбудимость миокарда у крыс в модели хронической сердечной недостаточности не влияет.

Степень достоверности и апробации результатов. Достоверность результатов обусловлена большим объемом экспериментального материала, а так же подтверждается использованием современных методов исследования, сертифицированного оборудования и проведением статистической обработки. Биометрическая обработка цифрового материала проведена на персональном компьютере по общепринятым методикам вариационной статистики с использованием критерия Манна Уитни. Результаты исследования опубликованы в рецензируемых изданиях, апробированы на специализированных научных конференциях.

Основные результаты исследований доложены и получили одобрение на:

- международной научной конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи «Молодежные разработки и инновации в решении приоритетных задач АПК», посвященная 90-летию образования казанской зоотехнической школы, Казань, 2020;
- Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых вузов Минесльхоза России в номинации «Ветеринарные науки», 2020;
- национальной научно-практической конференции с международным участием «Научные аспекты производства, переработки и ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции. Сборник научных трудов», Ярославль, 2019;
- международной научной конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи «Молодежные разработки и инновации в решении приоритетных задач АПК», Казань, 2019.

Публикации результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 4 – в центральных рецензируемых изданиях и журналах, рекомендованных ВАК РФ, и 1 – в издании, включенном в библиографическую и реферативную базу данных Web of Science.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 137 страницах компьютерного текста и включает: введение, обзор литературы, основную

часть, заключение, практические рекомендации, список литературы. Работа иллюстрирована 10 таблицами, 71 рисунком. Список литературы включает 181 источник, в том числе 115 – зарубежных авторов.

2 Основное содержание работы

2.1 Материалы и методы исследования

Исследования были проведены на кафедре физиологии и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» в период с 2016 по 2020 годы в соответствии с планом научных исследований.

Исследования проведены на 5 собаках в возрасте от 2 до 5 лет весом от 20,5 до 24 кг и на 62 белых крысах породы Wistar обоего пола массой тела 200-230 г. В течение 10 дней собакам давали L-аргинин в капсулах из расчета 20 мг/кг 1 раз в день. Ультразвуковое исследование проводили в лечебно-консультативном центре при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана».

Крыс подвергли моделированию ХСН, чего поделили следующие группы: 1. интактная группа; 2. крысы в модели ХСН, получавшие хлофузан 0,1% в дозе 2 мг/кг внутрижелудочно в течение 10 дней; 3. крысы в модели ХСН, получавшие L-аргинин в дозе 20 мг/кг внутрибрюшинно в течение 10 дней.

Для экспериментального моделирования хронической сердечной недостаточности у крыс была использована мезатоновая модель. Экспериментальному животному внутримышечно вводили 0,1 мл 1% раствора мезатона с последующим свободным плаванием до глубокого утомления (25-30 мин каждый день) в течение 21 дня. (Лискова, 2014)

Основой лабораторных исследований послужил биохимический анализ крови крыс. Концентрацию показателей в полученной после центрифугирования сыворотке крови определяли колориметрическим методом на биохимическом анализаторе «Би-Ан» (Россия) с набором реактивов «Ольвекс» (Россия) по сердечному профилю.

Для ЭхоКГ исследования использовался аппарат ультразвуковой Mindray DC 7 с мультичастотными секторными датчиками, предназначенными для ультразвуковой кардиографии.

Рентгенографические снимки делали с помощью переносного рентгеновского аппарата Дина-2 в прямом (вентродорсальная проекция) и правом боковом положении. Оцифровывание полученных снимков проводили с помощью CR Scanner Veterinary-20, после чего загружали в персональный компьютер через специализированное программное обеспечение QuantorVet+. Полученные рентгенографические снимки позволили определить 4 показателя: коэффициент Бьюкеннана, кардиоторокальный индекс, кардиовертебральный индекс и апикостернальный угол.

Для проведения электрокардиографии использовался электрокардиограф одноканальный MEDINOVA ECG-9801. Электрокардиограмма печаталась на термобумаге шириной 50 мм в автоматическом режиме в 1 отведении при калибровочном сигнале в 20 мВ и скорости ленты 25мм/с.

Достоверность результатов подтверждалась статистически при помощи U-критерия Манна-Уитни. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

2.2 Результаты исследования

2.2.1 Влияние экзогенного донора оксида азота (II) и L-аргинина систолические и диастолические параметры желудочков сердца и частоту сердечных сокращений

Для оценки изменений в сердце у здоровых собак были рассчитаны параметры, оцениваемые при ХСН у собак на ЭхоКГ. Полученные данные собак, участвовавших в эксперименте, занесены в таблицу 1.

У здоровых собак L-аргинин не оказал достоверного воздействия на толщину межжелудочковой перегородки и толщину задней стенки левого желудочка. Изменения внутреннего диаметра левого желудочка в диастолу и систолу между здоровыми собаками и собаками, нагруженными L-аргинином, более значительны. Данные параметры у здоровых собак сдвигаются влево в 1,1 раза ($p \leq 0,05$) и в диастолу, и в систолу.

Таблица 1 – Изменения ультразвуковых показателей сердца под воздействием доноров оксида азота у здоровых собак

Параметр	Интактная группа	L-аргинин
Масса тела, кг	22,25±2,47	
IVSd, мм	9,17±2,89	9,25±2,82
LVIDd, мм	38,43±6.45	35,28±6,12*
LVPWd, мм	11,65±4,51	11,70±5,03
EDV, мл	73,23±8,27	69,18±6,20
IVSs, мм	14,93±5,87	14,58±2,56
LVIDs, мм	24,22±4,61	22,31±3,89*
LVPWs, мм	17,18±2,94	17,73±2,74
ESV, мл	24,99±4,10	11,06±2,44*
SV, мл	58,22±13,72	60,72±6,98
EF, %	81,38±14,14	86,4±7,61*
FS, %	55,25±6,16	56,13±8,12
ЧСС, уд. мин.	114±10,21	94,50±8,44*

** - p≤0,05 – достоверное отличие по сравнению с интактной группой по U-критерию Манна-Уитни*

Изменения конечно-диатолического и конечно-систолического объема спорны, только конечно-систолический объем достоверно снижается при нагрузке L-аргинином в 2,26 раза (p≤0,05). Достоверное увеличение фракции выброса у животных при нагрузке L-аргинином в 1,1 раза (p≤0,05) и увеличение фракции укорочения позволяет судить о положительном влиянии на эти параметры у больных животных. L-аргинин снижает ЧСС у нагруженных собак в 1,2 раза (p≤0,05).

2.2.2 Динамика морфометрических параметров сердца при нагрузке донором оксида азота и L-аргинином

Мезатоновая модель вызывает у крыс стабильные изменения. Окончательный симптомокомплекс включал в себя слабый верхушечный толчок при пальпации, мягкий систолический шум и ритм галопа при аускультации, увеличение скорости наполнения капилляров до 3,5-4 с, снижение температуры тела на полградуса.

Прогрессирование смоделированной патологии у большинства крыс (n=9) показало усиление отдышки, при аускультации легких выслушивалось жесткое дыхание, были признаки отека легких. При осмотре отмечался цианоз кожных покровов и слизистых оболочек. При аутопсии этих больных животных

на разрезе были выявлены утолщенные стенки левого желудочка, наполненные кровью, отмечалось заторможенное развитие сосудов и нервных волокон в сравнении с мышечной тканью. Полости сердца были уменьшены в объеме. Это является признаком развития декомпенсированной стадии левосторонней ХСН.

У меньшей группы крыс (n=4) наблюдалось равномерное увеличение объема живота и прогрессирующее нарастание веса, кожа живота натянута, что является признаком асцита, который был подтвержден пункцией брюшной полости с последующей откачкой жидкости. У этих крыс при вскрытии было выявлено увеличение объема полостей сердца, сопровождающееся истончением сердечной стенки, что позволило диагностировать декомпенсированную стадию правосторонней ХСН.

Таким образом, мезатоновая модель вызывает левостороннюю сердечную ХСН в 71 % случаев и правостороннюю ХСН в 29 %случаев.

Исходя их полученных данных видно, что крысы в модели ХСН теряют вес в 1,18 раза ($p \leq 0,05$) для крыс с левосторонней ХСН и 1,1 раза для правосторонней ХСН (табл. 2). При этом у крыс с левосторонней ХСН вес был ниже в 1,08 раза, чем у крыс с правосторонней сердечной недостаточностью.

Таблица 2 – Патоморфологические параметры сердца крыс в модели ХСН

Измерение	Интактная группа	Крысы с левосторонней ХСН	Крысы с правосторонней ХСН
Масса тела, г	232,13±4,07	189,6±10,53*	199,2±8,24
Масса сердца, мг	952±74,33	1338±97,14*	1057±23,01
ИММ (масса тела, мг/масса тела, г)	4,10±0,56	7,05±0,64*	5,31±0,49*
Объем сердца, $см^3$	1,01±0,035	1,35±0,056	1,69±0,04*

** - $p \leq 0,05$ – достоверное отличие по сравнению с интактной группой по U-критерию Манна-Уитни*

После аутопсии, сердца извлекли из грудной полости и провели измерения их массы и объема. Масса сердца обеих групп превышает массу сердца здоровых животных в 1,93 раза ($p \leq 0,05$) для крыс с левосторонней ХСН и 1,32 раза для крыс с правосторонней ХСН. Для большей наглядности был высчитан ИММ, который у крыс с левосторонней ХСН составил 7,05, что

достоверно в 1,72 раза (p≤0, 05) больше, чем у интактной группы. У крыс с правосторонней ХСН ИММ в 1,3 раза (p≤0,05) больше, чем у интактной группы. Таким образом, утолщение стенки при левосторонней сердечной недостаточности значительно увеличивает вес органа, но не его размер, в сравнении с группой правосторонней сердечной недостаточности, у крыс которой стенка сердца истончается.

Объем сердца так же увеличен у крыс в модели сердечной недостаточности в 1,34 раза для крыс левосторонней ХСН и 1,67 раза (p≤0,05) для крыс с правосторонней ХСН.

На рентген-снимках у крыс в модели ХСН можно отметить увеличение размеров сердца относительно здоровых животных. Контрастность сердца снижена. Силуэт не четкий, выражена сердечная тень. Форма сердца изменяется и принимает форму шара. Ярко выражено усиление рисунка бронхиального дерева. После применения курса хлофузана у крыс в модели ХСН можно отметить снижение контрастности бронхиального дерева. Форма сердца сохранена и аналогична сердцу крыс в модели ХСН до нагрузки хлофузаном, границы его размыты, выражена сердечная тень.

Результаты измерений рентген-индексов, которые могут говорить об увеличении сердца, представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Изменения рентгенологических параметров сердца у крыс в модели ХСН при нагрузке хлофузаном

Параметр	Интактная группа	В модели ХСН	Хлофузан	L-аргинин
Коэф. Бьюккенана	8,53±0,48	11,70±1,14*	11,58±1,29	12,06±0,91
Кардиовертебральный индекс	2,94-4,88±0,35	3,7-6,6±0,54*	3,7-6,92±1,13	4,1-8,0±0,89
Кардиоторокальный индекс, %	26,2±1,62	47±4,22*	48,5±3,71	52±0,41
Апикостернальный угол	28,18±1,55	22,08±1,08*	24,66±1,33	23,02±1,16

** - p≤0,05 – достоверное отличие по сравнению со интактной группой по U-критерию Манна-Уитни*

Сравнивая полученные нами значения, мы можем говорить о показателях, которые будут физиологически нормальными для здоровых животных, и

наблюдать признаки увеличения сердца у больных крыс. Таким образом, коэффициент Бьюккенана, кардиовертебральный (КВИ) и кардиоторакальный (КТИ) индексы у больных животных выше, чем у здоровых животных.

В то же время, апикостернальный угол, наоборот, уменьшается на несколько пунктов за счет незначительного изменения формы и положения сердца в грудной полости при развитии кардиомегалии. Однако после введения хлофузана и L-аргинина не было обнаружено значительных изменений в коэффициентах.

2.2.3.1 Влияние хлофузана на активность ферментов и концентрацию ионов в модели хронической сердечной недостаточности

Результаты исследования после нагрузки хлофузаном были занесены в таблицу 4.

Таблица 4 – Изменения биохимического состава крови крыс в модели ХСН при нагрузке хлофузаном

Параметр	Интактная группа	В модели ХСН	Хлофузан
Мочевина, ммоль/л	5,71±0,23	34,93±1,89[2]	21,19±1,66[3]
Креатинин, мкмоль/л	65,60±0,91	141,3±4,99[1]	97,13±0,44[3]
AST, Е/л	132±4,19	335,98±8,27[1]	263,34±7,63[3]
ALT, Е/л	127±3,79	196,84±3,37[1]	154,28±1,83[3]
Коэф. Де Ритиса	1,04±0,562	1,70±0,09[1]	1,71±0,13
ЛДГ, Е/л	204±3,77	228±14,086	216±12,176
Na, ммоль/л	103,80±9,84	155,17±3,44[1]	120,82±2,97[3]
K, ммоль/л	4,34±0,24	6,71±0,24[1]	4,98±0,18[3]
Cl, ммоль/л	87,81±1,29	141,34±2,61[1]	129,11±5,73[3]

1 - p≤0,01; 2 - p≤0,05 – достоверное отличие по сравнению со интактной группой по U-критерию Манна-Уитни
3 - p≤0,05 – достоверное отличие по сравнению с группой в модели по U-критерию Манна-Уитни

Активность АСТ увеличилась в 2,55 раза (p≤0,01), а активность АЛТ увеличилась только в 1,54 раза (p≤0,01) по сравнению с интактной группой. Введение Хлофузана снижает активность АСТ и АЛТ в 1,27 раза, сохраняя их соотношение неизменным по сравнению с этими же показателями в модели хронической сердечной недостаточности до лечения. Учитывая изменение

коэффициента де Ритиса в 2,09 раза ($p \leq 0,01$) по сравнению с интактной группой, это является признаком патологии сердца.

Уровень ЛДГ в модели хронической сердечной недостаточности был немного увеличен в 1,11 раза по сравнению с интактной группой, что не позволяет нам классифицировать ХСН у группы крыс. Введение Хлофусана не оказывает существенного влияния на ЛДГ, этот показатель изменялся в 1,06 раза.

Увеличение креатинина в 2,15 раза ($p \leq 0,05$) и мочевины в 6,34 раза ($p \leq 0,01$) в модели ХСН является признаком развития почечной недостаточности. При этом последующие снижение концентрации креатинина в 1,65 раза ($p \leq 0,05$) и мочевины в 1,45 раза ($p \leq 0,05$) под воздействием хлофузана указывает на улучшение почечной функции.

Повышенный уровень ионов натрия в 1,5 раза ($p \leq 0,05$), калия в 1,54 раза ($p \leq 0,05$) и хлора в 1,61 раза ($p \leq 0,05$) в модели хронической сердечной недостаточности происходит вследствие активации РААС. Снижение концентрации ионов натрия в 1,26 раза ($p \leq 0,05$), калия в 1,57 раза ($p \leq 0,05$) и хлора в 1,1 раза ($p \leq 0,05$) означает снижение активности РААС.

2.2.3.2 Влияние L-аргинина на активность ферментов и концентрацию ионов в модели хронической сердечной недостаточности

Результаты исследования после нагрузки L-аргинином были занесены в таблицу 5. Активность АСТ увеличилась в 2,81 раза ($p \leq 0,01$), а АЛТ – только в 1,36 раза ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой. Введение L-аргинина снижает концентрацию АСТ в 1,23 раза ($p \leq 0,05$) и АЛТ в 1,06 раза. Повышение коэффициента де Ритиса в 2,63 раза ($p \leq 0,01$) по сравнению с интактной группой подтверждает развитие именно сердечной патологии. Нагрузка L-аргинином снижает коэффициент де Ритиса в 1,16 раза ($p \leq 0,05$), однако данный параметр все еще значительно превосходит физиологически нормальный. Это связано с тем, что при ХСН можно только купировать симптомы, однако полное излечение таких животных невозможно.

Таблица 5 –Изменения биохимического состава крови крыс в модели ХСН при нагрузке L-аргинином

Параметр	Интактная группа	В модели ХСН	L-аргинин
Мочевина, ммоль/л	5,71±0,23	29,76±1.89[1]	21,13±1.66
Креатинин, мкмоль/л	65,60±0,91	174,05±4,99[2]	114,58±0,44[3]
AST, Е/л	132±4,19	371,1±8,27[1]	301,82±7,63[3]
ALT, Е/л	127±3,79	173,6±3,37[2]	164,04±1,83
Коэф. Де Ритиса	1,04±0,562	2,13±0,76[1]	1,83±0,91[3]
ЛДГ, Е/л	204±3,77	304±8,34[2]	252±9,16
Na, ммоль/л	103,80±9,84	131,37±2,85[1]	134±4,66
K, ммоль/л	4,34±0,24	7,03±1,22[2]	4,77±0,78[3]
Cl, ммоль/л	87,81±1,29	133,14±1,46[1]	121,61±4,46

1 - p≤0,01; 2 - p≤0,05 – достоверное отличие по сравнению со интактной группой по U-критерию Манна-Уитни
3 - p≤0,05 – достоверное отличие по сравнению с группой в модели по U-критерию Манна-Уитни

Уровень ЛДГ в модели хронической сердечной недостаточности был немного увеличен в 1,5 раза (p≤0,05). Введение L-аргинина позволяет снизить ЛДГ в 1,2 раза.

Отмечено увеличение концентрации креатинина в 2,65 раза (p≤0,01) и мочевины в 5,21 раза (p≤0,05) в модели ХСН. При этом последующие снижение концентрации креатинина в 1,52 раза (p≤0,05) и мочевины в 1,41 раза (p≤0,05) под воздействием L-аргинина указывает на улучшение почечной функции.

Повышенный уровень натрия в 1,27 раза (p≤0,05), калия в 1,62 раза (p≤0,05) и хлора в 1,52 раза (p≤0,05) в модели хронической сердечной недостаточности происходит вследствие активации РААС. Последующее за нагрузки L-аргинином снижение концентрации калия в 1,47 раза (p≤0,05) и хлора в 1,1 раза может говорить о снижение активности РААС. При содержание натрия за период нагрузки не только не снизилось, но и увеличилось в 1,02 раза.

2.2.4.1 Влияние хлофузана на возбудимость миокарда в модели хронической сердечной недостаточности

В ходе экспериментов мы получили результаты ЭКГ здоровых крыс, крыс в модели ХСН и крыс, в модели ХСН, получавших нагрузку хлофузаном. Все полученные данные были занесены в таблицу 6.

Таблица 6 – Изменения на ЭКГ у крыс в модели ХСН при нагрузке хлофузаном

Параметр	Интактная группа	В модели ХСН	Хлофузан
ЧСС, уд.мин.	387,75±13,07	462,55±8,32[1]	436,88±9,84
P, с	0,031±0,006	0,022±0,005[2]	0,030±0,006[3]
P, мВ	0,132±0,028	0,058±0,004[1]	0,059±0,019
P-R, с	0,058±0,009	0,096±0,018	0,067±0,014
QRS, с	0,043±0,007	0,066±0,018[2]	0,056±0,012[3]
Q, мВ	0	0,083±0,052[1]	0,077±0,058
R, мВ	1,083±0,24	0,481±0,096[1]	0,399±0,058
S, мВ	0,165±0,024	0,247±0,010	0,131±0,027
QT, с	0,078±0,017	0,127±0,037[1]	0,109±0,02
T, мВ	0,082±0,044	0,029±0,011[1]	0,046±0,017[3]

1 - p≤0,01; 2 - p≤0,05 – достоверное отличие по сравнению со интактной группой по U-критерию Манна-Уитни
3 - p≤0,05 – достоверное отличие по сравнению с группой в модели по U-критерию Манна-Уитни

Частота сердечных сокращений увеличилась у крыс в модели ХСН в 1,2 раза (p≤0,01). Как уже было описано выше, увеличение ЧСС является типичным для ХСН компенсаторным механизмом. Воздействие хлофузана снизило ЧСС в 1,06 раза у крыс в модели ХСН, что может считаться положительной динамикой, и возможно более длительный курс будет более действенным.

Нарушения ритма, в целом, являются частым признаком ХСН. Кроме тахиаритмии, которая наблюдалась у большинства крыс в модели ХСН, у 9 % крыс была отмечена мерцательная аритмия, которая была купирована после нагрузки хлофузаном. ЧСС у таких крыс варьировалась от 370 до 500 уд.мин.

Длительность зубца P уменьшилась у крыс в модели ХСН в 1,4 раза (p≤0,05). Хлофузан оказывает положительное действие на длительность сокращения, увеличивая зубец P до прежнего показателя. Амплитуда зубца P как и в случае с длительностью уменьшилась в 2,3 раза (p≤0,01), при этом в отличие от длительности, амплитуда не увеличивается после нагрузки хлофузаном.

ЭКГ крыс в норме имеет свои особенности. Так у крыс в норме отсутствует зубец Q, поэтому вместо длительности интервала P-Q измеряется длительность интервала P-R. У крыс в модели ХСН длительность интервала P-

R увеличилась в 1,66 раза. При нагрузке хлофузаном интервал P-R уменьшился в 1,4 раза вследствие улучшения сокращения предсердий.

Длительность комплекса QRS, который отвечает за сокращение желудочков, увеличилась в 1,5 раза ($p \leq 0,05$) в сравнении с интактной группой. Хлофузан вызывает укорочение комплекса QRS у крыс в модели ХСН в 1,2 раза ($p \leq 0,05$).

Возвращаясь к зубцу Q, опытным путем было подтверждено его отсутствие у интактной группы крыс. Однако зубец Q появился у 55 % крыс в модели ХСН. Наличие зубцов Q и их амплитуда сохраняется у крыс в модели ХСН даже после нагрузки хлофузаном, что подтверждает необратимость изменений.

Снижение амплитуды зубца R в 2,25 раза ($p \leq 0,01$) говорит о нарушении проводимости в желудочках и является еще один подтверждением развития гипертрофических изменений в сердцах крыс в модели ХСН. При нагрузке хлофузаном зубец R не только не восстанавливается, но имеет специфичные изменения.

Амплитуда зубца S увеличивается у крыс в модели ХСН в 1,5 раза, однако эти изменения не достоверны, а после нагрузки хлофузаном амплитуда зубца S ставится меньше, чем у интактной группы.

Интервал QT увеличивается в модели ХСН в 1,63 раза ($p \leq 0,01$), что обусловлено изменениями, вызванными ХСН в сердце крыс. При нагрузке хлофузаном длительность интервала QT снижается незначительно, что снова подтверждает необратимость некоторых процессов при ХСН.

При этом у 15 % крыс в модели ХСН наблюдалась косовосходящая депрессия интервала ST, которая чаще наблюдается при активации симпатической нервной системы. Признаком повышения симпатической нервной системы является уменьшение амплитуды зубца T. Зубец T у крыс в модели ХСН меньше в 2,8 раза ($p \leq 0,01$), чем у интактной группы. Подобные изменения вызваны угнетением парасимпатической нервной системы. После курса хлофузана амплитуда зубца T увеличилась в 1,6 раза ($p \leq 0,05$).

2.2.4.2 Влияние L-аргинина на возбудимость миокарда в модели хронической сердечной недостаточности

В ходе экспериментов мы получили результаты ЭКГ здоровых крыс, крыс в модели ХСН и крыс, в модели ХСН, получавших нагрузку L-аргинином. Все полученные данные были занесены в таблицу 7.

Таблица 7 - Изменения на ЭКГ у крыс в модели ХСН при нагрузке L-аргинином

Параметр	Интактная группа	В модели ХСН	L-аргинин
ЧСС, уд.мин.	387,75±13,07	303,45±25,15[1]	402,44±17,16[4]
P, с	0,031±0,006	0,033±0,019	0,029±0,015
P, мВ	0,132±0,028	0,12±0,087	0,034±0,007[3]
P-R, с	0,058±0,009	0,068±0,007[2]	0,061±0,011[4]
QRS, с	0,043±0,007	0,059±0,009[2]	0,05±0,009
Q, мВ	0	0,106±0,039[1]	0,027±0,007
R, мВ	1,083±0,24	0,721±0,05[2]	0,232±0,02[4]
S, мВ	0,165±0,024	0,332±0,057	0,044±0,026[3]
QT, с	0,078±0,017	0,125±0,031[1]	0,096±0,011[4]
T, мВ	0,082±0,044	0,028±0,007	0,035±0,006

1 - p≤0,01; 2 - p≤0,05 – достоверное отличие по сравнению со интактной группой по U-критерию Манна-Уитни
3 - p≤0,01; 4 - p≤0,05 – достоверное отличие по сравнению с группой в модели по U-критерию Манна-Уитни

У данный группы крыс в модели ХСН мы можем наблюдать значительное снижение ЧСС в 1,3 раза (p≤0,01). Наличие выраженной брадиаритмии у 18 % крыс говорит о значительном повышении постнагрузки и позволяет предположить развитие застойных процессов.

При нагрузке L-аргинином ЧСС у крыс в модели ХСН увеличивается в 1,3 раза (p≤0,05), однако у животных с выраженной бардикардией изменения ритма сохраняются с небольшим изменением вверх. Минимальная ЧСС у крыс с брадиаритмией составила 167 уд.мин., при нагрузке L-аргинином этот параметр увеличился до 250 уд.мин. Так же в 18 % случаев у крыс наблюдалась мерцательная аритмия. После нагрузки L-аргинином ровный ритм был восстановлен только у половины крыс. ЧСС у крыс с мерцательной аритмией варьировалась от 375 до 571 уд.мин.

Зубец P незначительно увеличен у крыс в модели ХСН, возможно это связано с тем, что в данной группе крыс в модели ХСН почти не затронула сократительную способность предсердий. Амплитуда зубца P незначительно снизилась у крыс в модели ХСН. Стоит отметить, что L-аргинин никак не затормозил дальнейшее прогрессирование изменений в предсердиях, спровоцированные моделью ХСН. Амплитуда зубца P после нагрузки L-аргинином снизилась в 3,5 раза ($p \leq 0,01$).

Длительность интервала P-R увеличилась в 1,2 раза ($p \leq 0,05$) у крыс в модели ХСН. При нагрузке L-аргинином интервал P-R уменьшился в 1,12 раза ($p \leq 0,05$) вследствие улучшения сокращения предсердий, однако он все еще выше контрольного параметра за счет гипертрофических изменений.

Длительность комплекса QRS, который отвечает за сокращение желудочков, увеличилась в 1,37 раза ($p \leq 0,05$) в сравнении с интактной группой. L-аргинин вызывает укорочение комплекса QRS у крыс в модели ХСН в 1,2 раза.

Зубец Q появился у 73 % крыс в модели ХСН. Наличие зубцов Q и их амплитуда сохраняется у крыс в модели ХСН даже после нагрузки L-аргинином, что подтверждает необратимость изменений.

Снижение амплитуды зубца R в 1,5 раза ($p \leq 0,05$) говорит о нарушении проводимости в желудочках. При нагрузке L-аргинином зубец R не только не восстанавливается, но имеет специфичные изменения.

Амплитуда зубца S увеличивается у крыс в модели ХСН в 2 раза, однако эти изменения не достоверны, а после нагрузки L-аргинином снижается в 7,5 раз ($p \leq 0,01$), при этом опускаясь ниже контрольного параметра.

Интервал QT увеличивается в модели ХСН в 1,6 раза ($p \leq 0,01$), что обусловлено изменениями, вызванными ХСН в сердце крыс. При нагрузке L-аргинином длительность интервала QT снижается в 1,3 раза ($p \leq 0,05$).

У больных крыс так же наблюдалась косовосходящая депрессия интервала ST в 45 % случаев, что является прямым признаком развития ХСН за счет активации симпатической нервной системы. Признаком повышения

симпатической нервной системы является уменьшение амплитуды зубца Т. Зубец Т у крыс в модели ХСН меньше в 2,9 раза ($p \leq 0,01$), чем у интактной группы. После курса L-аргинина амплитуда зубца Т увеличилась в 1,25 раза ($p \leq 0,05$).

3 Заключение

Экзогенный донор оксида азота (II) оказывает тормозящее действие на патологический процесс сердечной недостаточности, а так же улучшает сердечную функцию и способствует активации компенсаторных механизмов. Субстрат NO-синтазы показал себя менее эффективным при купировании негативных процессов хронической сердечной недостаточности. В ходе работы, были сделаны следующие выводы:

1. Введение L-аргинина (20 мг/кг) собакам вызывает снижение конечно-систолического объема в 2,26 раза ($p \leq 0,05$) и ЧСС в 1,2 раза ($p \leq 0,05$), уменьшение диаметра левого желудочка в диастолу и систолу в 1,1 раза ($p \leq 0,05$) и увеличение фракции выброса в 1,1 раза ($p \leq 0,05$).

2. С помощью рентгенографии установлено, что после введения экзогенного донора оксида азота (II) – хлофузана (2 мг/кг) – у крыс с моделированной хронической сердечной недостаточностью отмечается снижение контрастности бронхиального дерева и легочного рисунка за счет активации компенсаторных механизмов, направленных на восстановление сократительной способности миокарда и уменьшения застоя в аорте и легочной артерии. Нагрузка L-аргинином (20 мг/кг) вызывала аналогичные изменения в рентгенологической картине.

3. Мезатоновая модель хронической сердечной недостаточности характеризуется изменением активности ферментов и концентрации ионов сыворотки крови. У крыс в сыворотке крови увеличилась активность АСТ в 2,55 раза ($p \leq 0,01$), активность АЛТ 1,54 раза ($p \leq 0,01$) и, соответственно, увеличился коэффициент де Ритиса в 2,09 раза ($p \leq 0,05$). Концентрация креатинина увеличилась в 2,15 раза ($p \leq 0,05$), мочевины – в 6,34 раза ($p \leq 0,01$), а

также ионов натрия – в 1,5 раза ($p \leq 0,05$), калия – в 1,54 раза ($p \leq 0,05$) и хлора – в 1,61 раза ($p \leq 0,05$).

4. Активность аминотрансфераз сыворотки крови у крыс в модели хронической сердечной недостаточности достоверно снижаются при нагрузке хлофузаном (2 мг/кг) в 1,27 раза ($p \leq 0,05$).

5. Ионный состав сыворотки крови у крыс в модели хронической сердечной недостаточности достоверно изменяется при нагрузке хлофузаном (2 мг/кг): концентрация натрия снижается в 1,26 раза ($p \leq 0,05$), калия – в 1,57 раза ($p \leq 0,05$) и хлора – в 1,1 раза ($p \leq 0,05$). Эти изменения позволяют судить о положительном влиянии донора оксида азота (II) на функцию сердца и о торможении активности ренин-ангиотензин-альдостероновой системы.

6. Экзогенный донор оксида азота (II) – хлофузан (2 мг/кг) – оказывает более выраженное влияние на активность трансфераз и ионный состав крови крыс в модели ХСН, чем L-аргинин.

7. Методом электрокардиографии установлено увеличение ЧСС в 1,2 раза ($p \leq 0,01$), сужение зубца P в 1,4 раза ($p \leq 0,0$), снижение амплитуды зубца P в 2,3 раза ($p \leq 0,01$), зубца R в 2,25 раза ($p \leq 0,01$) и зубца T в 2,8 раза ($p \leq 0,01$), удлинение комплекса QRS в 1,5 раза ($p \leq 0,01$) и QT в 1,63 раза ($p \leq 0,01$) у крыс в модели хронической сердечной недостаточности. Выявлено наличие зубца Q у 36 % крыс в модели хронической сердечной недостаточности.

8. Нагрузка экзогенным донором оксида азота (II) – хлофузаном (2 мг/кг) – улучшает проведение возбуждения в предсердиях (длительность зубца P увеличилась в 1,4 раза ($p \leq 0,05$)) и желудочках (длительность комплекса QRS увеличилась в 1,5 раза ($p \leq 0,05$)),а также увеличивается амплитуда зубца T в 1,6 раза ($p \leq 0,05$).

9. Введение L-аргинина не оказывает влияние на проведение возбуждения в миокарде крыс в модели хронической сердечной недостаточности.

Практические предложения

Экзогенные доноры оксида азота (II) могут быть рекомендованы для внедрения в ветеринарную практику ветеринарных врачей-кардиологов, ветеринарных врачей общей практики для дополнения классической терапии хронической сердечной недостаточности у собак, вызванной дилатационной кардиомиопатией и эндокардиозом митрального клапана. Препарат может быть использован, как на начальных стадиях хронической сердечной недостаточности в качестве превентивных мер, так и в качестве полноценной терапии при явных симптомах патологии. Так же Хлофузан является эффективным средством в случае декомпенсации процессов при хронической сердечной недостаточности и способствует активизации компенсаторных механизмов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Karimova, R.G. Excitability of the myocardium of white rats on the models of arrhythmia when introducing compounds of bromonicotinic acid / R.G. Karimova, S.A. Grigorieva, K.E. Akhmadeeva // J. Pharm. Sci. & Res. – 2018. – Vol. 10(12). – P. 3471-3473. **
2. Гирфанов, А.И. Динамика морфологических изменений сердца при патологии миокарда у кошачьих породы мейн кун / А.И. Гирфанов, К.Э. Ахмадеева // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. – 2019. – Т. 238 (II). – С. 57-61. *
3. Ахмадеева, К.Э. Биохимический состав крови у крыс в мезатоновой модели сердечной недостаточности / К.Э. Ахмадеева, Р.Г. Каримова // Молодежные разработки и инновации в решении приоритетных задач АПК. Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи. – Казань: Казанская ГАВМ, 2019. – С. 5-6.
4. Ахмадеева, К.Э. Биохимический состав крови у собак с хронической сердечной недостаточностью в декоменсированной стадии / К.Э. Ахмадеева, Р.Г. Каримова // Научные прикладные аспекты производства, переработки и

ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции. Сборник научных трудов. – Ярославль: Ярославская ГСХА, 2019. – 3-7 с.

5. Гирфанов, А.И. Эхокардиографические изменения при патологии сердца у кошек британской породы / А.И. Гирфанов, К.Э. Ахмадеева // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. – 2019. – Т. 239 (III). – С. 81-85. *
6. Гирфанов, А.И. Эхокардиографические изменения при легочной гипертензии различной степени тяжести у собак с хронической сердечной недостаточностью / А.И. Гирфанов, К.Э. Ахмадеева, Р.Г. Каримова // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. – 2019. – Т. 239 (III). – С. 85-89. *
7. Ахмадеева, К.Э. Инструментальные методы диагностики хронической сердечной недостаточности у лабораторных крыс / К.Э. Ахмадеева, Л.Р. Хамзина, Е.Ф. Камкина // В сборнике: Молодежные разработки и инновации в решении приоритетных задач АПК. Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи. – 2020. – С. 329-331.
8. Ахмадеева, К.Э. Биохимический состав крови у собак с хронической сердечной недостаточностью в декоменсированной стадии / К.Э. Ахмадеева, Р.Г. Каримова // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. – 2020. – Т. 244 (IV). – С. 27-30. *

* – издания, рекомендованные ВАК

** – издания, индексируемые в Web of Science