

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ДЕФИБРИЛЛИРУЮЩИХ ИМПУЛЬСОВ РАЗНОЙ ФОРМЫ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

В.В.Мороз, М.С.Богушевич, А.М.Черныш*, Е.К.Козлова*, А.С.Шаракшанэ*

*Институт общей реаниматологии РАМН, Москва; *ММА им. И.М.Сеченова*

Исследовали действие высоковольтного импульсного электрического поля на мембранные эритроцитов. Рассмотрено действие одиночного импульса, двух однополярных и двух разнополярных импульсов экспоненциальной и биполярной синусоидальной формы. Установлено, что все импульсы вызывают электропорацию мембран; порог электропорации не зависит от формы подаваемых импульсов. При подаче двух импульсов наблюдается неаддитивность скоростей убывания числа эритроцитов в результате электропорации; два разнополярных импульса вызывали больший эффект по сравнению с двумя однополярными. Как и в случае дефибрилляции целостного сердца, действие разнополярных импульсов было эффективнее, и эффект также носил статистический характер.

Ключевые слова: *электропорация мембран, разнополярные импульсы, дефибрилляция*

Одной из основных проблем современной клинической и экспериментальной медицины остается внезапная смерть в результате фибрилляции желудочков сердца. Важной задачей является исследование механизмов действия импульсного электрического поля на мембранные клеток и выбор эффективных параметров электрических импульсов для дефибрилляции сердца. В мире используют в основном два типа дефибриллирующих импульсов: экспоненциальный (Edmark) и биполярный синусоидальный (Gurvich). В экспериментах на животных [1,4,5] и в клинической практике показано, что вторая форма импульса несколько эффективнее при одинаковой энергии электрического разряда [7, 14], однако обоснований и объяснений механизмов таких результатов нет.

Высоковольтный импульс дефибриллятора создает в структурах сердца напряженность поля, вызывающую электропорацию мембран и, как следствие, эффект дефибрилляции сердца. Какова при этом должна быть форма и амплитуда наведенного импульса, каков механизм действия на мембранные однополярного и биполярного им-

пульсов и в чем разница их воздействия на клетку остается неясным.

Целью настоящей работы явилось сравнительное экспериментальное исследование действия одиночного, двух однополярных и двух разнополярных импульсов электрического поля на биологические мембранные клеток.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве исследуемой системы использовали суспензию эритроцитов человека в физиологическом растворе: 0.05 мл крови в 1 мл физиологического раствора, что соответствовало концентрации 230 млн эритроцитов/мл. При этом оптическая плотность суспензии толщиной 5 мм равнялась 1.

Плотность эритроцитов в суспензии определяли методом фотоколориметрии: измеряли оптическую плотность раствора и затем вычисляли их концентрацию. Измерение оптической плотности суспензии проводили при $\lambda=750$ нм. На данной длине волн ослабление интенсивности исходного пучка света определяли рассеянием света на эритроцитах. При малых концентрациях эритроцитов оптическая плотность суспензии D прямо пропорциональна их концентра-

Адрес для корреспонденции: amchernysh@mail.ru. Черныш А.М.

ции n : $D=kn$. Поэтому, измеряя оптическую плотность суспензии в момент времени $D(t)$, можно получить информацию о концентрации эритроцитов $n(t)$. При внешнем воздействии эритроциты гемолизируются, что приводит к уменьшению оптической плотности суспензии. График зависимости $D(t)$ будем называть кинетической кривой.

В качестве источника импульсного электрического поля использовали клинические дефибрилляторы "LifePak-7" и "ДИ-03". Электрический импульс подводился к силовым электродам, сделанным из титана, которые опускались в кварцевую кювету. В нее наливали суспензию эритроцитов в физиологическом растворе. Электроды полностью покрывали боковые стороны кюветы, что обеспечивало однородность создаваемого электрического поля в растворе.

В всех сериях опытов определяли величину напряженности внешнего поля с помощью измерительных иглок; их также использовали и для оценки однородности поля в объеме суспензии. Для этого подавали контрольное переменное поле на силовые электроды и измеряли разность потенциалов между иглами, устанавливая их в разных секторах кюветы.

Электрическое напряжение, а следовательно, и напряженность поля в растворе определяются энергией импульса, задаваемой дефибриллятором, и сопротивлением раствора, зависящим от параметров раствора в кювете. В кювету наливалось 3 мм суспензии. Расстояние между электродами было 17 мм, ширина кюветы — 30 мм, высота суспензии — 4 мм. Измеренное сопротивление раствора при этом составило 100 Ом. Для энергии импульса 230 Дж амплитуда напряжения импульса составила 2900 В, что соответствовало напряженности поля в растворе (1700 В/см).

Эритроциты подвергали воздействию одиночного однополярного импульса, двух однополярных или двух разнополярных импульсов. В ряде опытов подавали два биполярных импульса с соотношением амплитуд 1:0.4 или в одной фазе, или в противофазе.

Длительность импульса составляла 10 мс, время между двойными импульсами — 1 с. Амплитуды импульсов во всех сериях опытов оставались постоянными и равными 2900 В.

Всего было проведено 87 опытов по воздействию серий импульсов на эритроциты в суспензии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гемолиз суспензии эритроцитов, подвергавшихся электропорации импульсным электрическим

полем, ускорялся по сравнению с гемолизом контрольной суспензии. Величина энергии импульса в значительной степени влияла на параметры кинетических кривых (рис. 1, а). При энергии импульса до 100 Дж ход кинетических кривых практически не изменялся по сравнению с контрольной кривой. Незначительные отличия от контрольных кинетических кривых наблюдались при энергии более 130 Дж. Существенные отличия проявлялись при энергиях более 200 Дж. Таким образом, данные эксперименты согласуются с общепринятым представлением о том, что электропорация — это пороговый эффект.

С увеличением энергии электрического импульса доля эритроцитов, подвергавшихся гемолизу в течение 1-го часа, возрастила, а время $T_{0.5}$ (в течение которого концентрация эритроцитов снижалась в 2 раза) уменьшилось.

Для описания результатов экспериментов мы использовали параметр — скорость изменения количества эритроцитов в суспензии в результате воздействия внешних факторов, т.е. количество эритроцитов, гемолизированных в единицу времени: $V=dn/dt$. Скорость уменьшения эритроцитов нелинейно изменяется со временем: $V=I(t)$. Так, в первые 10-30 мин скорость гемолиза может существенно превышать последующие ее значения.

С помощью кинетических кривых представлены результаты однократного импульсного воздействия с энергией импульса $E=230$ Дж (рис. 1, в, 1), последовательного воздействия импульсами одной полярности (рис. 1, в, 2) и разнополярными (рис. 1, в, 3). Приведены соответствующие кинетические кривые (рис. 1, б) после воздействия биполярными импульсами дефибриллятора "ДИ-03". Этот дефибриллятор дает биполярный синусоидальный импульс с соотношением амплитуд 1:0.4. Пробойный трансмембранный потенциал формирует лишь первая полуволна. Причем порог напряжения пробоя (2900 В) соответствовал таковому для одиночного импульса дефибриллятора "LifePak-7".

Кинетическая кривая 3 для двух разнополярных импульсов идет ниже кривой 2 для двух однополярных импульсов той же длительности и амплитуды. Два импульса "ДИ-03", поданные в противофазе, вызывали большую скорость уменьшения эритроцитов по сравнению с двумя такими же, но поданными в одной фазе.

При воздействии двумя импульсами скорость уменьшения числа эритроцитов больше по сравнению со скоростью уменьшения после воздействия одного импульса (таблица). В 75% случаев скорость уменьшения V_p при воздействии разно-

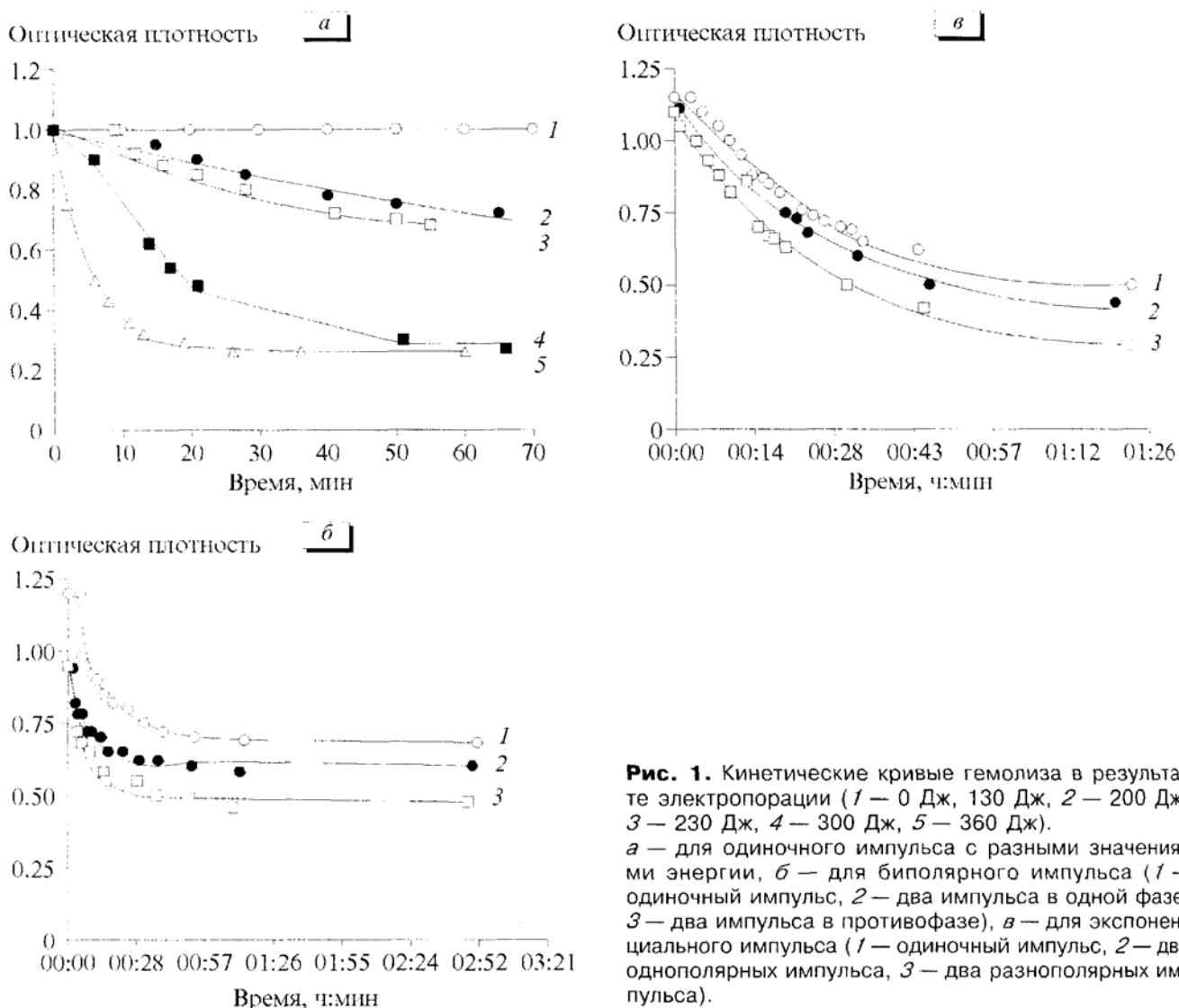


Рис. 1. Кинетические кривые гемолиза в результате электропорации (1 — 0 Дж, 130 Дж, 2 — 200 Дж, 3 — 230 Дж, 4 — 300 Дж, 5 — 360 Дж).

a — для одиночного импульса с разными значениями энергии, *b* — для биполярного импульса (1 — одиночный импульс, 2 — два импульса в одной фазе, 3 — два импульса в противофазе), *c* — для экспоненциального импульса (1 — одиночный импульс, 2 — два однополярных импульса, 3 — два разнополярных импульса).

полярными импульсами оказалась больше, чем скорость V_o после воздействия однополярными. В остальных 25% случаев они оказались практически одинаковыми. Были оценены (для $t=10$ мин) средние значения скоростей и отклонения для уровня значимости $p=0.05$.

Для 12 выборочных серий (из 80; 10 мин) нормированная скорость уменьшения числа эритроцитов при действии разнополярными импульсами была выше, чем при действии парой однополярных импульсов (рис. 2). При этом амплитуды двух однополярных и двух разнополярных импульсов во всех опытах оставались постоянными. Для 20 мин параметры сохраняли соотношения полностью (рис. 2).

Наблюдалась неаддитивность скоростей при двукратном воздействии по сравнению с однократным. Чаще это происходило при воздействии импульсами разной полярности. Так, неад-

дитивность скоростей ($t=10$ мин) наблюдалась в 7 случаях из 12 для однополярных импульсов ($V_o > 2V$) и в 11 случаях из 12 — для разнополярных ($V_p > 2V$). Для $t=20$ мин неаддитивность наблюдалась в одном случае из 12 для однополярных и в 5 случаях из 12 для разнополярных.

Показано, что скорость уменьшения количества эритроцитов начинает увеличиваться по сравнению со скоростью гемолиза в физиологическом растворе только при пороговом значении напряженности электрического поля E_o в растворе. Трансмембранный потенциал $\Delta\phi_n$, наведенный на эритроцит, рассчитывается по формуле Максвелла: $\Delta\phi_n = 1.5E_oR\cos\theta$, где R — радиус клетки, θ — угол между направлением E_o и радиус-вектором. Для R негемолизированных эритроцитов, равного 4 мкм, $\Delta\phi_n$ составляет около 450 мВ. Такое напряжение является пороговым. При меньших значениях $\Delta\phi_n$ электропорация

Экспериментальные данные скоростей (1/мин) уменьшения числа эритроцитов для разных форм импульсов

Форма	Серия											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Один импульс V_1 , 10 мин	0.018	0.01	0.01	0.009	0.005	0.005	0.005	0.01	0.01	0.005	0.005	0.005
Два однополярных импульса V_D , 10 мин	0.02	0.022	0.016	0.025	0.02	0.005	0.014	0.031	0.02	0.008	0.008	0.024
Два разнополярных импульса V_P , 10 мин	0.03	0.031	0.025	0.03	0.021	0.034	0.023	0.025	0.032	0.022	0.018	0.031

Примечание. $V=0.008 \pm 0.003$, $V_o=0.018 \pm 0.005$, $V_p=0.027 \pm 0.003$ мин⁻¹.

незначительная. При больших значениях $\Delta\phi_{ii}$ этот процесс идет лавинно: увеличивается количество пор и растет их диаметр [8,9]. Это зависит только от E_o (для данного R). Поэтому и импульс Edmark (экспонента), и Gurvich (биполярный синус) дают одну и ту же величину порогового потенциала, хотя энергия при одном значении E_o у этих импульсов может отличаться в 1.5-2 раза.

В серии опытов для оценки радиуса возникающих пор использовали метод ингибирования гемолиза молекулами глюкозы [11]. Показано, что размер пор через 10 мин после действия импульсного электрического поля не превышал 0.7 нм.

Результат действия двух импульсов не является удвоенным результатом воздействия одного импульса. Это связано с совокупностью различных факторов: нормальное распределение параметров популяции клеток, изменение ориентации дискоцитов в пространстве по отношению к направлению напряженности электрического поля, изменение состояния мембраны после первого воздействия. Предыстория состояния популяции клеток для второго импульса отличалась от таковой для первого, поэтому наблюдался эффект последействия.

Наиболее важный результат получен при действии на суспензию эритроцитов двумя разнополярными импульсами: V_p оказалась больше V_o , хотя первый импульс был положительный (как и в двух однополярных). Предыстория для второго импульса была такой же, но его действие оказалось эффективнее: за одно и то же время (10 мин) количество эритроцитов в суспензии оказывалось меньшим. Этот эффект выражен на эритроцитах, подготовленных не ранее, чем за 10 мин до подачи импульса. На подготовленных эритроцитах за 10-15 мин до воздействия этот эффект слаживался. Известно, что в первые 10 мин перенос катионов калия и натрия очень мал. Потом катионная проводимость мембранны увелличивается [3]. В наших экспериментах мембра пробивалась первым импульсом, и катионная проводимость возрастала скачком. Направление токов через электропорированную мембрану становилось противоположным по отношению ко второму однополярному действию. В этом случае второй импульс обратной полярности вызывал иные изменения локальных трансмембранных токов по сравнению со вторым импульсом той же полярности.

Разнополярные импульсы вызывают на противоположных сторонах клетки несимметричные эффекты электропорации: количество и размеры

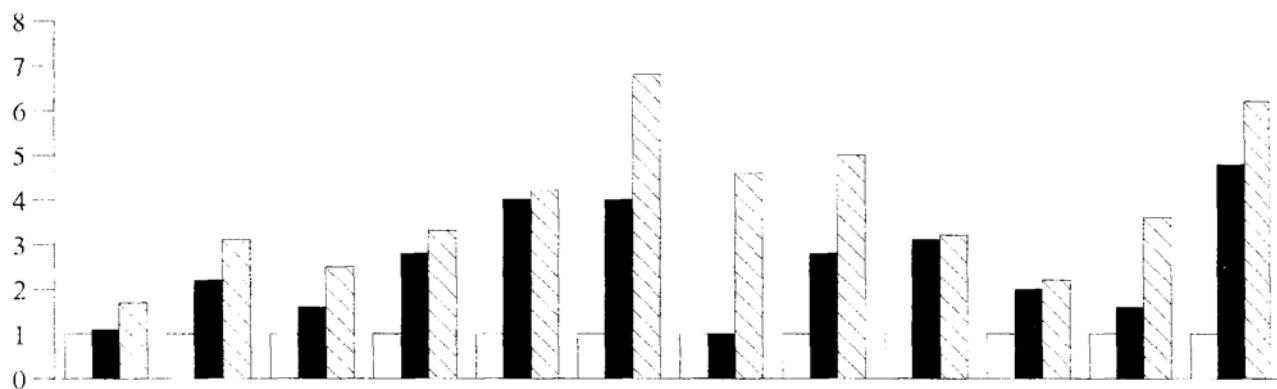


Рис. 2. Соотношение скоростей уменьшения числа эритроцитов при воздействии импульсами разной формы. Светлые столбики — отношение V/V (опорный параметр), темные — нормированная скорость для двух однополярных импульсов, заштрихованные — нормированная скорость для разнополярных импульсов.

пор на сторонах клетки были различными [12, 13]. Подобные явления отмечались и на целостном миокарде [6, 9]. На процесс асимметричного образования пор существенное влияние оказывало также неоднородное распределение белков и липидов в мембране [2, 15].

Эффекты последействия также связаны с релаксационными процессами поверхностной и объемной поляризации клеток под действием импульсного электрического поля. В этом случае воздействие вторым импульсом другой полярности не эквивалентно воздействию импульсов той же полярности.

В наших экспериментах наблюдаемые эффекты носили статистический характер, как и результаты действия биполярных импульсов при дефибрилляции в клинических исследованиях [7].

Авторы выражают благодарность Р.Н. Емельяновой за помощь при проведении эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

- Богушевич М.С., Востриков В.А., Черныш А.М. // Вестн. РАМН. 1997. № 10. С. 36-44.
- Какушкина М.Л. // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины. Сб. науч. трудов. М., 1990.
- Лев А.А. Ионная избирательность клеточных мембран. М., 1975.
- Мороз В.В., Богушевич М.С., Востриков В.В. и др. // Анестезиол. и реаниматол. 2002. № 6. С. 60-63.
- Черныш А.М. Биомеханика неоднородностей сердечной мышцы. М., 1993.
- Al-Khadra A., Nikolski V., Efimov I.R. // Circ. Res. 2000. Vol. 87, N9. P. 797-804.
- Cansell A. // La revue des samu. 2000. Vol. 22, N 6. P. 280-294.
- De Bruin K.A., Krassowska W. // Biophys. J. 1999. Vol. 77, N 3. P. 1224-1233.
- Fast V.G., Rohr S., Ideker R.E. // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2000. Vol. 278, N 3. P. 688-697.
- Saulis G. // Biomed. Sci. Instrum. 1999. Vol. 35. P. 291-296.
- Soszynski M., Bartosz G. // Int. J. Radiat. Biol. 1997. Vol. 71, N 3. P. 337-343.
- Tekle E., Astumian R.D., Chock P.B. // Biochem Biophys. Res. Commun. 1990. Vol. 172, N 1. P. 282-287.
- Tekle E., Astumian R.D., Friauf W.A., Chock P.B. // Biophys. J. 2001. Vol. 81, N 2. P. 960-968.
- Tovar O., Tung L. // Pacing. Clin. Electrophysiol. 1991. Vol. 14, Pt. 2. P. 1887-1892.
- Zhang J.Z., Kong K.J., Lu O.W., Dong R.J. // Shi Yan Sheng Wu Xue Bao. 1994. Vol. 27, N 2. C. 183-191.

Получено 16.05.03