

Powiązania czynnościowe równowagi  
oksydoredukcyjnej z regulacją rytmu serca  
zależne od chemoreceptorów tętnicznych

mgr Stanisław Zajączkowski

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych



Promotor: dr hab. Tomasz H. Wierzba

Wydział Lekarski

Gdańsk Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 2018

## Wstęp:

Fundamentalne znaczenie dla funkcjonowania organizmu ma optymalny dopływ tlenu do tkanek, co zależy od sprawności mechanizmów regulacyjnych z udziałem receptorów wyspecjalizowanych w detekcji tlenu. Funkcją podstawowych czujników prężności tlenu we krwi pełnią chemoreceptory tętnicze zlokalizowane w kłębkach szyjnych i aortalnych. Przy niedobrze tlenu odpowiedź odruchowa przebiega z udziałem złożonych układów regulacyjnych, w których podstawową rolę odgrywa odruch z chemoreceptorów tętniczych, przy nie do końca wyjaśnionym udziale autonomicznego układu nerwowego (autonomic nervous system; ANS). Niepożądane reakcje związane z pobudzeniem części współczulnej tego układu, w tym zwiększone ryzyko krytycznych incydentów sercowo-naczyniowych, przyczynia się do coraz większego zainteresowania badaczy reakcjami odruchowymi przebiegającymi z jej udziałem, w tym, w szczególności, odruchem z chemoreceptorów tętniczych. Liczne dane wskazują, że detekcja tlenu przez komórki chemoreceptyjne kłębków szyjnych i aortalnych zachodzi przy udziale reaktywnych postaci tlenu (ROS). Pozostaje niejasnym, czy ograniczenie mechanizmów stresu oksydacyjnego w skali ogólnoustrojowej znacząco wpływa na odruch z chemoreceptorów tętniczych i wtórnie na autonomiczną regulację czynności serca. Jakkolwiek podłoże patofizjologiczne wyników dużych badań epidemiologicznych związanych z przewlekłym profilaktycznym przyjmowaniem antyoksydantów, takich jak: kwas askorbinowy [1],  $\beta$ -karoten, retinol [2],  $\alpha$ -tokoferol [3] nie zostało wyjaśnione, to można hipotetycznie przyjąć, że antyoksydanty mogą zakłócać odruchowe mechanizmy regulacyjne i wywoływać aktywację komórek chemoreceptyjnych charakterystyczną dla niedoboru tlenu, prowadząca do pobudzenia odruchu z chemoreceptorów tętniczych ze zwiększeniem napędu współczulnego.

## Cel:

Celem badań była ocena wpływu czynników zaburzających ogólnoustrojową równowagę oksydoredukcyjną na autonomiczną regulację rytmu serca szczura w warunkach spoczynkowych i w warunkach pobudzenia chemoreceptorów tętniczych.

### Materiały i metody:

Badania zostały wykonane na szczurach, samcach szczepu Wistar (N=49, 300 – 350g), z uprzednio założonymi elektrodami do rejestracji EKG.

W doświadczeniach przeprowadzonych na zwierzętach bez narkozy pobudzone chemoreceptory tętnicze poprzez obniżenie ciśnienia atmosferycznego o około 400 mm Hg. Następnie szczury oddychały czystym tlenem w warunkach ciśnienia atmosferycznego, co miało zahamować reakcje odruchowe zależne od chemoreceptorów tętniczych. W kolejnym etapie badanym zwierzętom podawano allopurinol (ALLO), który w założeniu zmniejszał ilość ROS w komórkach chemoreceptyjnych lub dietylotiokarbamid (DETC) - utleniacz, o działaniu przeciwnym. ALLO jest inhibitorem oksydazy ksantynowej (xanthine oxidase, XO), która jest enzymem katalizującym przemianę hipoksantyny w ksantynę i dalej w kwas moczowy. Podczas tych reakcji, zachodzących zwłaszcza w warunkach hipoksji, powstają duże ilości ROS, w szczególności anionorodnik nadadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ). Zahamowanie ich wytwarzania przez ALLO zmniejsza stres oksydacyjny oraz modyfikuje odpowiedź ze strony ANS. DETC jest inhibitorem dysmutazy nadadtlenkowej (superoxide dismutase, SOD), która usuwa  $O_2^{\cdot-}$  katalizując wytwarzanie nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ). Profil działania DETC jest więc odwrotny do efektu ALLO: dochodzi do wzrostu poziomu  $O_2^{\cdot-}$  i zmniejszenia  $H_2O_2$ .

Wpływ ROS na aktywność ANS i przez to na regulację rytmu serca był oceniany z wykorzystaniem analizy zmienności rytmu serca (heart rate variability; HRV). HRV była wyznaczana z fragmentów zapisu EKG zarejestrowanego z wysoką 4-kHz rozdzielczością, przy czym do analizy HRV wykorzystano niezakłócone serie czasowe 1024 kolejnych odstępów RR. Wyznaczono wskaźniki analizy czasowej i spektralnej HRV, a złożoność układu regulacyjnego i determinizm rytmu serca oceniono wykorzystując wskaźniki analizy nieliniowej. Po zakończeniu doświadczeń od szczurów została pobrana krew w celu wykonania oznaczeń biochemicznych enzymów oksydacyjnych oraz parametrów stresu oksydacyjnego.

### Omówienie wyników:

Potwierdzono wcześniejsze doniesienia [4], że hipoksja hipobaryczna inicjuje u szczurów pierwotny filogenetycznie wzorzec odpowiedzi sercowej ze zwolnieniem rytmu serca, przy czym kierunek wywołanych zmian nie był zbieżny ze zmianami HRV. Hipoksja zwiększała całkowitą zmienność rytmu serca oraz wskaźniki aktywności części przywspółczulnej ANS (rMSSD, HF). Wykazano ponadto obniżenie wskaźnika analizy spektralnej LF/HF,

reprezentującego względny udział napędu współczulnego w autonomicznym sterowaniu rytmem serca, jak również jego odpowiednika z analizy czasowej: SDNN/rMSSD. Hiperoksja po uprzedniej hipoksji spowodowała dalsze zwolnienie częstości akcji serca, z towarzyszącym zmniejszeniem HRV.

Zahamowanie XO za pomocą ALLO nie spowodowało istotnych zmian wskaźników HRV w standardowych warunkach normoksji. Przy obniżonej m zawartości tlenu w powietrzu oddechowym odnotowano istotne zwiększenie wskaźników całkowitej zmienności rytmu serca: SDNN, całkowitej mocy widma (TSP) oraz mocy widmowej w zakresie LF, ze wzrostem wyznaczników aktywności przywspółczulnej – HF, rMSSD. Równocześnie wykazano zmniejszenie wskaźników LF/HF i SDNN/rMSSD, co świadczy o ograniczeniu dominującej roli układu współczulnego.

Po podaniu ALLO, nie tylko stwierdzono niemal 10-krotne zmniejszenie aktywności XO, ale także wzrost aktywności SOD, z obniżeniem osoczowego stężenia 8-isoprostanów – wskaźnika utlenienia lipidów, co wskazuje na redukcję stresu oksydacyjnego. DETC zmniejszył aktywność SOD o 30%, ale nie spowodował istotnych zmian wskaźników osoczowego stresu oksydacyjnego, na poziomie lipidów (8-izosoprostany) lub białek (stężenie grup karbonylowych). DETC wywołał istotne zwiększenie częstości akcji (z 320 do ponad 400 uderzeń na minutę), czemu w obrazie HRV odpowiadały cechy zmniejszenia regulacyjnej kontroli rytmu serca przez AUN. Nastąpiło istotne zmniejszenie całkowitej zmienności rytmu serca (SDNN,TSP), z drastycznym zmniejszeniem wyznaczników napędu wagalnego (rMSSD, HF). Na zmniejszenie autonomicznej kontroli nad sercem z uproszczeniem układu regulacyjnego wskazuje także obniżenie wskaźników analizy nieliniowej HRV: wskaźnika rekurencji (%REC), determinizmu (DET) i krótkoczasowego wykładnika beztrendowej analizy fluktuacji ( $DFA_{\alpha 1}$ ). Na szczególną uwagę zasługuje zmiana  $DFA_{\alpha 1}$ , którego wartość zbliżyła się do zakresu charakterystycznego dla białego szumu. U większości gryzoni, w tym u szczurów, utrata regulacyjnej kontroli nerwu błędnego nad rytmem serca oznacza pozostawienie serca pod niemal wyłącznym wpływem układu współczulnego. Nawet przy jego zahamowaniu, spontaniczne zmiany aktywności, które są charakterystyczne dla napędu współczulnego, mogą dramatycznie destabilizować rytm serca [5].

## Wnioski:

1. Podstawowym osiągnięciem badań było wykazanie, że ingerencja w endogenną równowagę oksydoredukcyjną, przy użyciu zarówno czynników o działaniu antyoksydacyjnym, jak też oksydantów, zakłóca równowagę regulacyjną układu sercowo-naczyniowego.
2. Pobudzenie chemoreceptorów tętnicznych podczas hipoksji, przyczynia się do zwiększenia aktywności ANS włączając w to jego komponentę przywspółczulną.
3. Obserwowane po podaniu DETC zmiany wskaźników HRV wskazują, że czynniki o działaniu prooksydacyjnym mogą istotnie zmniejszać ośrodkową kontrolę rytmu serca. Z kolei antyoksydanty, takie jak ALLO zwiększają aktywność ANS sterującego układem sercowo-naczyniowym. Zwiększenie przez ALLO udziału komponenty wagalnej w ośrodkowej kontroli rytmu serca w warunkach hipoksji koresponduje ze wskazaniami do rozszerzenia jego wskazań terapeutycznych do choroby niedokrwiennej serca i jej powikłań.
4. Uzyskane wyniki zachęcają do dalszych badań i wskazują na potrzebę rozszerzenia badań podstawowych i klinicznych o ocenę dynamicznych aspektów regulacyjnych oraz analizę zmienności rytmu serca.

## Literatura:

- [1] Folsom AR, French SA, Zheng W i wsp. Weight variability and mortality: the Iowa Women's Health Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996; 20: 704–9.
- [2] Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J i wsp. The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial: Incidence of Lung Cancer and Cardiovascular Disease Mortality During 6-Year Follow-up After Stopping  $\beta$ -Carotene and Retinol Supplements. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1743–1750.
- [3] Stephens NG, Parsons A, Schofield PM i wsp. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* (London, England) 1996; 347: 781–6.
- [4] Barros RCH, Bonagamba LGH, Okamoto-Canesin R i wsp. Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. *Auton Neurosci* 2002; 97: 110–5.
- [5] Carnevali L, Sgoifo A. Vagal modulation of resting heart rate in rats: The role of stress, psychosocial factors, and physical exercise. *Front Physiol* 2014; 5 MAR: 1–12.

# **Chemoreflex-dependant functional links between heart rhythm regulations and redox balance**

Doctoral Thesis by  
**Stanisław Zajączkowski**



**Supervisor: dr hab. Tomasz H. Wierzba**

Faculty of Medicine Medical  
University of Gdańsk Gdańsk,

2018

## **Introduction:**

Optimal tissue oxygen supply is crucial for the functioning of the organism and it depends on the efficiency of regulatory mechanisms involving receptors specialized in oxygen detection. Arterial chemoreceptors, located in the carotid and aortic bodies, hold the function of basic blood oxygen sensors. In case of oxygen deficiency, the reflex response is carried out with the use of complex regulatory systems where the arterial chemoreceptor reflex plays a fundamental role, while the involvement of the autonomic nervous system (ANS) in the process is not fully explained. Undesirable reactions associated with stimulation of the sympathetic part of this system, including an increased risk of critical cardiovascular events, contribute to the researchers' increasing interest in reflex reactions with its participation, including, in particular, reflexes from arterial chemoreceptors. Numerous publications suggest that oxygen detection by chemoreceptive cells of the carotid and aortic bodies takes place with the participation of reactive oxygen species (ROS). It remains unclear whether the limitation of oxidative stress mechanisms on the systemic scale significantly affects the reflex of arterial chemoreceptors and secondary to the autonomic regulation of cardiac function. However, the pathophysiological basis of the results of major epidemiological studies related to chronic prophylactic antioxidant ingestion, such as ascorbic acid [1], beta-carotene, retinol [2], tocopherol [3], has not been explained, it can be hypothetically assumed that antioxidants may interfere with reflex regulatory mechanisms and induce activation of chemoreceptive cells characteristic of oxygen deficiency, leading to stimulation of the reflex of arterial chemoreceptors with increased sympathetic drive.

## **Aim:**

The aim of the study was to assess the influence of factors disturbing systemic oxidoreductive balance on autonomic regulation of rat heart rhythm during resting conditions and under conditions of stimulation of arterial chemoreceptors.

## **Material and methods:**

The tests were performed on male Wistar rats (N = 49, 300 - 350g), with pre-installed ECG recording electrodes.

During the experiments performed without anesthesia chemoreceptors were stimulated by the change of atmospheric pressure which was lowered by about 400 mm Hg. Later rats were allowed to breathe pure oxygen at atmospheric pressure to inhibit arterial-dependent chemoreceptor responses. In the next stage, the animals were treated with two substances: allopurinol (ALLO), which was introduced in order to reduce the amount of ROS in chemoreceptive cells, or diethylthiocarbamide (DETC) - an oxidizing agent with opposite effect. ALLO is a xanthine oxidase inhibitor (XO), which is an enzyme that catalyzes the conversion of hypoxanthine into xanthine and further into uric acid. During these reactions, especially under hypoxic conditions, large amounts of ROS are formed, in particular superoxide anion radical ( $O_2^{\bullet-}$ ). We observed that inhibition of ROS production by ALLO in turn reduced oxidative stress and modified the ANS response. DETC is an inhibitor of superoxide dismutase (SOD), which removes  $O_2^{\bullet-}$  catalyzing the production of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). The DETC operation profile is therefore opposite to the ALLO effect: while the  $O_2^{\bullet-}$  level increased -  $H_2O_2$  decreased.

The effect of ROS on ANS activity and thus on the regulation of heart rhythm was evaluated using heart rate variability (HRV) analysis. HRV was determined using ECG fragments recorded at the 4-kHz resolution, with uninterrupted time series of 1024 consecutive RR intervals. The time- and frequency domain analysis indexes were determined. Additionally, the complexity of the regulatory system and cardiac rhythm determinism were assessed using nonlinear HRV analysis. After completion of the animal experiment phase, blood was collected for biochemical analysis of oxidative enzyme concentration and oxidative stress indicators.

## **Results:**

Our findings confirmed the data reported to date [4] that hypobaric hypoxia initiates a phylogenetically primary pattern of cardiac response in rats, characterized by a slow heart rate (HR), with the direction of induced changes not coincident with changes in HRV. Moreover hypoxic conditions increased the total variability of rat heart rate and activity indexes of the parasympathetic ANS (rMSSD, HF). Plus, the LF/HF ratio representing the relative contribution of sympathetic drive in autonomic HR control



was shown to be lowered as well as its counterpart in time analysis: SDNN/rMSSD. Hyperoxia applied to follow previous hypoxia caused a further slow-down of HR, accompanied by a decrease in HRV.

Inhibition of XO with ALLO did not cause significant changes in HRV indexes under standard normoxia conditions. At the reduced oxygen content in the respiratory air, a significant increase in total heart rate variability was noted: SDNN, total spectral power (TSP) and spectral power in the LF range, with an increase in the parasympathetic activity index - HF, rMSSD. At the same time, the reduction of LF/HF and SDNN/rMSSD was demonstrated, which indicates a limitation of the dominant role of the sympathetic nervous system.

Following the administration of ALLO, not only was there an almost 10-fold reduction in XO activity, but also an increase in SOD activity, with a decrease in the plasma concentration of 8-isoprostanes - the lipid oxidation index, which indicates a reduction in oxidative stress. DETC decreased SOD activity by 30%, but did not cause significant changes in plasma oxidative stress indicators, at the level of lipids (8-isoprostanes) or proteins (concentration of carbonyl groups). DETC introduction in turn resulted in a significant increase of HR (from 320 to over 400 beats per minute), which in case of HRV corresponded to the reduction of ANS-driven heart rate regulatory features. There was a significant reduction in the total variability of the heart rhythm (SDNN, TSP), with a drastic reduction in the vagal traction markers (rMSSD, HF). The reduction of autonomic control over the heart with the simplification of the regulatory system is also indicated by lowered non-linear HRV indexes: recurrence rate (% REC), determinism (DET) and short-term exponent of detrended fluctuation analysis (DFA $\alpha$ 1). Particularly noteworthy is the change in DFA $\alpha$ 1 when its value approached the range characteristic to that of white noise. In most rodents, including rats, the loss of regulatory control of the vagus nerve over the heart rhythm means leaving the heart under the almost exclusive influence of the sympathetic nervous system. Even with its inhibition, spontaneous changes in activity that are characteristic of sympathetic drive can dramatically destabilize the heart rhythm [5].

## **Conclusions:**

1. The major finding of the study was to show that interference within the endogenous oxidoreductive balance, using both antioxidant and oxidant factors, disrupts the regulatory balance of the cardiovascular system.
2. Stimulation of arterial chemoreceptors during hypoxia, contributes to an increase in ANS activity including its parasympathetic component.
3. Changes in HRV indicators observed after DETC administration suggest that pro-oxidative factors may significantly reduce central heart rhythm control. In turn, antioxidants, such as ALLO, increase the ANS activity that controls the cardiovascular system. ALLO-increased vagal component contribution onto the central rhythm control in the hypoxic conditions corresponds with the suggestions to extend its therapeutic use to ischemic heart disease and its complications.
4. The results obtained during this study encourage further research and indicate the need to extend basic and clinical research with the assessment of dynamic regulatory aspects and the analysis of cardiac rhythm variability.

## **Literatura:**

- [1] Folsom AR, French SA, Zheng W et al. Weight variability and mortality: the Iowa Women's Health Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996; 20: 704–9.
- [2] Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J et al. The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial: Incidence of Lung Cancer and Cardiovascular Disease Mortality During 6-Year Follow-up After Stopping -Carotene and Retinol Supplements. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1743–1750.
- [3] Stephens NG, Parsons A, Schofield PM et al. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet (London, England)* 1996; 347: 781–6.
- [4] Barros RCH, Bonagamba LGH, Okamoto-Canesin R et al. Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. *Auton Neurosci* 2002; 97: 110–5.
- [5] Carnevali L, Sgoifo A. Vagal modulation of resting heart rate in rats: The role of stress, psychosocial factors, and physical exercise. *Front Physiol* 2014; 5 MAR: 1–12.

## Prace będące przedmiotem rozprawy

Zajączkowski S, Ziółkowski W, Badtke P, Zajączkowski MA, Flis DJ, Figarski A, Smolińska-Byłańska M, Wierzba TH. Promising effects of xanthine oxidase inhibition by allopurinol on autonomic heart regulation estimated by heart rate variability (HRV) analysis in rats exposed to hypoxia and hyperoxia. *Plos One* 2018; 13 (2): e0192781.

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0192781>

Zajączkowski S, Wierzba TH, Ziółkowski W. Nonlinear Dynamics of Heart Rate Variability after Superoxide Dismutase Inhibition in Rats. *Computing in Cardiology* 2016; 43: 993-996.

<http://www.cinc.org/archives/2016/pdf/287-404.pdf>

Zajączkowski S, Smolińska M, Badtke P, Wierzba TH. Time-Domain and Spectral Analysis of Heart Rate Variability in Rats Challenged with Hypoxia. *Computing in Cardiology* 2014; 41: 785-788.

<http://www.cinc.org/archives/2014/pdf/0785>

Zajączkowski S, Zajączkowski M, Kosiński A, Grzybiak M, Wierzba TH. Ocena zmienności rytmu serca (HRV) w zaawansowanym wieku. Heart rate variability (HRV) analysis in advanced age. *Geriatrics* 2014; 8:232-239.

[http://www.akademiamedycyny.pl/wp-content/uploads/2016/05/201404\\_Geriatrics\\_004.pdf](http://www.akademiamedycyny.pl/wp-content/uploads/2016/05/201404_Geriatrics_004.pdf)