

Экспериментальные исследования

ГАВРИЛОВА С. А.¹, ГОЛУБЕВА А. В.¹,
ЛИПИНА Т. В.², ФОМИНЫХ Е. С.²,
ВАРЕНИК Е. Н.², ШОРНИКОВА М. В.²,
ЧЕНЦОВ Ю. С.², КОШЕЛЕВ В. Б.¹

**Кардиопротекторный эффект пептидного препарата семакс
в условиях экспериментального ишемического
и реперфузионного повреждения миокарда**

¹Факультет фундаментальной медицины, ²Биологический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Gavrilova S. A.¹, Golubeva A. V.¹, Lipina T. V.²,
Fominykh E. S.², Varenik E. N.², Shornikova M. V.²,
Chentsov U. S.², Koshelev V. B.¹

**Peptide Semax — a modified adrenocorticotrope hormone fragment (ACTH(4–7)-PGP) —
exerted cardioprotective effect on rat heart in vivo in experimental model of ischemia-
and ischemia/reperfusion-induced cardiac injury**

¹Faculty of Medicine; ²Faculty of Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the protective effect of peptide Semax towards structure and functional state of the rat heart after myocardial infarction caused by irreversible ischemia and ischemia followed by reperfusion. Myocardial ischemia was induced by left coronary artery occlusion. In 2,5 hours and 28 days after the onset of irreversible ischemia and in 72 hours after the onset of reperfusion we assessed in vivo heart performance by measuring systemic and left ventricular pressure curves in anaesthetized animals in rest and under pharmacological load; structural changes of left ventricular myocardium were assessed using light and electron microscopy. Semax (total 300 µg/kg) was given i. p. 15 min and 2,25 hours after coronary occlusion. Semax failed to reduce ischemia-induced myocardial cell death, but completely prevented the development of ultrastructural disturbances in mitochondrial and nuclear apparatus in ischemic cardiomyocytes in 2,5 hours after the onset of ischemia. In 72 hours after the restoration of blood flow in ischemic for 2,5 hours myocardium, Semax was ineffective to reduce infarct size, but increased to 20 % β1-agonist-mediated peak developed contractility of the injured heart and normalized α1-agonist-mediated systemic pressure response. Peptide supplementation attenuated left ventricular remodelling late after myocardial infarction. Thus, Semax had no effect on the extent of both ischemia- and reperfusion-induced myocardial injury, but supported structural and functional maintenance of the survived after infarction myocardium.

Key words: myocardial infarction, ischemia/reperfusion, ACTH(4–7)-PGP, myocardial contractility, cardiomyocyte ultrastructure, myocardial remodelling.

Восстановление кровотока в ишемизированной области миокарда (реперфузия) является приоритетной составляющей в лечении острого инфаркта миокарда, поскольку максимально эффективно снижает объем поражения сердечной мышцы и острую смертность. Однако реперфузионная терапия не всегда бывает успешной или может быть противопоказана; кроме того, реперфузия сама по себе оказывает повреждающий эффект на миокард, основными медиато-

рами которого являются окислительный стресс и воспаление [9]. Следовательно, изучение механизмов ишемического и реперфузионного повреждения миокарда, а также поиск новых эффективных способов их коррекции представляет собой чрезвычайно актуальную проблему. Пептидный препарат семакс (АКТГ(4–7)-РРР) успешно применяют в клинической практике в терапии ишемических состояний мозга [4]. Противовоспалительный эффект пептида [4, 5] и

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

его способность предотвращать усиление генерации оксида азота в ишемизированном мозге [6] позволяют прогнозировать наличие защитного действия семакса в отношении ишемического и реперфузионного повреждения миокарда. Учитывая множественность мишеней семакса в различных отделах ЦНС, не следует исключать возможность центрального действия пептида на нервную регуляцию работы сердца.

В связи с этим, настоящее исследование было направлено на проверку гипотезы о том, способен ли семакс оказывать защитный эффект на миокард крысы *in vivo* в условиях необратимой ишемии и ишемии с последующей реперфузией. Для комплексного исследования состояния поврежденного миокарда мы сочетали анализ параметров системной и левожелудочковой гемодинамики для оценки функционального состояния сердца с изучением структурных нарушений миокарда на световом и электронномикроскопическом уровнях.

Методика

Исследование проводили на взрослых самцах белых беспородных крыс весом 350–450 г (n=106). Необратимую ишемию миокарда (серия ИМ) моделировали путем окклюзии левой коронарной артерии на 3–4 мм апикальное ушка левого предсердия; размер зоны риска, выявляемой по отсутствию окрашивания метиленовым синим, составил в среднем 30 % от объема левого желудочка [3]. В серии ИМ исследовали 4 группы: животные с ишемией миокарда — ИМ+ФР (получавшие стерильный 0,9 % NaCl, n=23) и ИМ+СМ (получавшие семакс, n=19). Контролем к ним служили соответствующие группы с ложной операцией — ЛО+ФР (n=14) и ЛО+СМ (n=13). Через 2,5 часа после операции отбирали пробы миокарда из зоны риска на микроскопическое исследование (n=12); проводили гемодинамические измерения *in vivo* (n=29). Через 28 суток после окклюзии оценивали объем инфаркта по массе рубцовой ткани (n=16); отбирали фрагменты сохранного после инфаркта миокарда левого желудочка на микроскопическое исследование (n=12). В модели ишемии/реперфузии миокарда (серия И/Р) восстановление кровотока проводили через 2,5 часа после начала эпизода ишемии. В серию И/Р было включено 3 группы: животные с ишемией/реперфузией миокарда — И/Р+ФР (получавшие стерильный 0,9 % NaCl, n=13), И/Р+СМ (получавшие семакс, n=13) и интактные животные (n=11). Через 72 часа после начала реперфузии отбирали пробы миокарда из зоны риска на микроскопическое исследование (n=9); проводили гемодинамические измерения *in vivo* в покое и на фоне фармакологических нагрузок, после чего с помощью гистохимического окрашивания ТТХ [3] оценивали объем инфаркта (n=28). Семакс вводили животным внутривенно в дозе 150 мкг/кг два раза — через 15 минут и 2 часа 15 минут после окклюзии коронарной артерии или ложной операции. В группе животных, состояние миокарда которых оценивали через 28

суток после операции, семакс вводили в первый день по описанной выше схеме, а затем однократно в дозе 150 мкг/кг в течение каждого из последующих 6-ти дней. Схему и дозу введения препарата выбрали на основании исследований, показавших эффективность дробного и раннего применения пептида в условиях ишемии мозга [4, 6, 8].

Гемодинамические измерения проводили на наркотизированных животных (тиопентал натрия, 75 мг/кг в/бр) с обязательной трахеотомией, без искусственной вентиляции легких. С кривой системного артериального давления, регистрируемого в брюшной аорте, рассчитывали среднее артериальное давление (АД_{ср.}). С кривой давления в левом желудочке сердца, регистрируемого с помощью миниатюрного датчика давления Millar, рассчитывали величины среднего (АД_{ЛЖср.}), систолического (АД_{ЛЖсис.}), диастолического (АД_{ЛЖдиас.}) и конечно-диастолического (АД_{ЛЖкдд.}) давления; максимальные скорости увеличения (+dP/dt_{max}) и уменьшения (–dP/dt_{max}) давления в левом желудочке и частоту сердечных сокращений (ЧСС). Измерения проводили в состоянии покоя и в ответ на нагрузочные тесты следующими препаратами: 1) агонист β1-адренорецепторов добутамин в дозах 1; 2; 3; 4,5 и 6 мкг/кг•мин; 2) агонист α1-адренорецепторов фенилэфрин в дозах 3; 7; 12; 18 и 25 мкг/кг•мин. Вещества инфузирвали внутривенно в накопительном режиме в течение 3-х минут на каждую из пяти доз вводимого препарата. Изменение регистрируемых параметров рассчитывали на плато реакции в ответ на каждую дозу; величина ответа представлена в Δ % от исходного уровня перед соответствующим препаратом.

Микроскопическое исследование миокарда левого желудочка сердца. Общую морфологию миокарда оценивали на срезах толщиной 4–6 мкм, окрашенных гематоксилином-эозином. Число кровеносных капилляров, приходящихся на 1 кардиомиоцит, и площадь поперечных сечений кардиомиоцитов подсчитывали на полутонких эпоновых срезах толщиной 2 мкм, окрашенных метиленовым синим. Для оценки наличия апоптотических клеток в миокарде применяли TUNEL-окрашивание; апоптотические ядра выявляли по пероксидазной метке. На электронномикроскопическом уровне описывали ультраструктурные характеристики ядра, миофибрилл и митохондрий клетки. Фиксация и подготовка срезов для световой и электронной микроскопии описана в [2, 3].

Данные представлены в таблицах и графиках как среднее ± стандартное отклонение от среднего. Учитывая независимость выборок и гетерогенность их дисперсий, значимость различий оценивали критерием Манна–Уитни. Различия признавались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Необратимая ишемия миокарда — 2,5 часа после окклюзии коронарной артерии. Гемодинамические измерения показали, что ишемия миокарда длитель-

Значения регистрируемых параметров гемодинамики через 2 часа 30 минут после моделирования ишемии миокарда или ложной операции

| Группа | ЛО+ФР | ИМ+ФР | ЛО+СМ | ИМ+СМ |
|--------------------------|--------------|----------------|--------------|--------------|
| АДср., мм рт. ст. | 133,2±11,4 | 118,5±12,2 | 128,0±20,1 | 120,0±13,1 |
| ЧСС, уд/мин | 370,6±53,1 | 378,8±16,3 | 370,0±31,8 | 367,5±41,9 |
| АДЛЖср., мм рт. ст. | 76,5±13,3 | 80,0±8,4 | 80,5±8,2 | 80,5±12,4 |
| АДЛЖсист., мм рт. ст. | 154,6±14,9 | 136,6±14,8 | 152,6±21,3 | 142,0±10,6 |
| АДЛЖдиас., мм рт. ст. | 12,9±0,8 | 19,1±2,4 * \$ | 12,6±1,6 | 15,7±4,7 |
| + dP/dtmax, мм рт. ст./с | 3038,3±334,5 | 2581,5±388,4 | 3031,0±434,0 | 2746,3±157,5 |
| - dP/dtmax, мм рт. ст./с | 2874,6±400,4 | 2336,3±264,1 * | 2757,2±478,2 | 2427,3±150,8 |

Примечание: * — $p < 0,05$ для группы ИМ+ФР по сравнению с группой ЛО+ФР; \$ — $p < 0,05$ для группы ИМ+ФР по сравнению с группой ИМ+СМ.

ностью 2 часа 30 минут не вызвала значительных нарушений сократительной функции сердца крысы (табл. 1): значения среднего артериального давления, а также параметров, характеризующих сократительную активность миокарда, — АДЛЖсист. и +dP/dtmax — имели тенденцию к снижению на 10–15 % в группах ИМ+ФР и ИМ+СМ по сравнению с ложнооперированными животными, но она не достигала уровня значимости. Наиболее уязвимой к действию ишемии оказалась функция расслабления миокарда: в группе ИМ+ФР наблюдали уменьшение -dP/dtmax на 18,7%, что сопровождалось подъемом диастолического давления в левом желудочке на 6,2 мм рт. ст. Применение семакса предотвратило развитие указанных нарушений (табл. 1).

Результаты гемодинамических измерений подкреплены сохранностью морфологии миокарда в области ишемии. В зоне риска не было обнаружено признаков некротической гибели кардиомиоцитов или присутствия клеток воспаления. TUNEL-окрашивание не выявило увеличения числа апоптотических ядер в зоне ишемии: во всех экспериментальных группах на 6–8 полей зрения встречали в среднем 1 апоптотическое ядро. В работах, выполненных на такой же

экспериментальной модели *in vivo*, TUNEL показал как наличие апоптоза в миокарде крысы через 2 часа после начала ишемии [18], так и его отсутствие через 2 часа 15 минут [14]. Число капилляров, приходящееся на 1 кардиомиоцит, не отличалось между группами (табл. 2). Общая морфологическая картина в группе ИМ+СМ выглядела аналогичной. Таким образом, вне зависимости от применения семакса, общая морфология миокарда в зоне риска через 2,5 часа после начала эпизода ишемии в целом не отличалась от миокарда с сохранным кровообращением у ложнооперированных животных и от интактного миокарда. Увеличение размеров клеток во всех экспериментальных группах на 30–45 % по сравнению с интактным контролем говорит о развитии клеточного отека (табл. 2). Равенство этого параметра в группах ИМ и ЛО свидетельствует о том, что наблюдаемый отек клеток был вызван неспецифическим влиянием операционного воздействия: постоперационный пневмоторакс и проводимые манипуляции на сердце могли спровоцировать развитие общей гипоксии и активацию стрессорной реакции организма.

Электронномикроскопический анализ показал накопление ультраструктурных нарушений ядерного

Средняя площадь поперечного сечения кардиомиоцитов (S) и число капилляров, приходящееся на 1 кардиомиоцит (N), в миокарде левого желудочка через 2 часа 30 минут после операции и у интактных животных

| Группа | Интактные | ЛО+ФР | ИМ+ФР | ЛО+СМ | ИМ+СМ |
|---------------------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| S, мкм ² | 219,7±76,7 | 285,1±129,7 # | 304,8±147,8 # | 304,4±119,1 # | 318,4±134,3 # |
| N | 0,84±0,14 | 0,80±0,21 | 0,82±0,17 | 0,83±0,16 | 0,83±0,13 |

Примечание: # — $p < 0,05$ для экспериментальных групп по сравнению с интактным контролем.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

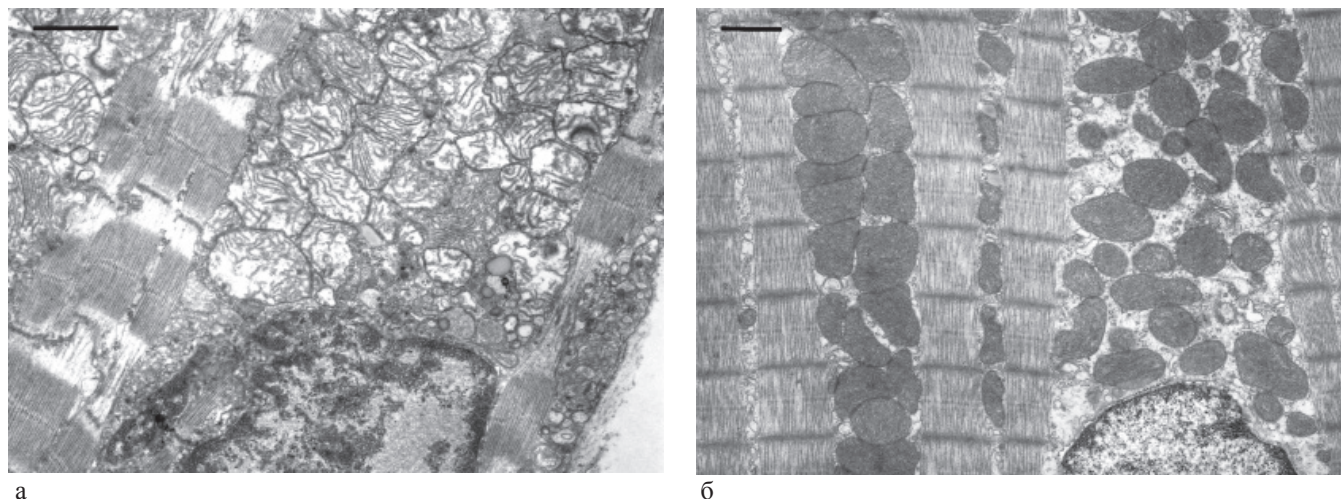


Рис. 1. Электронная микрофотография кардиомиоцита левого желудочка в зоне риска через 2,5 часа после начала ишемии. Масштабная линейка – 1 мкм: а — группа ИМ+ФР. Ядро содержит крупные глыбки хроматина, его граница извилистая; все митохондрии набухшие имеют просветленный матрикс и небольшое число крист; б — группа ИМ+СМ. Ядро имеет небольшой равномерный слой пристеночного хроматина и ровные границы; митохондрии нормальные, они характеризуются большим количеством пластинчатых крист и матриксом средней электронной плотности

и митохондриального аппаратов в ишемизированных кардиомиоцитах через 2,5 часа после окклюзии (группа ИМ+ФР). В более чем 50 % ядер обнаружена конденсация хроматина — хорошо выраженный слой пристеночного хроматина с неровными очертаниями и крупные глыбки хроматина в центре ядра (рис. 1, а); подобные изменения могут быть связаны с началом развития апоптоза кардиомиоцитов. Изменения коснулись митохондриального аппарата — просветленный матрикс и визуальное снижение числа крист (рис. 1, а) свидетельствуют о набухании митохондрий и отражают закисление цитоплазмы, развивающееся вследствие уменьшения количества макроэргических соединений и накопления метаболитов в клетке [7]. В части митохондрий встречались электронно-плотные гомогенные гранулы в матриксе и внутрикристные уплотнения. Важно, что патологические изменения не затронули миофибриллярный аппарат кардиомиоцитов. На фоне применения семакса (рис. 1, б) в ишемизированных кардиомиоцитах отсутствовали нарушения в структуре ядра и митохондрий: ядра имели небольшой равномерный слой пристеночного хроматина и ровные границы; большинство митохондрий имели большое число крист и не обнаруживали просветления матрикса. То есть группа ИМ+СМ по ультраструктурным характеристикам была похожа на ложнооперированных животных и разительно отличалась от группы ИМ+ФР. Возможно, сохранность митохондриома послужила причиной реализации защитного действия пептида в отношении функции расслабления ишемизированного миокарда как энергозависимого процесса (сохранность величин $-dP/dt_{max}$ и АДЛЖдиас. в группе ИМ+СМ по сравнению с группой ЛО+СМ, табл. 1).

Поскольку патофизиологическая картина реперфузионного повреждения миокарда во многом зависит

от длительности предшествующей ишемии [16], то оценка состояния ишемизированного миокарда в момент восстановления в нем кровотока является, на наш взгляд, обязательной составляющей исследования реперфузионного синдрома. Наше исследование показало, что 2,5 часа является адекватной длительностью ишемии для проведения реперфузии в миокарде крысы в условиях *in vivo*, поскольку за указанный период времени ишемия спровоцировала накопление обратимых повреждений ультраструктуры ядерного и митохондриального аппаратов кардиомиоцитов, но не привела к некротической гибели клеток, достижению ими поздних стадий апоптоза и морфологическим нарушениям капиллярного русла.

Необратимая ишемия миокарда — 28 суток после окклюзии коронарной артерии. Через 28 суток после моделирования необратимой ишемии миокарда масса рубцовой ткани составила $114,1 \pm 20,4$ мг в группе ИМ+ФР и $114,4 \pm 34,0$ мг в группе ИМ+СМ. Микроскопический анализ структуры сохранного после инфаркта миокарда левого желудочка ожидаемо обнаружил гипертрофию рабочего миокарда в группе ИМ+ФР — увеличение размеров клеток на 60,2 % по сравнению с ложнооперированным контролем (ЛО+ФР) и на 50,9 % по сравнению с интактными животными (рис. 2, а). Развитие гипертрофии в оставленный постинфарктный период рассматривают как компенсаторный ответ выживших после инфаркта кардиомиоцитов на увеличение функциональной нагрузки вследствие потери части миокарда [10]. Однако электронномикроскопический анализ показал, что гипертрофия была обеспечена преимущественным ростом сократительного аппарата, что отразилось в увеличении относительного объема миофибрилл в цитоплазме клетки на 18 % по сравнению с группой ЛО+ФР, в то время как объем митохондриома остался

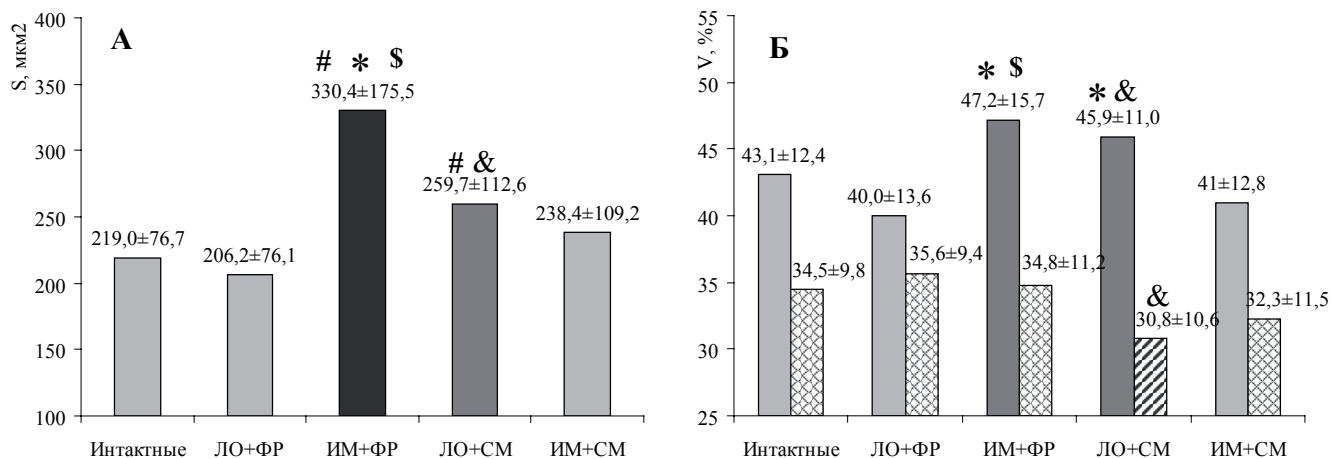


Рис. 2. а — средняя площадь поперечного сечения кардиомиоцитов левого желудочка (S, мкм²); б — относительные объемы (%), занимаемые миофибриллами (сплошные столбики) и митохондриями (штрихованные столбики) в цитоплазме кардиомиоцитов, через 28 суток после операции и у интактных животных. # — p<0,05 для экспериментальных групп по сравнению с интактным контролем; * — p<0,05 для групп ИМ+ФР и ИМ+СМ по сравнению со своими ложнопериоперированными контролями; \$ — p<0,05 для групп ИМ+ФР и ИМ+СМ; & — p<0,05 для групп ЛО+ФР и ЛО+СМ

неизменным (рис. 2, б). Подобная несбалансированность клеточного роста ухудшала энергетическое обеспечение гипертрофированного сердца.

Курсовое введение пептида семакс в течение 1 недели после операции скорректировало течение процесса ремоделирования миокарда: в группе ИМ+СМ значения средней площади поперечного сечения рабочих кардиомиоцитов и относительного объема миофибрилл не отличались от группы ЛО+ФР и от интактного контроля (рис. 2, а и б). На фоне ложной операции семакс, напротив, спровоцировал развитие гипертрофии левого желудочка: в группе ЛО+СМ размер рабочих кардиомиоцитов увеличился на 26 %, с

ростом относительного объема миофибрилл на 15 % и уменьшением относительного объема митохондрий на 14 % по сравнению с группой ЛО+ФР (рис. 2, а и б).

72 часа после начала реперфузии, следующей за 2,5-часовой ишемией миокарда. Окрашивание с помощью ТТХ выявило, что через 72 часа после реперфузии зона некроза составила 14,2±2,9 % от объема левого желудочка сердца в группе И/Р+ФР и 13,0±3,4 % в группе И/Р+СМ. Гистологическое исследование миокарда левого желудочка в зоне риска в этот срок выявило на месте погибших кардиомиоцитов очаг воспаления, состоявший, главным образом, из фибробластов и макрофагов и лишь небольшого количества нейтро-

Значения регистрируемых параметров гемодинамики через 72 часа после начала реперфузии и у интактных животных

| Группа | Интактные | И/Р+ФР | И/Р+СМ |
|--------------------------|-----------------|----------------|------------------|
| АДсер., мм рт. ст. | 131,5±9,1 | 118,6±13,2 ↓ | 101,1±13,6 ↓ ↓ |
| ЧСС, уд/мин | 363,5±41,3 | 335,7±26,8 = | 268,8±19,9 ↓ ↓ |
| АДЛЖсер., мм рт. ст. | 91,3±8,1 | 88,5±11,3 = | 73,4±12,5 ↓ ↓ |
| АДЛЖсист., мм рт. ст. | 163,5±9,1 | 148,2±16,2 ↓ | 129,0±14,6 ↓ ↓ |
| АДЛЖдиас., мм рт. ст. | 3,7±1,2 | 11,0±2,6 ↑ | 9,5±2,0 ↑ |
| АДЛЖкдд., мм рт. ст. | 9,0±2,9 | 20,0±4,5 ↑ | 18,5±3,0 ↑ |
| + dP/dtmax, мм рт. ст./с | 10 660,9±1266,5 | 8079,4±580,3 ↓ | 7091,0±731,9 ↓ ↓ |
| - dP/dtmax, мм рт. ст./с | 12 290,2±2351,6 | 5806,5±598,6 ↓ | 4745,2±647,5 ↓ ↓ |

Примечание: ↓ ↑ — значимое (p<0,05) уменьшение и увеличение параметра в группах И/Р+ФР и И/Р+СМ по сравнению с интактными животными; ↓ ↓ — значимое уменьшение параметра в группе И/Р+СМ по сравнению с группой И/Р+ФР.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

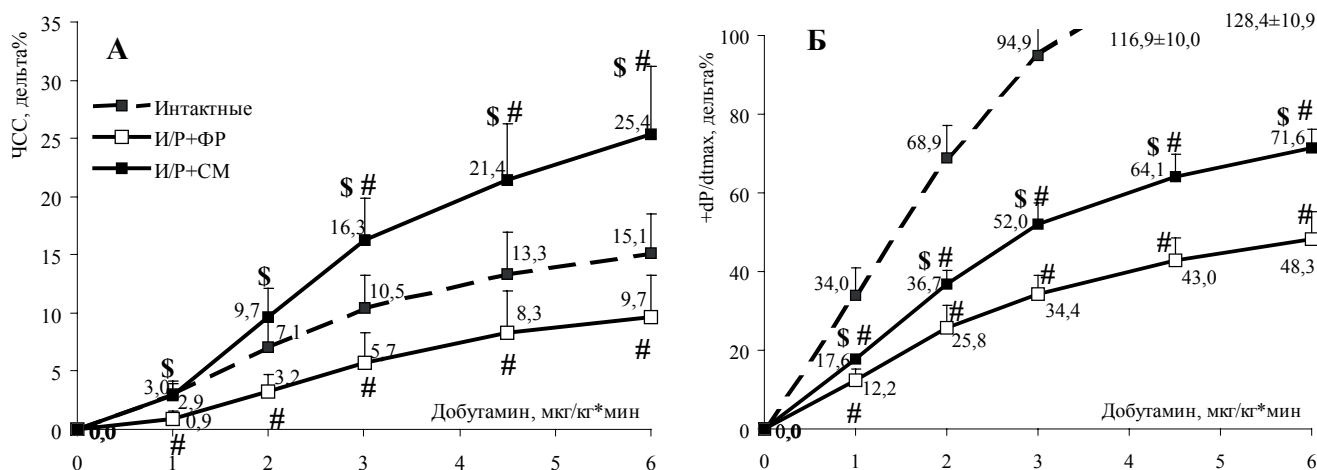


Рис. 3. а — изменение частоты сердечных сокращений (ЧСС) и б — максимальной скорости увеличения давления в левом желудочке (+dP/dtmax) в ответ на внутривенную инфузию агониста β_1 -адренорецепторов добутамина через 72 часа после начала реперфузии. Интактные животные — штрихованная линия, черные символы; И/Р+ФР — сплошная линия, белые символы; И/Р+СМ — сплошная линия, черные символы. # — $p < 0,05$ для групп И/Р+ФР и И/Р+СМ по сравнению с интактным контролем; \$ — $p < 0,05$ для групп И/Р+ФР и И/Р+СМ

филов, что характерно для поздней стадии острой воспалительной реакции (данные не показаны). Эти результаты косвенно свидетельствуют о том, что зона некроза в целом уже сформирована, что и обусловило выбор соответствующего срока исследования.

Через 72 часа после начала реперфузии у крыс в группе И/Р+ФР наблюдали значительное ухудшение насосной функции сердца: снижение +dP/dtmax на 24 %, пикового систолического и среднего артериального давления на 10 % сопровождалось увеличением давления наполнения левого желудочка на 11 мм рт. ст. (табл. 3). Полученные изменения косвенно свидетельствуют об уменьшении сердечного выброса пораженного сердца; характерны для данной модели и развиваются уже в течение первых часов после начала реперфузии [20].

Повреждение сердечной мышцы сопровождалось значительным снижением β_1 -опосредованного влияния на миокард. На рис. 3 (а и б) представлены ино- и хронотропные ответы сердца в ответ на инфузию возрастающих доз добутамина. Видно, что в зависимости от дозы препарата, прирост +dP/dtmax в группе И/Р+ФР был снижен на 20–80 %, а ЧСС — на 2–6 % по сравнению с интактным контролем. Нарушение хронотропного ответа позволяет предполагать развитие десенситизации или снижение числа β_1 -адренорецепторов миокарда, поскольку пейсмекерные клетки предсердия не были затронуты ишемией/реперфузией. Указанные нарушения характерны для развития инфаркта миокарда; их связывают с избыточной катехоламинергической стимуляцией рецепторов вследствие активации симпатической нервной системы после инфаркта [12, 19].

Прирост среднего артериального давления в ответ на инфузию фенилэфрина в группе И/Р+ФР также был снижен на 16–20 % по сравнению с интактными животными

и сопровождался меньшим — на 10–37 % — увеличением +dP/dtmax (рис. 4, а и б). Как видно на рис. 4, В, увеличение нормированного на прирост артериального давления индекса сократимости было одинаковым в контрольной инфарктной и в интактной группах на всех дозах препарата. Следовательно, снижение α_1 -опосредованного гипертензивного ответа после инфаркта было обусловлено, скорее, нарушением вазоконстрикции, а не насосной функции сердца. В отставленные после инфаркта сроки, подобные изменения связывают с процессами десенситизации α_1 -адренорецепторов гладкомышечных клеток сосудов [13, 27]. В нашем же случае нарушение α_1 -опосредованного прессорного ответа в группе И/Р+ФР могло быть обусловлено увеличенным тонусом гладких мышц сосудов после инфаркта вследствие активации симпатической нервной системы; поскольку увеличение симпатического тонуса и рост общего периферического сопротивления показано в литературе уже через несколько часов после повреждения миокарда [17, 20].

Применение семакса способствовало большей сохранности β_1 -опосредованных ответов миокарда после инфаркта: увеличило в группе И/Р+СМ максимальный инотропный ответ миокарда на 23 % и максимальный хронотропный ответ на 16 % по сравнению с контрольной инфарктной группой (рис. 3, а и б). Семакс также полностью нормализовал констрикторный ответ сосудистого русла, увеличив α_1 -опосредованный прессорный ответ у инфарктных животных до уровня интактного контроля (рис. 4, а), что сопровождалось адекватным увеличением инотропного ответа миокарда (рис. 4, б). Гемодинамические измерения в покое показали, что в группе И/Р+СМ все регистрируемые параметры системной и левожелудочковой гемодинамики (кроме АДЛЖдиас. и АДЛЖкд.) были сни-

жены не только по сравнению с интактными животными, но и по сравнению с контрольной инфарктной группой И/Р+ФР (табл. 3). Эффект пептида составил 12–18 %, что является физиологически значимым изменением.

Предлагаемая концепция влияния семакса на сердце: кардиопротекторное действие пептида реализуется, скорее, на системном, чем на тканевом уровне. Применение семакса оказало ярко выраженный кардиопротекторный эффект в условиях острой ишемии миокарда, улучшив сохранность ультраструктуры кардиомиоцитов через 2,5 часа после окклюзии, что согласуется с эффективностью раннего применения пептида при фокальных инсультах [4]. Однако тот факт, что пептид не уменьшил размер рубцовой ткани через 28 суток после операции, свидетельствует о том, что семакс отставил во времени появление патологических нарушений в ультраструктуре ишемизированных кардиомиоцитов, но в итоге не оказал влияния на объем клеточной гибели в зоне ишемии. Применение пептида оказалось неэффективным и в отношении снижения объема инфаркта в условиях ишемии/реперфузии миокарда. Поскольку воспалительный процесс является важным медиатором развития ишемического и реперфузионного повреждения миокарда, то противовоспалительная терапия, как правило, эффективна в отношении уменьшения объема поражения в условиях как необратимой ишемии миокарда, так и при реперфузии [11, 24]. Активация процесса воспаления неизбежна в условиях необратимой ишемии миокарда; в случае же восстановления кровотока, вовлечение реакций воспаления во многом зависит от длительности предшествующей ишемии. Учитывая, что в миокарде крысы 45-минутной ишемии было достаточно для развития постреперфузионного синдрома «no reflow» [14], в развитии которого ключевую роль играет активация нейтрофилов в зоне риска [23]; то проведение реперфузии через 2 часа 30 минут от начала ишемии позволяет с уверенностью говорить о вовлечении воспалительного процесса в реперфузионное повреждение миокарда в нашей модели. Следовательно, тот факт, что применение семакса не оказало влияния на размер инфаркта в обеих экспериментальных моделях, дает основание полагать, что противовоспалительный эффект семакса специфичен в отношении мозга [4, 5] и не реализуется в миокарде. Вместе с тем, вне зависимости от используемой модели повреждения миокарда, семакс оказал ярко выраженный устойчивый защитный эффект в отношении сохранного после инфаркта миокарда левого желудочка. Применение пептида в острую фазу развития ишемии значительно увеличило сократительный потенциал пораженного сердца через 72 часа после начала реперфузии; скорректировало течение процесса ремоделирования миокарда левого желудочка в оставленный постинфарктный период — предотвратило развитие гипертрофии рабочих кардиомиоцитов и несбалансированность клеточного роста. Таким обра-

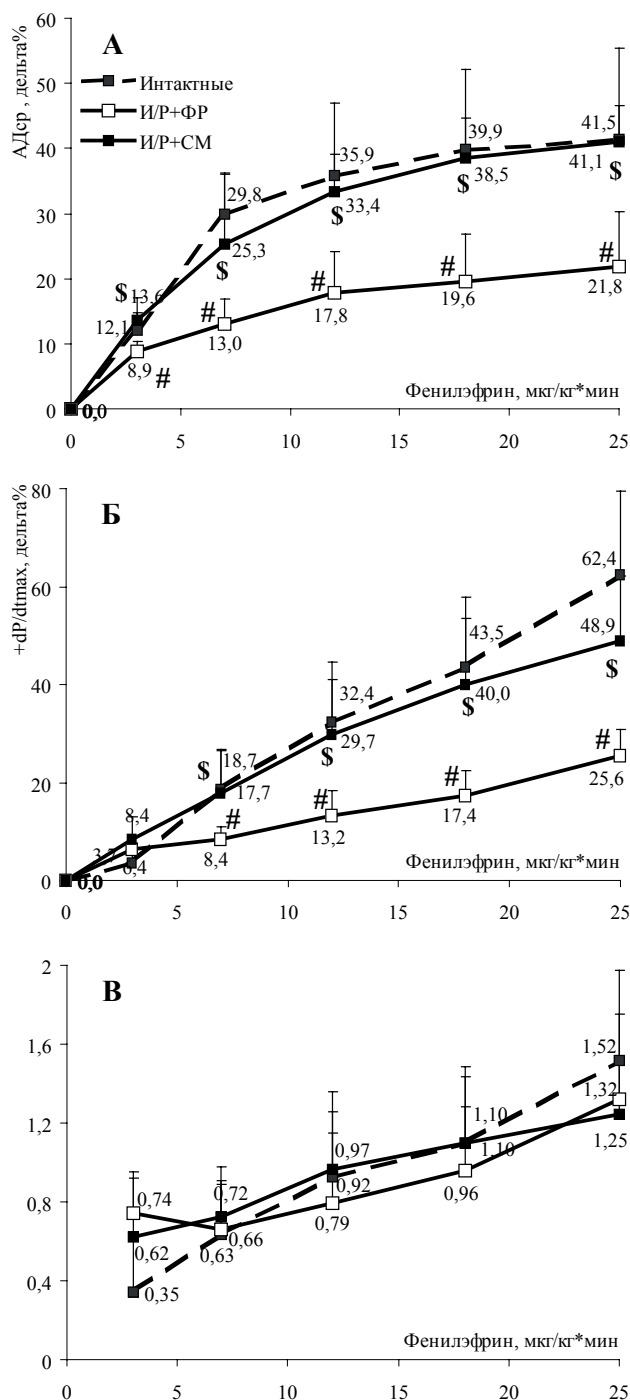


Рис. 4. а — изменение среднего артериального давления (АДср.) и б — максимальной скорости увеличения давления в левом желудочке (+dP/dtmax) в ответ на внутривенную инфузию агониста α1-адренорецепторов фенилэфрина через 72 часа после начала реперфузии; в — увеличение сократительной активности миокарда (+dP/dtmax в Δ%) в ответ на каждую дозу фенилэфрина пронормировали на соответствующее увеличение среднего артериального давления (АДср. в Δ%). Интактные животные — штриховая линия, черные символы; И/Р+ФР — сплошная линия, белые символы; И/Р+СМ — сплошная линия, черные символы. # — p<0,05 для групп И/Р+ФР и И/Р+СМ по сравнению с интактным контролем; \$ — p<0,05 для групп И/Р+ФР и И/Р+СМ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

зом, Семакс, не влияя на объем поражения сердечной мышцы, обеспечил большую сохранность структуры и функции выжившего после инфаркта миокарда.

Опираясь на полученные результаты, мы предположили влияние пептида на нервную регуляцию работы сердца. Через 72 часа после начала реперфузии на фоне применения пептида в покое наблюдали урежение сердечного ритма и снижение сократительной активности миокарда. Поскольку при этом семакс не вызвал увеличения объема инфаркта и улучшил сохранность сократительного потенциала сердца, мы не можем утверждать, что полученный эффект пептида был обусловлен ухудшением состояния миокарда на структурном или функциональном уровнях. С другой стороны, наблюдаемые брадикардия и снижение скорости сокращения кардиомиоцитов, в совокупности с уменьшенной постнагрузкой на сердце вследствие пониженного системного артериального давления, должны были уменьшать потребность сердечной мышцы в кислороде и энергетические затраты клеток миокарда после инфаркта; что и могло обусловить наблюдаемые эффекты пептида — отставленное во времени накопление ультраструктурных нарушений и увеличенный сократительный потенциал миокарда в острый постинфарктный период; сохранность размеров и структуры кардиомиоцитов через 28 суток после инфаркта.

Известно, что повреждение миокарда при инфаркте провоцирует длительную активацию симпатической нервной системы [15, 17, 21], что является дополнительным повреждающим фактором для сердца, поскольку катехоламининдуцированный сократительный и энергетический стресс провоцирует некротическую и апоптотическую гибель кардиомиоцитов, усугубляет развитие гипертрофии и нарушение насосной функции сердца [22, 25, 26]. Исходя из этих представлений, вероятно, что модуляторное влияние семакса на работу сердца было реализовано через сдерживание гиперактивации симпатической нервной системы после инфаркта. В пользу этой гипотезы логично говорит тот факт, что применение пептида у инфарктных животных нормализовало α_1 -опосредованный прессорный

ответ, нарушение которого связывают с избыточным увеличением симпатического тонуса в условиях инфаркта миокарда. Примечательно, что кажущийся на первый взгляд странным эффект пептида в отношении морфологии миокарда в группе ЛО+СМ через 28 суток после операции согласуется с выдвинутой нами гипотезой о проявлении адаптивных свойств пептида в условиях увеличенного симпатического тонуса. Применение семакса на фоне ложной операции вызвало в миокарде структурные изменения (гипертрофия, увеличение относительного объема миофибрилл) той же направленности, что и в группе ИМ+ФР. Однако, как показали гемодинамические измерения (данные опубликованы в [2]), развившаяся гипертрофия носила адаптивный характер, поскольку в группе ЛО+СМ сердце максимально эффективно работало в условиях повышенной постнагрузки по сравнению с остальными экспериментальными группами, включая ложнооперированных животных, не получавших препарат. Ложная операция могла сопровождаться кратковременным увеличением симпатического тонуса в результате активации стрессорной реакции вследствие образования постоперационного пневмоторакса, временного циркуляторного коллапса и остановки дыхания. Применение семакса в этих условиях спровоцировало развитие в миокарде ложнооперированных животных адаптивных структурных изменений, обнаруженных в отставленный после операции период. Аналогично, в условиях стрессорных ситуаций у людей семакс проявлял ноотропные свойства [1].

Суммируя сказанное, можно заключить, что пептидный препарат семакс оказался неэффективным в отношении защиты сердца от собственно ишемического и реперфузионного повреждения; однако семакс оказал устойчивый защитный эффект на сохраненный после инфаркта миокард левого желудочка в острый и отставленный постинфарктный периоды. Кардиопротекторное действие пептида могло реализовываться через снижение токсического действия симпатической нервной системы на сердечно-сосудистую систему после инфаркта.

Литература

1. Ашмарин, И. П. Ноотропный аналог адренкортикотропина 4-10 — Семакс : 15-летний опыт разработки и изучения / И. П. Ашмарин // Журн. высшей нервной деятельности. — 1997. — № 47 (2). — С. 420–430.
2. Гаврилова, С. А. Протекторное влияние пептида Семакс на процессы ремоделирования миокарда и развитие сердечной недостаточности у крыс в отставленный постинфарктный период / С. А. Гаврилова [и др.] // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. — 2006. — № 92 (11). — С. 1305–1321.
3. Голубева, А. В. Защитное действие пептида Семакс в острую стадию инфаркта миокарда крыс / А. В. Голубева [и др.] // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. — 2006. — № 92 (6). — С. 732–745.

4. Гусев, Е. И. Ишемия головного мозга / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова. — М., 2001.
5. Скворцова, В. И. Клинико-иммунобиохимический мониторинг факторов локального воспаления в остром периоде полушарного ишемического инсульта / В. И. Скворцова [и др.] // Журн. неврол. психиатр. им. С. С. Корсакова. — 1999. — № 99 (5). — С. 27–31.
6. Фадюкова, О. Е. Семакс предупреждает повышение генерации оксида азота в мозге крыс, обусловленное неполной глобальной ишемией / О. Е. Фадюкова [и др.] // Эксперимент. клин. фармакол. — 2001. — № 64 (2). — С. 31–34.
7. Шаров, В. Г. Ультраструктура поврежденного кардиомиоцита / В. Г. Шаров [и др.] // Ультраструктура

сердца. — Ташкент, 1988. — № 7. — С. 53–69.

8. Яковлева, Е. В. Исследование эффективности се-макса при глобальной ишемии мозга *in vivo* / Е. В. Яковлева [и др.] // Бюлл. экпер. биол. мед. — 1999. — № 127 (8). — С. 172–174.

9. Ambrosio, G. Myocardial reperfusion injury / G. Ambrosio, I. Tritto // *Eur. Heart J. Suppl.* — 2002. — № 4. — Suppl. B. — P. B28–B30.

10. Anversa, P. Morphometric analysis of the infarcted heart / P. Anversa [et al] // *Pathol. Res. Pract.* — 1989. — № 185 (5). — P. 544–550.

11. Bonvini, R. F. Inflammatory response post-myocardial infarction and reperfusion : a new therapeutic target? / R. F. Bonvini, T. Hendiri, E. Camenzind // *Eur. Heart. J. Suppl.* — 2005. — № 7. — Suppl. I). — P. 27–36.

12. Chakraborti, S. β -Adrenergic mechanisms in cardiac diseases : a perspective / S. Chakraborti, T. Chakraborti, G. Shaw // *Cell. Signal.* — 2000. — № 12. — P. 499–513.

13. Feng, Q. P. Decreased responsiveness of vascular postjunctional $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -adrenoceptors and neuropeptide Y1 receptors in rats with heart failure / Q. P. Feng [et al] // *Acta Physiol. Scand.* — 1999. — № 166. — P. 285–291.

14. Fliss, H. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium / H. Fliss, D. Gattinger // *Circ. Res.* — 1996. — № 79. — P. 949–956.

15. Graham, L. N. Time course of sympathetic neural hyperactivity after uncomplicated acute myocardial infarction / L. N. Graham [et al] // *Circulation.* — 2002. — № 106. — P. 793–797.

16. Heyndrickx G. R. Early reperfusion phenomena / G. R. Heyndrickx // *Semin. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* — 2006. — № 10. — P. 236–241.

17. Jardine, D. L. Increased cardiac sympathetic nerve activity following acute myocardial infarction in a sheep model / D. L. Jardine [et al] // *J. Physiol.* — 2005. — № 565. — P. 325–333.

18. Kajstura, J. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats / J. Kajstura

[et al] // *Lab. Invest.* — 1996. — № 74 (1). — P. 86–107.

19. Kompa, A. R. Desensitization of cardiac β -adrenoceptor signalling with heart failure produced by myocardial infarction in the rat. Evidence for the role of Gi but not Gs or phosphorylating proteins / A. R. Kompa [et al] // *J. Moll. Cell. Cardiol.* — 1999. — № 31(6). — P. 1185–1201.

20. Liu, P. Age-related difference in myocardial function and inflammation in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion / P. Liu [et al] // *Cardiovasc. Res.* — 2002. — № 56 (3). — P. 443–453.

21. Malliani, A. Emerging excitatory role of cardiovascular sympathetic afferents in pathophysiological conditions / A. Malliani, N. Montano // *Hypertension.* — 2002. — № 39. — P. 63–68.

22. Osadchii, O. E. Cardiac dilatation and pump dysfunction without intrinsic myocardial systolic failure following chronic β -adrenoreceptor activation / O. E. Osadchii [et al] // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* — 2007. — № 292. — P. 1898–1905.

23. Rezkalla, S. H. No-reflow phenomenon / S. H. Rezkalla, R. A. Kloner // *Circulation.* — 2002. — № 105. — P. 656–662.

24. Saito, T. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in acute myocardial infarction : cellular expression and use of selective COX-2 inhibitor / T. Saito [et al] // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* — 2003. — № 81 (2). — P. 114–119.

25. Shizukuda, Y. β -Adrenergic stimulation causes cardiocyte apoptosis : influence of tachycardia and hypertrophy / Y. Shizukuda [et al] // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* — 1998. — № 275. — P. 961–968.

26. Smith, J. M. Effect of massive sympathetic nervous system activation on coronary blood flow and myocardial energy pool / J. M. Smith, C. F. Pilati // *Exp. Biol. Med.* — 2002. — № 227 (2). — P. 125–132.

27. Stassen, F. R. Reduced responsiveness of rat mesenteric resistance artery smooth muscle to phenylephrine and calcium following myocardial infarction / F. R. Stassen // *Br. J. Pharmacol.* — 1997. — № 120 (8). — P. 1505–1512.