МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова

на правах рукописи

Гаврилова Светлана Анатольевна

Ключевые механизмы защиты мозга и сердца от ишемического повреждения

Специальности: 03.03.01– физиология
03.03.04. – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена на кафедре физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова

Научные консультанты	–	Кошелев Владимир Борисович, доктор биологических наук, профессор
		Буравков Сергей Валентинович, доктор медицинских наук
Официальные оппоненты	–	Галагудза Михаил Михайлович, доктор медицинских наук, чл.-корр. РАН, Институт экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В.А.Алмазова» Минздрава России, директор
		Хаспеков Леонид Георгиевич, доктор биологических наук, ФГБНУ «Научный центр неврологии», Отдел исследования мозга, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией экспериментальной нейроцитологии
		Цорин Иосиф Борисович, доктор биологических наук, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, лаборатория фармакологического скрининга, ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится «21» декабря 2020 г. в 15.30 на заседании диссертационного совета МГУ.03.06 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, МГУ, биологический факультет, ауд. М-1.

E-mail: bellaum@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27). Со сведениями о регистрации участия в защите в удаленном интерактивном режиме и с диссертацией в электронном виде также можно ознакомиться на сайте ИАС «Истина»: https://istina.msu.ru/dissertations/253150120/

Автореферат разослан «20» октября 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Б.А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Актуальность исследования определена распространенностью, высокой смертностью и инвалидизацией людей, перенесших инсульт или инфаркт миокарда. С 2005 по 2015 год в нашей стране общая заболеваемость ишемической болезнью сердца (ИБС) возросла на 13 % (Богачевская, С. А. и др., 2015). Смертность от инфаркта миокарда при первом эпизоде составляет 13-15 %, и 40 % из этих больных погибают в первые сутки заболевания. В 2014 году от сердечно-сосудистых осложнений в России умерло 64548 человек (Бунова С.С. и др., 2014). На втором месте среди всех причин смерти населения России стоят сосудистые заболевания головного мозга – 374 на 100 тысяч населения. 30-дневная летальность при остром нарушении мозгового кровообращения составляет 32–42 %, в течение года достигает 48–63 %, до 80 % выживших пациентов становятся инвалидами (Стародубцева О.С. и др., 2012). В США 795 тысяч человек в год, или каждые 40 секунд один человек, испытывали сердечный приступ или инсульт (Benjamin et al., 2017). Статистика других развитых стран показывает аналогичные проблемы.

После 60 лет возрастает риск сочетанной патологии, в которой преобладает симптоматика неврологических нарушений, маскирующая признаки инфаркта миокарда. Смертность таких больных достигает 72 %. (Чичкова М.А. и др., 2016; Фонякин, А. В., 2009). При инфаркте миокарда наблюдается выраженная гипоксия органов и тканей (Левина Е.М. и др., 2008), при инфаркте мозга - реакция Кушинга. Оба механизма приводят к взаимной стимуляции работы этих органов, к активации стресс-реакции (Zhang D.Y., Anderson A.S., 2014) и дополнительному повреждению. При возникновении одного из заболеваний и сердце, и мозг нуждаются в защите.

Еще в 1985 году Braunwald E. и Kloner R.A. задали вопрос: «Реперфузия миокарда – это палка о двух концах?», ответ на который до сих пор не получен (Braunwald E., Kloner R.A., 1985, «Myocardial reperfusion: a double-edged sword?»). Реперфузия является приоритетной стратегией борьбы против ишемического повреждения: снижает его размер, смертность и т.д., однако в то же время формирует реперфузионное повреждение.

Ишемически-реперфузионное повреждение включает в себя комплекс молекулярных изменений в клетке (Janovic A., 2018; Sprick J.D. et al., 2019; Barzic A. et al., 2020): потеря энергии, нарушение ионного транспорта в цитоплазматической мембране, накопление ионов Ca^{2+}, запуск кальций-зависимых внутриклеточных каскадов (Murphy E., Steenbergen C., 2008), образование активных форм кислорода (Korge P. et al., 2017), формирование провоспалительного ответа ткани на повреждение, прежде всего, синтез цитокинов (Chen Y. et al., 2016), окислительный стресс и т.д. В конце концов, когда клетка и ее компартменты, в первую очередь митохондрии, не справляются с нарушениями, открываются митохондриальные поры, митохондрии высвобождают факторы, запускающие разные механизмы гибели клетки (Halestrap A.P. et al., 2004; Kalogeris T. et al., 2016), и качеству митохондрий отводится ключевая роль в выживаемости клеток (Eltzschig HK et al., 2020).

Есть несколько направлений дискуссии об ишемическом и реперфузионном повреждении: 1) целесообразность проведения реперфузии в связи с возможностью злокачественных, опасных для жизни осложнений или результаты реперфузии сравнимы с естественным заживлением ткани (Bath P.M. et al., 2019); 2) хороший результат в

эксперименте по ключевым механизмам реперфузионного повреждения и неэффективность терапии в клинической практике (O'Collins V.E. et al., 2006; del Zoppo G.J., 2010; Shirley R. et al., 2014; Баязитова В.А., Шарфеев А.З., 2015; Wiendl H. et al., 2015; Moretti A. et al., 2015; Kanazawa M. et al., 2017; Bath P.M. et al., 2019); 3) разработка новых подходов для снижения реперфузионного повреждения клеток (Janovic A., 2018; Sprick J.D. et al., 2019; Barzic A. et al., 2020); 4) прямо не относящееся к нашему исследованию быстро развивающееся направление – использование клеточных и генных технологий для улучшения регенеративного потенциала и управляемого ремоделирования ткани при повреждении (Terzic A et al., 2015; Makarevich P.I. et al., 2017; Nimiritsky P.P et al., 2019; Suman S. Et al., 2020).

В конечном счете авторы сходятся во мнении, что ишемическое и реперфузионное повреждение опосредуется множественными механизмами и мишенями, а попытка разработки защитных стратегий только по одному из ключевых звеньев к положительному результату не приводит, поэтому необходимо использовать подходы, влияющие на весь спектр нарушений.

Прекондиционирование - феномен повышения устойчивости мозга или сердца к ишемии или гипоксии в результате предварительного действия повреждающих стимулов около-пороговой силы разной природы: гипотермия (Маслов Л.Н. и др., 2012), импульсное воздействие ишемией и реперфузией (Шмонин А.А., 2011) или другие неспецифические воздействия. Кажется, что прекондиционирование применимо только в условиях, когда ишемию можно прогнозировать: операции с использованием искусственного кровообращения или вскрытием грудной клетки; операции на мозге по удалению опухолей или др.; трансплантация органов и тканей; условия труда в среде с пониженным содержанием кислорода; огромные физические нагрузки – орган или организм можно подготовить к предстоящей ишемии. Однако высоко интенсивные физические тренировки повышают устойчивость сердца и мозга к ишемии и реперфузии (Sakakima H., 2019; Rames M. et al., 2020). Хочется думать, что разнообразный и активный образ жизни делает нас более толерантными к ишемии и гипоксии.

Различают гипоксическое (Агаджанян Н.А. и др., 1973, Кошелев В.Б. и др., 1987, Miller B.A. et al., 2001, Баутин А.Е. и др., 2016), ишемическое (Шляхто Е.В, и др., 2008) и дистантное (Петрищев Н.Н. и др., 2006; Rybnikova et al., 2015; Y. Wang et al., 2015) прекондиционирование. В первом случае его проводят короткими эпизодами нормобарической или барокамерной гипоксии всего организма, во втором предварительной ишемии подвергается сам орган, в третьем – орган или органы, удаленные от адресного объекта. Недавно обнаружен феномен посткондиционирования, при котором ослабление эффекта ишемии наблюдают при воздействии короткими эпизодами ишемии-реперфузии уже после свершившейся реперфузии (Zhao Z.Q. et al., 2003; Zhao H. et al., 2006; Шляхто Е.В., 2008). Импульсные воздействия – чередование ишемии или гипоксии с восстановлением нормоксии или отменой ишемии – наиболее эффективны при любом виде кондиционирования.

Во время эпизодов ишемии или гипоксии оксид азота, активные формы кислорода, недостаток O_2 активируют траскрипционные факторы Nrf2 и HIF-1. Активация Nrf2 приводит к синтезу белков антиоксидантной, противовоспалительной, цитопротекторной защиты (Bouvier et al., 2017; Sprick et al., 2019). Активация HIF-1 вызывает экспрессию спектра белков, которые в совокупности обеспечивают устойчивость нервных клеток к гипоксии и ишемии (Leconte et al., 2009; Wu J. et al., 2013; Sprick et al., 2019).

Особую роль в прекондиционировании играют оксид азот и $K^+_{АТФ}$-каналы. Умеренная активация системы оксида азота во время прекондиционирования включена в систему ферментов антиоксидантной защиты клетки, а также продукции антиапоптотических белков. Оксид азота расширяет сосуды и улучшает кровоснабжение ткани, он может депонироваться и использоваться в условиях нехватки кислорода (Manukhina E.B. et al., 2006; Hossmann K.A., 2006; Schulz and Ferdinandy, 2013; Mallet R.T. et al., 2018). К+АТФ-каналы на внешних мембранах клеток включены в сопряжение метаболической активности клетки и ее мембранного потенциала, они участвуют в общеорганизменных процессах, таких как регуляция уровня глюкозы в крови (Tinker A et al., 2018). К+АТФ-каналы внутренней мембраны митохондрий изучают в связи с механизмами прекондиционирования (Tinker A et al., 2018): оценивают их влияние на метаболическую активность митохондрий (Lim K.H. et al., 2002), на предотвращение кальциевой перегрузки (Murata M. et al., 2001; Kim M.Y. et al., 2006) и продукцию активных форм кислорода (O'Rourke B., 2000; Vanden Hoek T.L. et al., 1998). На внутренней мембране митохондрий локализована NO-синтаза (Ghafourifar P. et al., 1997), нитритредуктазной активностью обладает цитохром С оксидаза митохондрий (Kozlov A.V. et al., 1999; Реутов В.П. и др., 1998). Защитное действие умеренной продукции NO во время прекондиционирования может реализовываться через активацию К+АТФ-каналов. Показано, что NO через цГМФ-зависимые протеинкиназы фосфорилирует и открывает К+АТФ-каналы (Manukhina E.B. et al., 2006). По результатам исследования Sasaki N. et al., (2000 г.) активация К+АТФ-каналов оксидом азота не связана с цГМФ. В этом случае открытие К+АТФ-каналов возможно через прямое S-нитрозилирование и снижение чувствительности канала к АТФ. Вопрос взаимодействия системы оксида азота и К+АТФ-каналов не изучен и нам представляется очень интересным с фундаментальной точки зрения и перспективным в плане создания фармакологической терапии.

При внимательном рассмотрении видно, что вопрос о механизмах ишемического повреждения жизненно важных органов оказывается недостаточно изученным: в литературных источниках есть разрыв между разработкой современнейших кардио- и нейропротекторных технологий и пониманием фундаментальных механизмов развития повреждения клеток и ткани при ишемии и ишемии-реперфузии. Возможно, такая ситуация обусловлена приоритетным выбором реперфузионных мероприятий в клинике (Eltzschig H.K. et al., 2011; Kalogeris T., 2017; Barzic A., et al., 2020) и объединением всего процесса в ишемически-реперфузионное повреждение. Ишемия витальных органов сопровождается стресс реакцией, активацией симпатического отдела нервной системы в сердце или выбросом возбуждающих аминокислот и эксайтотоксичностью в мозге (Гусев Н.Б., 2001; Heusch G., 2008; Zhang D.Y., Anderson A.S., 2014), что разрушительно для ишемизированной ткани и не может не откладывать отпечаток на течение реперфузии.

В 2006 году мы впервые опубликовали работы о кардиопротекторном действии пептида Семакс (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) – фрагмента АКТГ(4-7), стабилизированного с С-конца последовательностью Pro-Gly-Pro (Голубева А.В. и др., 2006; Гаврилова С.А. и др., 2006). В настоящее время мы уверены, что Семакс оказывает кардиопротекторное действие через сдерживание гиперактивации симпатического отдела нервной системы. Семакс был создан в результате многолетнего направленного поиска усилиями коллектива Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова под руководством профессора И.П. Ашмарина и коллектива Института Молекулярной генетики РАН под руководством академика Н.Ф. Мясоедова. Препарат сохранил все негормональные свойства АКТГ. В клинике его используют для лечения инсульта и для

улучшения мозговой деятельности (Ашмарин и др., 1980; Ашмарин И.П. и др., 1997). Исследование изменения транскиптома при фокальной ишемии мозга показали, что Семакс влияет на транскрипцию спектра генов, определяющих иммунный ответ и меняющих функцию сердечно-сосудистой системы, на дифференцировку и миграцию эндотелиальных клеток, миграцию гладкомышечных клеток, кроветворение и васкулогенез (Медведева Е.В., 2014), т.е., на все ключевые звенья развития ишемического повреждения как в мозге, так и в сердце. В контексте настоящего исследования Семакс изучали не только как кардиопротекторный препарат, но и как возможный инструмент для анализа особенностей ишемического повреждения ткани и участие в этих процессах нервной системы.

Таким образом, актуальность исследования определена распространенностью, смертностью, инвалидизацией людей с ишемическим поражением жизненно необходимых органов – сердца и мозга, и отсутствием полноценной терапии этих заболеваний. В исследовании рассмотрены разные подходы коррекции ишемического поражения, в том числе изучение взаимодействия системы оксида азота и $K^+_{АТФ}$-каналов при предварительном кондиционировании и особенностейи развития ишемического поражения ткани при сдерживании гиперактивации симпатического отдела нервной системы с помощью Семакса, примененного в острую стадию ишемии. Результаты исследования важны для фундаментальной науки и для разработки новых фармакологических и терапевтических подходов лечения пациентов с ишемическими поражениями жизненно важных органов.

Цель: исследовать механизмы защиты мозга и сердца от ишемического повреждения, активирующиеся эндогенно вследствие прекондиционирования или с помощью фармакологического воздействия пептидом Семакс (АКТГ4-7PGP).

Задачи:

1. Оценить участие $K^+_{АТФ}$-каналов в развитии инфаркта мозга у крыс с использованием неселективного блокатора глибенкламида.
2. Исследовать роль плазматических и митохондриальных $K^+_{АТФ}$-каналов в развитии ишемического прекондиционирования с использованием активаторов и ингибиторов этих каналов.
3. Оценить экспрессию белка митохондриальных $K^+_{АТФ}$-каналов (KCNJ1), индуцибельной и нейрональной изоформ NO-синтаз (iNOS, nNOS), а также экспрессию белка цитохром с-оксидазы (COX1), сукцинатдегидрогеназы (SDHA) в отсроченную фазу ишемического прекондиционирования.
4. Охарактеризовать морфологические и функциональные изменения в миокарде крысы через 2,5 часа от начала ишемии.
5. На морфологическом и функциональном уровне исследовать особенности развития повреждения сердца в условиях необратимой ишемии и 2,5 часовой ишемии с последующей реперфузией.
6. Исследовать влияние Семакса на развитие ишемического и реперфузионного повреждения сердца.
7. Исследовать роль NO-эргической системы в условиях ишемического прекондиционирования мозга и при развитии ишемического и реперфузионного повреждения сердца.

Научная новизна исследования

В настоящей работе изучены воздействия на разные звенья ишемического каскада: активация собственных защитных механизмов клетки в результате предварительного ишемического прекондиционирования и механизмы влияния пептида Семакс, производного эндогенного регулятора АКТГ(4-10)PGP.

На модели ишемического инсульта у крыс впервые проведено комплексное многоуровневое исследование, с использованием физиологических, морфологических, молекулярно-биологических методов, роли $K^+_{АТФ}$-каналов и системы NO в реализации отсроченной фазы ишемического прекондиционирования. С помощью ингибиторов и активаторов $K^+_{АТФ}$-каналов впервые установлена ключевая роль митохондриальной изоформы $K^+_{АТФ}$-каналов в этом процессе. Показано, $K^+_{АТФ}$-каналы не влияют на развитие ишемического инсульта, а для эффективного влияния прекондиционирования на развитие ишемического каскада необходима структурная перестройка во внутренней мембране митохондрий. Установлено, что активация $K^+_{АТФ}$-каналов во время предварительной ишемической тренировки мозга путем попеременного пережатия сонных артерий (пять эпизодов по пять минут) через сутки приводит к структурным изменениям на внутренней мембране митохондрий: снижается плотность $K^+_{АТФ}$-каналов и увеличивается плотность цитохром с-оксидазы без изменения плотности сукцинатдегидрогеназы. Обнаружено, что плотность митохондриальной и нейрональной изоформ NO-синтаз на момент реализации защитного эффекта прекондиционирования не изменяется. Впервые методом ЭПР показано, что при ишемии продукция оксида азота уменьшается, снижается уровень нитрозилирования и нитрования белков, активация $K^+_{АТФ}$-каналов в режиме прекондиционирования еще больше снижает продукцию оксида азота и его эффекты. Получены оригинальные данные, указывающие на то, что структурная реорганизация внутренней мембраны митохондрий приводит к уменьшению размера некроза при ишемическом инсульте, активаторы $K^+_{АТФ}$-каналов повторяют, а ингибитор отменяет защитный эффект прекондиционирования, прекондиционирование оказывает защитный эффект путем снижения гибели нейронов и не влияет на глиоз. Впервые описана динамика изменения концентрации NO в комплексе с R- и T-конформерами гемоглобина и изменение концентрации нитритов и нитратов в крови во время развития ишемии.

На моделях ишемии и ишемии-реперфузии миокарда крысы впервые, с использованием физиологических, морфологических, биохимических методов, проведено комплексное исследование механизмов действия нейропротекторного пептида Семакс, фрагмента природного АКТГ (4-7)PGP, на развитие ишемического каскада. Показано, что через 2,5 часа от начала ишемии нет признаков необратимой гибели клеток. Были выявлены изменения митохондриального аппарата клетки, характерные для метаболических нарушений, и состояния хроматина до характерного для начальных стадий апоптоза, причем при нарастании диастолического давления в левом желудочке сердца его функциональная активность сохранялась. Обнаружено, что Семакс оказывает кардиопротекторное действие, защищая выжившие кардиомиоциты после ишемии и ишемии-реперфузии, и не влияет на размер очага некроза или рубца. Показано, что эффекты Семакса, примененного в острый период развития инфаркта миокарда, связаны со сдерживанием повышения концентрации норадреналина в крови и роста метаболитов оксида азота (нитритов и нитратов) в крови и моче крыс. Такой эффект сопровождается снижением уровня апоптоза в клетках всех отделов левого желудочка в острый срок и уменьшением гипертрофии кардиомиоцитов в отставленный срок развития инфаркта миокарда. Впервые установлено, что основное действие Семакса заключается в его влиянии на состояние митохондрий и сократительного аппарата клетки: электронно-микроскопические исследования показали, что Семакс препятствует развитию нарушений митохондрий и ядер кардиомиоцитов в острый период, сохраняет соотношение объемных плотностей миофибрилл и митохондрий на уровне, близком к интактному контролю на стадии завершения формирования рубца, и влияет на число межмитохондриальных

контактов, отражающее уровень функциональной нагрузки на кардиомиоциты. Впервые показано, что у животных, получавших Семакс, через трое суток после инфаркта в покое под наркозом снижены ЧСС, диастолическое давление в левом желудочке, а у животных с реперфузией – и индексы сократимости и расслабления; сердце таких животных эффективнее отвечает на функциональную нагрузку инфузией агониста β1-адренорецепторов, добутамина, за счет увеличения силы сокращения на единицу здоровой ткани и большей реакцией ЧСС.

Теоретическая и практическая значимость работы

В настоящей работе впервые проведено комплексное многоуровневое исследование новых механизмов защиты мозга и сердца от ишемического повреждения. Впервые показано, что защитные эффекты ишемического прекондиционирования опосредованы митохондриальными $K^+_{АТФ}$-каналами. Открытие $K^+_{АТФ}$-каналов изменяет ионный состав матрикса митохондрий и запускает внутриклеточные каскады реакций, приводящих к структурным перестройкам внутренней мембраны митохондрий. Впервые обнаружено, что на момент реализации эффекта прекондиционирования в митохондрии плотность цитохром с-оксидазы возрастает, а митохондриальных $K^+_{АТФ}$-каналов снижается, уменьшается активность NO-эргической системы. Такая структурная перестройка способна обеспечить стабильность митохондриального потенциала, обеспечить дополнительные места акцептирования кислорода и повышение к нему чувствительности цитохром с-оксидазы, что, безусловно, расширяет наши представления о регуляции энергетического обмена клетки в условиях ишемии. Собранные нами данные создают основу дальнейших исследований, направленных на определение главных участников активации экспрессии ключевых молекул энергетического метаболизма митохондрий в ответ на усиление генерации активных форм кислорода и NO во время ишемической интервальной тренировки – построения контуров обратной связи. Развитие этой темы может привести к созданию новых фармакологических средств и подходов, защищающих клетки от ишемического повреждения.

Нами впервые показано, что пептидный препарат Семакс (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro), фрагмент природного АКТГ(4-7), стабилизированный последовательностью Pro-Gly-Pro, успешно используемый в клинике при терапии ишемического инсульта (Гусев Н.И., Скворцова В.И., 2001), применим для защиты сердца в условиях ишемии. Семакс, примененный в острую стадию развития инфаркта миокарда, оказывает кардиопротекторное действие на области сердца, прямо не поврежденные ишемией. Как правило, пептидные препараты, созданные на основе природных регуляторов, демонстрируют множественность эффектов. Нами обнаружен один из главных механизмов действия Семакса при ишемии и ишемии-реперфузии миокарда – сдерживание гиперактивации симпатического отдела нервной системы. В этом случае действие пептида обусловлено снижением выраженности стресс-реакции, а на уровне клеток – уменьшением кальциевой перегрузки. Действие пептида проявляется увеличением сохранности энергетического баланса клеток в острой стадии развития инфаркта и характеризуется благоприятным ремоделированием: снижением гибели клеток, сдерживанием гипертрофии кардиомиоцитов за счет уменьшения гипертрофии сократительного аппарата и увеличения кооперации митохондрий. Эти изменения способствуют лучшей сохранности функций сердца. Результаты исследования развивают новое направление, связанное с изучением тонких механизмов влияния пептида на энергетический обмен клеток при инфаркте. Невыясненным остается вопрос, почему

сдерживание гиперактивации симпатического отдела нервной системы не приводит к уменьшению размера поражения. Решение этого вопрос может способствовать созданию новых лекарственных средств на основе природных регуляторов, защищающих органы от ишемического и реперфузионного повреждения.

Проведенные нами исследования показывают, как много проблем, касающихся энергетического обеспечения клеток в условиях ишемии и ишемии-реперфузии, еще предстоит решить.

Практическая значимость работы определена распространенностью сердечно-сосудистых заболеваний во всем мире (Богачевская, С. А. и др., 2015; Стародубцева О.С. и др., 2012; Benjamin et al., 2017), а также высоким процентом пациентов с осложнениями в виде инсульта на фоне инфаркта миокарда или наоборот (Чичкова М.А. и др., 2016; Фонякин, А. В., 2009). Инфаркт миокарда сопровождается снижение кровоснабжения органов, в том числе, мозга; ишемия мозга индуцирует гиперстимуляцию работы сердечно-сосудистой системы (Левина Е.М. и др., 2008). Многие операционные вмешательства, особенно со вскрытием грудной клетки и искусственным кровообращением, а также пересадка органов, сопровождаются ишемией, и эти ситуации можно предвидеть. Поэтому изучение механизмов прекондиционирования и защиты уже ишемизированных органов и подготовка их к реперфузии, а также разработка терапевтической стратегии и фармакологических подходов с целью одновременной защиты сердца и мозга при развитии инфаркта в одном из них, крайне важны.

Положения выносимые на защиту

1. Одним из основных механизмов развития отсроченной фазы ишемического прекондиционирования является активация митохондриальных $K^{+}_{АТФ}$-каналов. Эффект связан со структурной перестройкой белков на внутренней мембране митохондрий: снижением экспрессии К+АТФ-каналов и увеличением цитохром с-оксидазы.

2. Структурная перестройка внутренней мембраны митохондрий приводит к подавлению активности NO-эргической системы в мозге и уменьшению ее вклада в прекондиционирование. На фоне сохранной экспрессии белка nNOS и ее митохондриальной изоформы существенно снижено нитрозилирование белков.

3. Через 2,5 часа от начала ишемии кардиомиоциты в зоне риска сохраняют жизнеспособность и несут начальные морфологические признаки энергетического дефицита.

4. Через 72 часа после операции морфометрические методы анализа выявили разнонаправленные изменения размера кардиомиоцитов, митохондрий и межмитохондриальных контактов при ишемии и ишемии-реперфузии, которые отражают адаптацию клеток к условиям ишемии. Снижение признаков ишемии с помощью Семакса через 2,5 часа после операции отменяет морфометрические изменения кардиомиоцитов вдальнейшем при ишемии и ишемии-реперфузии.

5. Применение Семакса купирует гиперактивацию симпатического отдела нервной системы и снижает повреждающее действие ишемии, что улучшает состояние митохондрий, ядер клеток и кардиомиоцитов в целом вне области ишемии в острой стадии ишемии и ишемии-реперфузии и приводит к более благоприятному ремоделированию сердца. В то же время Семакс не влияет на признаки реперфузионного повреждения, размер поражения и смертность животных.

Личный вклад автора

Личный вклад автора присутствует на всех этапах выполнения исследования: выбор и разработка направления исследования, постановка цели, выбор методологии и набора методик, разработка протоколов исследования, проведение физиологических, биохимических, морфологических, молекулярно-биологических экспериментов, статистическая обработка результатов, обобщение материалов, написание статей, представление результатов на российских и международных конференциях.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертации были апробированы на следующих конференциях, конгрессах и съездах: VII Всероссийская с международным участием школа-конференция по физиологии и патологии кровообращения (3-6 февраля 2020 г, Москва, Россия); XV Международный Междисциплинарный Конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (4-10 июня 2019 г, Судак, Крым, Россия.); XIV международный междисциплинарный конгресс "Нейронаука для медицины и психологии" (30 мая-10 июня 2018. Судак, Крым, Россия); XIII международный междисциплинарный конгресс "Нейронаука для медицины и психологии", (30 мая - 10 июня 2017 Судак, Крым, Россия); XI Международный междисциплинарный конгресс. «Нейронаука для медицины и психологии»: (2—12 июня 2015 г.; Судак, Крым, Россия); IX Международный Междисциплинарный Конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (2013 г, Судак, Крым, Украина); VII Всероссийская с международным участием школа-конференция «Физиология и патология кровообращения», МГУ имени М.В.Ломоносова, (3 – 6 февраля 2020 г. Москва, Россия); V Всероссийская с международным участием школа-конференция по физиологии кровообращения, МГУ имени М.В.Ломоносова, (31 января – 3 февраля 2012 г. Москва, Россия); VI Всероссийская с международным участием школа-конференция по физиологии кровообращения, МГУ имени М.В.Ломоносова, (2-5 февраля 2016, Москва, Россия); III Всероссийская с международным участием школа-конференция по физиологии кровообращения, МГУ имени М.В.Ломоносова, (2004, Москва, Россия); II Научная конференция «Физиологическая активность регуляторных пептидов» посвященная 90-летию со дня рождения академика РАМН Игоря Петровича Ашмарина, (18 сентября 2015, Москва, Россия); X Международная конференция «Микроциркуляция и гемореология», (5-8 июля 2015; г. Ярославль, Россия); Международный научный форум ЛОМОНОСОВ 2015: г. Москва; Международный симпозиум «Biological motility: new facts and hypotheses», Пущино, 2014; Конференция с международным участием «Современные проблемы нейробиологии», Ярославль , 2014; III Российский Международный Конгресс "Цереброваскулярная патология и инсульт" (Конгресс НАБИ), Казань, 2014; VI Российский Симпозиум "Белки и пептиды", Уфа, 2013; IV Российский симпозиум «Белки и пептиды», Казань, 2009; Научно-пракическая конференция с международным участием "Кардиопротекция - от эксперимента к клинической практике", Санкт-Петербург, Россия, 2013; Российский Национальный Конгресс Кардиологов, Москва, Россия, 2011; VI Национальный конгресс терапевтов. 135 лет со дня рождения Н.Д. Стражеско, Москва, Россия, 2011; Съезд VII Казахского Физиологического общества с международным участием: «Современная физиология: от клеточно-молекулярной до интегративной – основа здоровья и долголетия», Алматы, 2011; «Механизмы регуляции физиологических систем организма в процессе адаптации к условиям среды.» Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 85-летию со дня основания Института

физиологии им.И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия, 2010; VIII Всероссийская конференция по патологии клетки. г. Москва, 2010; VII Всероссийская кронференция с международным участием, посвященная 160-летию со дня рождения И.П. Павлова, механизмы функционирования висцеральных систем, Санкт-Петербург, 2009; Российско-норвежский научный симпозиум "Защита миокарда: молекулярные, патологические и клинические аспекты". Регионарное кровообращение и микроциркуляция, Санкт-Петербург, 2008; XXI Съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова, 2010; XX съезд физиологического общества им.И.П.Павлова, Москва, 2007; 10-я пущинская школа-конференция молодых ученых, посвященная 50-летию Пущинского научного центра РАН. Пушино; Механизмы функционирования висцеральных систем. VIII Всероссийская конференция с международным участием. 25-28 сентября 2012 года, Санкт-Петербург; Механизмы функционирования висцеральных систем. V Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 100-летию со дня рождения В.Н. Черниговского, место издания Санкт-Петербург, 2007; Механизмы функционирования висцеральных систем. IV Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 80 – летию им. И.П. Павлова, место издания Санкт-Петербург, 2005; 4-ая конференция «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция", 2005; Международная научно-практическая конференция МГУ—СУНИ «Человечество и окружающая среда». 26-28 октября 2004 г. Москва; Конгресс «Пожилой больной. Качество жизни», Клиническая геронтология, место издания Москва, 2004; Третий Российский Конгресс по Патофизиологии. Москва, 2004., 7 национальная научно-практическая конференция с международным участием "Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека". 14-18 сентября 2011 г., г. Смоленск, 6-th International Conference "Reactive oxygen species, nitric oxide, antioxidants and human health". Smolensk, September, 14-18, 2009. VII Всероссийская конференция с международным участием "Механизмы функционирования висцеральных систем". 29 сентября-02 октября 2009 г. С.-Петербург. VII Международная конференция "Молекулярная генетика соматических клеток". 22-25 октября 2009 г. Звенигород-Москва. Международная научная конференция "Закономерности развития патологических состояний и их коррекция". 27-28 октября 2009 г. Минск. International conference "Modern development of magnetic resonance-2016". 31 October - 3 November 2016, Kazan.

Работа выполнена на базе Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова. В работе принимали участие коллективы ФГБНУ «Научный центр неврологии», Института Молекулярной генетики РАН, Казанского (Приволжского) Федерального университета, кафедры клеточной биологии и гистологии Биологического факультета МГУ, лаборатория нейрохимической фармакологии ФГБНУ НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова. Совместное участие в работе отражено в публикациях по теме диссертации. Автор выражает огромную благодарность всем коллективам, принявшим участие в работе и в обсуждении ее результатов.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 24 статьи (из них 19 в рецензируемых журналах, индексируемых базой Web of Sciense и Scopus, и 5 – в журналах из списка ВАК); 7 статей в сборниках, 45 тезисов в сборниках докладов научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 281 страницах и состоит из введения, обзора литературы, изложения методов, результатов и их обсуждения, выводов. Список литературы включает 667 источников. Работу иллюстрируют 28 таблиц и 63 рисунка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методология

В настоящей работе применяли стандартизированные физиологические, морфологические и биохимические, молекулярно-биологические методы. Были исследованы механизмы защиты клеток от ишемии и ишемии-реперфузии с помощью прекондиционирования и фрагмента АКТГ(4-7), стабилизированного последовательностью PGP, пептида Семакс. Тестирующей моделью для исследования механизмов прекондиционирования являлась модель ишемического инсульта, для исследования механизмов действия Семакса ишемия и ишемия-реперфузия миокарда.

Были оценены размер поражения, морфологические изменения ткани, ультраструктурные изменения клеток, был применен морфометрический анализ. Иммуногистохимически измерили экспрессию белков, уровень нитрозилирования и нитрования белков, плотность рецепторов к катехоламинам. Плотность симпатических нервов оценили методом хемилюминисценции. Методом ЭПР в мозге и крови измерена концентрация NO, цветной реакцией Грисса оценили концентрацию нитритов и нитратов в крови и моче, в сердце измерили уровень апоптоза. У животных с инфарктом миокарда оценили функциональное состояние сердечно-сосудистой системы в покое и при инфузии агониста β1-адренорецепторов – добутамина. Методом высокочувствительной жидкостной хромотографии измерили уровень катехоламинов в крови. В некоторых сериях использовали ядерный магнитный резонанс для оценки очага некроза.

Животные

Работу выполняли на половозрелых самцах белых беспородных крыс массой 240-300 г (321 голова) в экспериментах с прекондиционированием и 320-360 г (215 голов, выживших после инфаркта) в экспериментах с ишемией ишемией-реперфузией миокарда и влиянием Семакса.

Применение наркозов. Выведение животных из эксперимента

Хлоралгидрат 400 мг/кг, 100 мг/мл применялся во время операции по моделированию ишемических и реперфузионных повреждений органов; тиопентал натрия 75 мг/кг, 35 мг/мл – в острых экспериментах in vivo с регистрацией гемодинамических параметров и выполнением фармакологических тестов. Забор материала для проведения морфологических исследований, а также для оценки размера поражения проводили у глубоко наркотизированных хлоралгидратом животных.

Экспериментальные модели

Моделирование ишемического инсульта (ИИ). Моделирование ИИ для тестирования эффектов прекондиционирования проводили с помощью электрокоагуляции средней мозговой артерии (СМА) или ее ветвей, в зависимости от рисунка сосудистого русла, с одновременной перевязкой сонной артерии слева, что приводило к формированию некроза строго в соматосенсорных и двигательных областях коры головного мозга крыс размером от 12 до 25 % от объема коры полушария.

Моделирование ишемии (НИ) и ишемии-реперфузии (ИР) миокарда.

Ишемию миокарда моделировали необратимой окклюзией левой коронарной артерии (ЛКА) на 3-4 мм ниже левого ушка предсердия, без искусственной вентиляции легких. Для перевязки ЛКА сердце выталкивали в сформированное пинцетом окно в межреберье с верхушечным толчком: в этом случае область ишемии располагалась в зоне верхушки и передней стенки левого желудочка. Для моделирования ишемии-реперфузии операцию проводили аналогично: на 2,5 часа область левого желудочка с ЛКА притягивали лигатурой к бусине диаметром 4-5 мм.

Определение размеров поражения.

Гистохимический метод. Размеры некроза коры головного мозга и инфаркта сердца определяли через трое суток после операции планиметрически как % площади, занятой некрозом, от площади коры ипсилатерального полушария или размера левого желудочка, в срезах толщиной 1,5 – 2 мм, окрашенных 2,3,5-трифенилтетразолий хлоридом (ТТХ, Sigma). Ткань инкубировали с ТТХ (1% раствор в фосфатно-солевом буфере, при pH=7,3-7,4 и температуре 37ºС) в течение 30 минут, реакцию останавливали 10% раствором формалина, приготовленном на фосфатном буфере. В некоторых сериях экспериментов объем поражения коры головного мозга измеряли методом *магниторезонансной томографии* (ЯМР спектрометр BioSpec 70/30 USR Bruker, напряженность магнитного поля - 7 Тесла, что соответствует резонансной частоте протонов 300 МГц).

Через 2,5 часа после перевязки ЛКА выполняли двойное окрашивание миокарда: *метиленовый синий* в объеме 1,5 мл вводили через правую яремную вену с одновременной остановкой сердца 3 М KCl, далее готовили срезы и докрашивали ТТХ.

Через 28 суток после перевязки ЛКА, когда в сердце крыс полностью формировался рубец, поражение оценивали в окрашенных ТТХ кольцевых срезах как % длины окружности, занятый рубцовой тканью, по отношению к общей длине окружности левого желудочка сердца или как % веса левого желудочка, занятый рубцовой тканью.

Морфологические исследования

Нейроглиальный показатель. Количество глиальных клеток, приходящихся на один нейрон, оценивали через 21 сутки после операции в 5 слое коры головного мозга в перифокальной области поражения в срезах мозга толщиной 7 мкм, окрашенных по Нисслю. Фиксацию проводили в смеси Карнуа (120 мл 100º спирта, 60 мл хлороформа, 20 мл ледяной уксусной кислоты) в течение 2,5 часов. Проводки и депарафинизацию выполняли по стандартным методикам. У контрольных животных исследовали гомотипичную область левого полушария (программа Qwin, световой микроскоп DMLB Leica, объектив 40×). Плотность нервных и глиальных клеток определяли в одинаковых по площади полях зрения (0,087 мм^2). Подсчет проводили на 12-18 срезах мозга (по 1-2 поля зрения со среза, всего 54 поля зрения в каждой группе).

Иммуногистохимическое окрашивание белков в мозге проводили с использованием вторичных антител (Табл. 1), меченных флуорохромами флуоресцеином (FITC) и фикоэритрином (PE) (Табл. 2) на серийных парафиновых срезах. В качестве основного метода фиксации использовалась смесь Карнуа. Для определения S-nitrosoCys образцы ткани головного мозга фиксировали в растворе 4% параформальдегида и 1% глутаральдегида, затем стандартно осуществляли спирто-хлороформную проводку и заливку в парафин. Далее следовали инструкции производителей антител. Окрашенные срезы заключали под покровные стекла с использованием заливочной среды UltraCruz Hard-set (Santa Cruz - sc-359850). С помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM780 выполняли сканирование срезов, с последующим

количественным анализом результатов иммуногистохимических реакций в программе Image-Pro v.4.5. Ко-локализацию иммуногистохимических маркеров определяли в программе Image J с последующим анализом областей площадью 0,19-2,0 мкм^2.

Таблица 1. Список использованных антител.

COX1	Mouse monoclonal [1D6E1A8] anti-MTCO1 antibody, mitochondrial marker (ab14705), 1:200	Goat anti-mouse IgG_{2a}-FITC (sc-2079), 1:100
SDHA	Rabbit polyclonal anti-SDHA antibody (sc-98253), 1:50	Goat anti-rabbit IgG-PE (sc-3739), 1:100
KCNJ1	Rabbit polyclonal anti-KCNJ1 antibody, cytoplasmic domain (ab80967), 1:20	Goat anti-rabbit IgG-PE (sc-3739), 1:100
NOS1	Rabbit polyclonal anti-nNOS antibody (ab106417), 1:200	Goat anti-rabbit IgG-PE (sc-3739), 1:100
NOS2	Mouse monoclonal [C-11] anti-NOS2 antibody (sc-7271), 1:50	Goat anti-mouse IgG_1-FITC (sc-2078), 1:100
S-nitrosoCys	Mouse monoclonal [HY8E12] anti-S-nitrosocysteine (conjugated) antibody (ab94930), 1:1000	Goat anti-mouse IgG_1-FITC (sc-2078), 1:100
3-nitroTyr	Mouse monoclonal [39B6] anti-3-Nitrotyrosine antibody (ab61392), 1:200	Goat anti-mouse IgG_{2a}-FITC (sc-2079), 1:100

Таблица 2. Длины волн.

	Возбуждение, нм	Эмиссия, нм
DAPI	358	463
FITC	495	517
PE	498, 565	575

TUNEL анализ и иммуногистохимическое окрашиванием уровня активной каспазы-3 использовали для оценки уровня апоптоза кардиомиоцитов. Для TUNEL анализа использовали наборы ApoTag (Hemicon), исследование проводили по протоколу производителей для парафиновых срезов. Для окрашивания активной формы каспазы-3 использовали кроличьи моноклональные антитела против крысы (Abcam), вторичные антитела конъюгированы с пероксидазой хрена. Активность собственных пероксидаз ингибировали 3% H_2O_2. Демаскировали антигены нагреванием срезов до 97°С в цитратном буфере (pH=7,4). Неспецифическое связывание подавляли бычьим сывороточным альбумином. Окрашивание проявляли диаминобензидином, подкрашивали 0,5% метиловым зеленым и заключали под покровное стекло. Результаты представлены в виде апоптотического индекса.

Оценивали плотность β1 и β2 - адренорецепторов иммуногистохимически по рекомендованному производителями антител Abcam протоколу на парафиновых срезах толщиной 5 мкм. При окрашивании использовались первичные поликлональные антитела кролика к адренорецепторам крысы и вторичные антитела козы, меченные пероксидазой хрена, к иммуноглобулинам кролика. В программе Image-ProPlus подсчитывали относительную площадь окрашенных участков, что отражает плотность адренорецепторов.

Отбор проб миокарда для световой, электронной микроскопии, для определения уровня апоптоза забирали из трех областей левого желудочка сердца: зоны риска (ПС), верхней части боковой стенки левого желудочка (БС) и межжелудочковой перегородки (МЖП), или исследование проводили в кольцевых срезах миокарда. В последнем случае через катетер в левом желудочке проводили внутрисердечную фиксацию сердца 4 % формалином со скоростью 5 мл/мин до остановки. Для электронной микроскопии из тех же участков офтальмологическим пинцетом отделяли волоконца. Для оценки плотности симпатической иннервации на 28 сутки после моделирования инфаркта миокарда выделяли межжелудочковую перегородку и немедленно замораживали в жидком азоте.

Световая микроскопия миокарда. Образцы фиксировали в 10 % формалине на фосфатно-солевом буфере12 часов; далее промывали проточной водой 7 часов и выполняли последовательную проводку в спиртах: 70 %, 2 смены 96 % и 100 %; далее в смеси абсолютного спирта и хлороформа в соотношении 1:1, и, наконец, в хлороформе, в течение 3 часов каждую смену. Затем образцы 12 часов пропитывали смесью парафина и хлороформа, 3 часа расплавленным парафином и заливали в парафин. С помощью микротома ERGOSTAR HM-200 (Microm, Германия) образцы раскладывали в срезы толщиной 5 мкм, окрашивали гематоксилин-эозином по стандартной методике. Срезы просматривали на микроскопе Zeiss Imager A1 Axio, фотографировали и оценивали при помощи программы Axio Vision 3,5 (Zeiss, Германия) для захвата и анализа изображений. В программе SigmaScan 5 проводили оценку площади поперечного сечения кардиомиоцитов с соотношением осей менее 1:1,5, не менее 100 клеток из одной зоны миокарда от одного животного. В каждой зоне от каждого животного рассчитывали среднее значение площади поперечного сечения кардиомиоцита в мкм^2. В некоторых исследованиях площадь поперечных сечений кардиомиоцитов и число капилляров на 1 кардиомиоцит подсчитывали на полутонких эпоновых срезах толщиной 2 мкм, окрашенных метиленовым синим.

Электронная микроскопия. Волоконца ткани левого желудочка фиксировали 4% глутаровым альдегидом на 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,2-7,4), дофиксировали 1% OsO4, контрастировали 2% уранилацетатом на 70% этиловом спирте, обезвоживали по стандартной методике и заключали в эпон-аралдитную смолу. Ультратонкие срезы контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу и исследовали на электронном микроскопе JEM 100CX (Япония). По микроэлектронным фотографиям описывали ультраструктурные особенности ядра, митохондрий, миофибрилл, цитоплазмы клетки, состояние мембран. Количественно оценивали число межмитохондриальных контактов (ММК), как маркер функционального состояния кардиомиоцитов в околоядерной, субсарколеммальной сосудистой и околоядерной зонах. Примерно обсчитывали взаимодействие 1000 митохондрий у 1 крысы в каждой из зон. Оценивали относительные объемы митохондрий, миофибрилл методом, предложенным Автондиловым Г.Г. (Автандилов Г.Г., 1973) при помощи точечной сетки.

Окрашивание нервных окончаний глиоксиловой кислотой. Через 28 дней после операции плотность симпатических окончаний в МЖП определяли с помощью 30-минутной инкубации в 0,1 М фосфатно-солевом растворе (pH 7,2) с добавлением 2% глиоксиловой кислоты и 10% сахарозы. Образцы фотографировали при помощи люминесцентного микроскопа Axiovert 200 (длина волны 440-480 нм) с цифровой камерой AxioCamHiRes, объектив x40. В программе Paint.NET 3.5.8. на изображение накладывали решетку и подсчитывали количество пересечений прокрашенных окончаний

симпатических нервов с узлами решетки (Рис. 22). Данные представлены как количество пересечений нервными окончаниями 100 узлов решетки (относительная плотность).

Биохимические анализы

Высокочувствительная жидкостная хромотография (ВЧЖХ). Образцы крови забирали за 7 суток до и через 24, 27 часа и 28 суток после окклюзии левой коронарной артерии из яремной вены наркотизированных хлораргидратом крыс с 5% ЭДТА, 20 мкл на 1 мл цельной крови. В пробу добавляли 10 мкл $Na_2S_2O_5$, перемешивали и центрифугировали 10 мин при 3000 g, супернатант отбирали и хранили при -20°С. Уровень катехоламинов определяли методом ВЧЖХ на базе лаборатории нейрохимической фармакологии ФГБНУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова. Измеряли концентрации ДОФА (3,4-диоксифенилаланин), норадреналина, адреналина, дофамина, ДОФУК (3,4-диоксифенилуксусная кислота).

Определение концентрации NO в тканях мозга и венозной крови методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Оксид азота улавливали методом спинового захвата. Для этого за 30 мин до забора материала животным вводили компоненты ловушки: 500 мг/кг диэтилдитиокарбамата натрия (ДЭТК) в объеме 8,4 мл/кг внутрибрюшинно и смесь растворов 37,5 мг/кг $FeSO_4$, 187,5 мг/кг цитрата натрия в общем объеме 6,6 мл/кг подкожно. В результате их взаимодействия внутри организма формируется нерастворимый в воде комплекс ДЭТК-Fe^{2+}, способный захватывать NO с образованием стабильного радикала $(ДЭТК)_2$-Fe^{2+}-NO, который детектируется ЭПР-спектроскопией (спектрометр ER 200E SRC фирмы Брукер в X диапазоне (9.50 GHz) при температуре 77 °К) (Vanin A. F. et al., 2003).

Определение NO2-/NO3- в крови и моче крыс реакцией Грисса. Считается, что уровень нитритов и нитратов, конечных метаболитов оксида азота, в крови и моче отражает его общую продукцию в организме. Пробы крови в объеме 750 мкл отбирали через катетер, имплантированный в правую бедренную вену в шприц, промытый ЭДТА, до операции, через 2 часа 25 мин, 2 часа 35 мин после моделирования инфаркта через катетер. Пробы центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин, отбирали 250 мкл, хранили при -20°С. Мочу отбирали в метаболических клетках до моделирования инфаркта миокарда и на 3, 7, 14, 21, 28 сутки после него. Животных высаживали в метаболические клетки без еды, но со свободным доступом к воде на 12 часов. Измеряли объем мочи и время, проведенное в клетке. Пробы хранили при -70°С. Белки осаждали этанолом - концентрация в пробе 65%, перемешивали и инкубировали 30 минут, центрифугировали 15 мин при 9000 g при +4°С. Нитриты и нитраты определяли по методике Miranda K.M. et al., в основе метода лежит реакция Грисса: в кислых условиях происходит двухступенчатое образование окрашенного продукта диазосочетания сульфаниламида (SULF) и бициклического амина N-(1-нафтил)этилендиамина (NEDD). Реакция Грисса определяет только нитрит, нитрат восстанавливали до нитрита с помощью трехвалентного ванадия (VCl3).

Физиологический эксперимент in vivo

Работоспособность миокарда и гемодинамические параметры исследовали в остром эксперименте на наркотизированных животных. По окончании эксперимента проводили эвтаназию, сердце извлекали, определяли размер поражения. Пульсовую волну в левом желудочке регистрировали с помощью миниатюрного датчика давления Millar с частотой оцифровки 1000 Гц. Системное артериальное давление измеряли в брюшной аорте кровавым способом с помощью катетера, имплантированного через бедренную артерию и соединенного с датчиком давления. Для поддержания хорошего качества

сигнала противотоком инфузировали гепарин (50 ЕД/мл физиологического раствора) со скоростью 5 мкл/мин. Для постоянной глубины наркоза в 1 мл раствора гепарина растворяли тиопентал натрия из расчета 15 мг/кг веса крысы. Снижения уровня среднего артериального давления (АДср.), систолического левожелудочкового давления (АДЛЖсист.), среднего левожелудочкового давления (АДЛЖср.), частоты сердечных сокращений (ЧСС) за два часа регистрации не превышало 10 % от начального уровня; увеличение диастолического давления (АДЛЖдиас.), конечного диастолического давления (АДЛЖкдд.) составляло не более 3 мм рт.ст. Суммарный объем инфузии за два часа эксперимента составил 600 мкл. Запись и обработку сигнала проводили с помощью многофункциональной системы для регистрации артериального давления TAM-A и программы Haemodyn (Hugo Sachs Elektronik, Германия). С пульсовой волны системного артериального давления рассчитывали АДср.; с пульсовой волны левого желудочка сердца – АДЛЖср., АДЛЖсист., АДЛЖдиас., АДЛЖкдд. в левом желудочке сердца, а также максимальные скорости сокращения (+dP/dtmax), расслабления (-dP/dtmax) сердечной мышцы и ЧСС. Для оценки резервных возможностей сердца внутривенно в накопительном режиме инфузировали добутамин (агонист β1 адренорецепторов), в течение 3 минут каждую из пяти используемых доз препарата, общее время инфузии составляло 15 минут, суммарный вводимый объем 300 мкл. Параметры гемодинамики и сократимости миокарда рассчитывали на плато реакции в ответ на каждую дозу. За исходный уровень принимали величины рассчитываемых параметров перед инфузией соответствующего препарата.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета программ «SPSS» и «STATISTIKA 6.0». Для всех количественных показателей в каждой группе вычисляли среднее арифметическое значение параметра. Для установления границ, в которых помещается генеральная средняя, определяли предельную ошибку выборки и вычисляли доверительный интервал. Данные на диаграммах представлены как среднее арифметическое ± доверительный интервал, в таблицах – как среднее ± ошибка среднего.

Небольшой объем выборок, гетерогенность их дисперсий послужили основанием для выбора непараметрических критериев оценки значимости различий: независимые выборки сравнивали Н-тестом Крускала-Уоллиса с последующим попарным сравнением У-критерием Манн-Уитни с учетом множественности сравнений. Для оценки значимости внутригрупповых различий использовали критерий Вилкоксона. В случае распада групп по какому-либо параметру на подгруппы, значимость различий между ними оценивали с помощью теста Фишера. Различия признавались значимыми при $p < 0.05$.

Порядок проведения экспериментов с ишемическим прекондиционированием

Ишемическое прекондиционирование (ИП) головного мозга выполняли путем попеременного пережатия правой и левой общих сонных артерий на 5 минут с 5-минутной реперфузией в течение 1 часа.

Фармакологическое прекондиционирование выполняли введением неселективного активатора $K^+_{АТФ}$-каналов диазоксида либо внутривенно в дозе 10 мг/кг, либо внутримозговым введением в правый боковой желудочек мозга 10 мкл 6 мМ раствора по стереотаксическим координатам (AP -1,0 мм, L 2 мм, V -4,5 мм) за 24 часа до моделирования ишемического инсульта. Эффекты отсроченной фазы прекондиционирования тестировали моделированием ишемического инсульта через 24 часа после выполнения прекондиционирования.

Роль $K^+_{АТФ}$-каналов в развитии ишемического инсульта и прекондиционирования. Отдельно определяли влияние $K^+_{АТФ}$-каналов на размер некроза при ИИ. Для этого 20

мг/кг глибенкламида, блокатора $K^+_{АТФ}$-каналов, как плазматических, так и митохондриальных, вводили в/б за 30 мин до моделирования инсульта. Для изучения роли $K^+_{АТФ}$-каналов в реализации отсроченной фазы ИП глибенкламид вводили за 30 мин до ИП (за 24 часа 30 мин до моделирования ИИ). Для изучения роли митохондриальных $K^+_{АТФ}$-каналов за 30 мин до ИП в/б вводили селективный блокатор каналов - 5-гидроксидеканоат (5-HD) в дозе 40 мг/кг. Эффекты ИП воспроизводили в/ж введением 10 мкл 6 мМ диазоксида (фармакологическое прекондифционирование, ФП), неселективного активатора $K^+_{АТФ}$-каналов, за 24 ч 30 мин до моделирования ИИ. Оценивали размер инфаркта мозга; в морфологических экспериментах - выживаемость нейронов и глиоз в области пенумбры.

Взаимодействие системы оксида азота и $K^+_{АТФ}$-каналов. Концентрацию метаболитов оксида азота – NO2-/NO3-, в крови крыс оценивали исходно, а также через 5, 24 и 72 часа после моделирования ишемического инсульта. Далее исследовали влияние прекондиционирования - ИП, ФП, а также блокатора $K^+_{АТФ}$-каналов - глибенкламида на концентрацию NO2-/NO3- в те же временные точки после моделирования ИИ. Прямое измерение NO с помощью ЭПР проводили у животных с ФП диазоксидом через 5, 9,24 и 72 часа после моделирования ИИ, также оценивали изменение концентрации в крови NO при неселективной блокаде $K^+_{АТФ}$-каналов за 30 мин до ИИ. ИГХ окрашивание белков: KCNJ1, NO-синтаз (NOS1, NOS2), цитохром с оксидазы (COX1), сукцинатдегидрогеназы (SDHA), а также уровень нитрозилирования (S-nitrosoCys) и нитрования белков (3-nitroTyr) проводили через 3 и 24 часа после прекондиционирования.

Порядок проведения экспериментов с ишемией, ишемией-реперфузией миокарда и влиянием на повреждение сердца пептида Семакс (АКТГ4-7PGP).

Общий протокол экспериментов. Все серии экспериментов выполняли по стандартному протоколу: ЛКА перевязывали необратимо (НИ) или на 2,5 часа с последующей реперфузией (ИР); Семакс вводили в/б в день эксперимента через 15 мин и 2 ч 15 мин от начала ишемии; в эксперименте с НИ на 28 сутки Семакс вводили еще 6 дней однократно, доза одной инъекция составляла 150 мкг/кг. В экспериментах 2,5 часа и 28 суток от начала ишемии контролем служила ложная операция (ЛО), в остальных экспериментах – интактный контроль (ИК). Во всех сериях экспериментов оценивали общее состояние и смертность крыс.

Для изучения морфологии миокарда выполняли отдельные серии экспериментов. После перевязки ЛКА необратимо через 2,5 часа, трое и 28 суток после ишемии, и в сериях экспериментов с ишемией реперфузией – через трое и 28 суток от начала ишемии с помощью световой и электронной микроскопии оценивали морфологию миокарда. Через трое суток после операции определяли уровень апоптоза, через 28 суток – ремоделирование нервных окончаний в перегородке левого желудочка и плотность адренергических рецепторов. Размер поражения определяли с помощью ТТХ через 2,5 часа и 72 часа после ишемии или ишемии-реперфузии и взвешиванием отделов сердца или в кольцевых срезах левого желудочка через 28 суток после операции в отдельных сериях экспериментов и в каждой серии физиологического эксперимента.

Катехоламины в крови крыс измеряли в отдельной серии экспериментов через сутки, трое и 28 суток после моделирования НИ или ИР.

Метаболиты оксида азота – NO2-/NO3-, определяли в крови животных исходно, первую пробу забирали сразу после наркоза, далее через 2,5 и 72 часа после НИ, и в модели ИР через 2 часа 35 мин (5 мин после реперфузии) и 72 часа после ишемии, забор проб проводили в сериях с оценкой гемодинамики iv vivo.

Оценку гемодинамики у наркотизированных крыс в покое и в ответ на инфузию добутамина выполняли через трое суток после моделирования инфаркта миокарда, когда в сердце сформирован некроз и морфологически определяется развернутая картина воспалительной реакции, и через 28 суток, когда завершается формирование рубцовой ткани.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Роль $K^+_{АТФ}$-каналов головного мозга в реализации феномена ишемического прекондиционирования.

Электрокоагуляция средней мозговой артерии (ОСМА) через трое суток приводит к формированию некроза, занимающего около 15 % коры левого полушария крыс. Ишемическое прекондиционирование, выполненное за сутки до моделирования инсульта, снижает размер поражения практически в два раза (Рис. 1) за счет уменьшения гибели нейронов и не влияет на глиоз в перифокальной зоне поражения (Рис. 2,3).

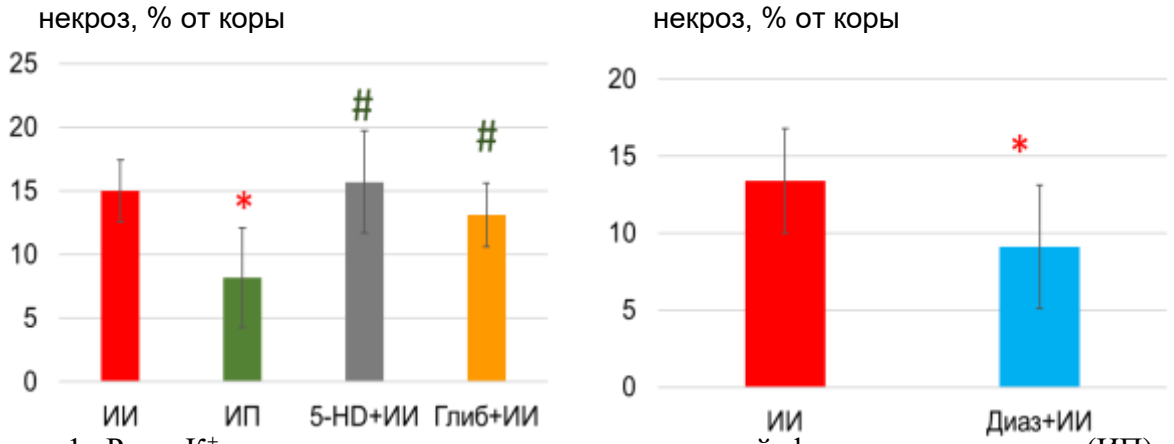


Рисунок 1. Роль $K^+_{АТФ}$-каналов в реализации отсроченной фазы ишемического (ИП) и фармакологичекого (Диаз+ИП) прекондиционирования. Глиб – неселективный блокатор $K^+_{АТФ}$-каналов, 5-HD – блокатор митохондриальных $K^+_{АТФ}$-каналов отменяют эффект ИП. Условные обозначения: * - $p < 0.05$ – значимое отличие по сравнению с группой ИП и # - с группой ИК. Данные представлены как среднее арифм. ± станд.откл. U-критерий Манн-Уитни.

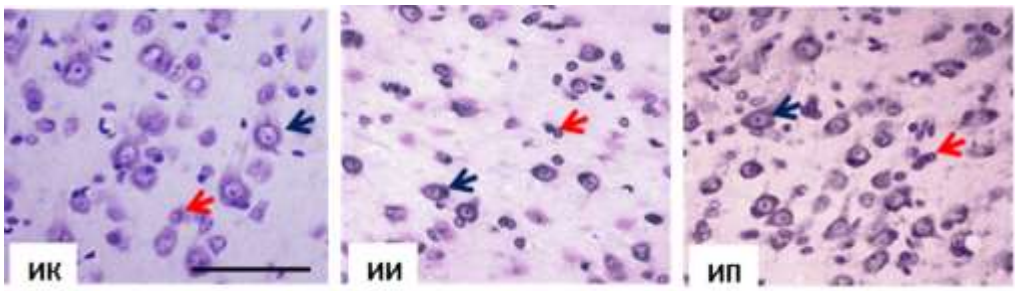


Рисунок 2. Микрофотография срезов левого полушария мозга в районе перифокальной зоны глиального рубца при увеличении 40×. Синей стрелкой обозначен нейрон, красной – клетка нейроглии. ИК - интактные, ИИ - инсульт, ИП - прекондиционирование. Окраска по Нисслю. Метка – 100 мкм

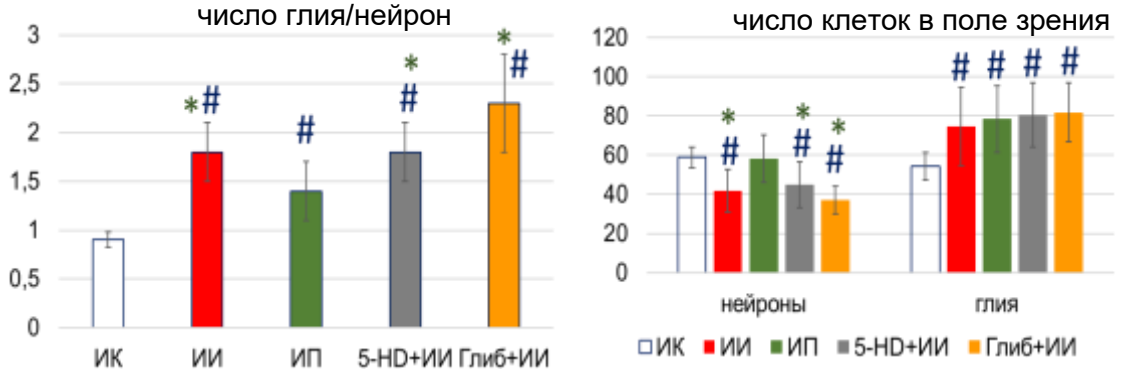


Рисунок 3. Ишемическое прекондиционирование (ИП) повышает выживаемость нейронов и не влияет на глиоз. Глиб – неселективный блокатор $K^+_{АТФ}$-каналов, 5-HD –блокатор митохондриальных $K^+_{АТФ}$-каналов отменяют эффект ИП. Условные обозначения: * - $p < 0.05$ – значимое отличие по сравнению с группой ИП и # - с группой ИК. Данные представлены как среднее арифм. ± станд.откл. U-критерий Манн-Уитни.

Ингибиторы $K^+_{АТФ}$-каналов, общего пула - глибенкламид и митохондриального – 5-HD, отменяют защитный эффект. Неселективный активатор $K^+_{АТФ}$-каналов, примененный за сутки до моделирования инсульта, снижает размер некроза сравнимо с ИП.

Анализ полученных результатов говорит о том, что митохондриальные $K^+_{АТФ}$-каналы играют основную роль в эффекте прекондиционирования.

Взаимосвязь системы оксида азота и $K^+_{АТФ}$-каналов в реализации феномена ишемического прекондиционирования.

В крови. В норме концентрация NO_3^-/NO_2^- в крови колебалась в пределах 130-150 мкмоль/л. После моделирования ОСМА выявлялись маркеры NO-эргической системы, свидетельствующие о развитии ишемического поражения мозга: в первые 5 часов наблюдалась тенденция к снижению Hb-NO в виде R-конформера (оксигенированный, в норме его доля составляет 90%) и увеличению в виде T-конформера (деоксигенированный), в крови возрастала концентрация его метаболитов - NO_3^-/NO_2^- (Рис. №4). В норме гемоглобин в R-конформации одновременно транспортировал и депонировал оксид азота, а R → T переход в условиях ишемии приводил к высвобождению NO и проявлению его регуляторных эффектов. Через 24 часа после операции ситуация выглядела зеркально: концентрация NO в составе R-конформеров росла, а в составе T-конформеров падала до минимума, тогда как концентрация NO_3^-/NO_2^- стабилизировалась у контрольных значений и оставалась такой через трое суток после операции. Тогда же концентрации R- и T- конформеров Hb-NO уравновешивались. R → T → R переходы зависят от накопления метаболитов, увеличением активности NOS, высвобождением NO из депо и другими механизмами, связанными с адаптацией к ишемии. Диазоксид препятствовал снижению NO в составе R-конформеров: группе с диазоксидом таких комплексов было больше на 78% через 5 часов и 87% через 9 часов после моделирования инсульта (критерий Манна-Уитни, $p = 0{,}004$ и $p = 0.006$, соответственно, не показано на рисунке).

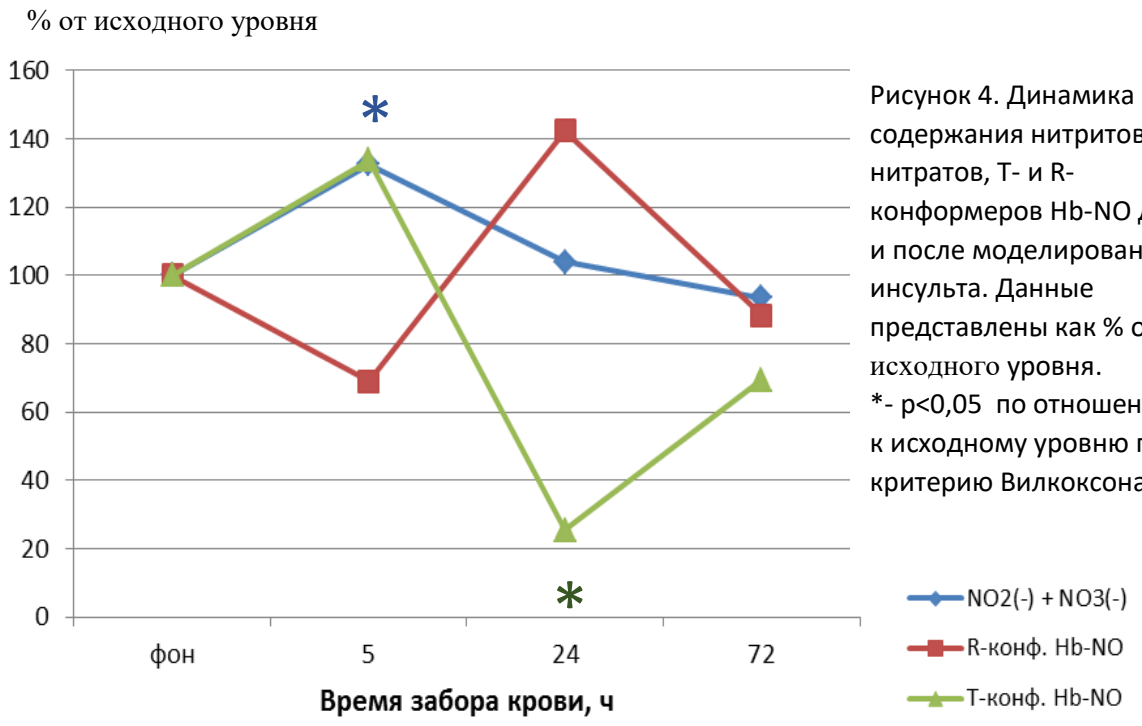


Рисунок 4. Динамика содержания нитритов и нитратов, T- и R-конформеров Hb-NO до и после моделирования инсульта. Данные представлены как % от исходного уровня. *- p<0,05 по отношению к исходному уровню по критерию Вилкоксона.

В коре головного мозга интактных животных средний уровень NO составил 1,16 нМ/г. Средняя концентрация NO через 9, 24 и 72 ч после окклюзии средней мозговой артерии составляла 0,62 нМ/г, 0,65 нМ/г и 0,75 нМ/г, соответственно, т.е. в два раза меньше, чем у интактных животных во всех временных точках. Введение диазоксида, активатора $K^+_{АТФ}$-каналов, за сутки до ОСМА приводило к еще большему снижению уровня NO во всех временных точках на 25-41%, статистически значимо через 9 и 72 часа после ОСМА. Диазоксид не изменял уровень NO относительно контрольной группы в ишемизированной области коры. Встал вопрос, какие изменения, возникшие за 24 часа в коре головного мозга крыс после прекондиционирования, привели к уменьшению продукции NO и увеличению выживания нейронов?

Иммуногистохимические исследования. Определение маркеров продукции NO - S-S-нитрозилирования цистеина (S-nitorosoCys) и маркера нитрования тирозина (3-nitroTyr) показало двукратное снижение интенсивности окрашивания в первом случае в два раза через 24 часа (критерий Манна-Уитни, $p<0,05$); и на 37% и 58% - во втором, через 3 и 24 часа после ИП (критерий Манна-Уитни, $p = 0.053$ и $p = 0.001$ соответственно). Косвенно продукция NO снижена в головном мозге после ИП, изменение белка нейрональной NOS1 и индуцибельной NOS2 изоформ NO-синтаз не выявлено.

В митохондриях принято оценивать экспрессию II комплекса – сукцинатдегидрогеназы (SDHA), потенциально при ишемии он способен увеличить утечку свободных радикалов. Маркер SDHA имел сравнимую интенсивность окрашивания во всех группах животных и не изменялся во времени ($p > 0.05$, данные не представлены). Мы исследовали комплекс IV цепи переноса электронов (COX1), поскольку он колокализован с митохондриальной NO синтазой, и NO в митохондриях снижает чувствительность этого комплекса к кислороду, также COX1 является негативным регулятором NO. В контроле наблюдалась цитоплазматическая, преимущественно перинуклеарная, экспрессия, окрашивание COX1 носило гранулярный характер и было умеренным, а в нейропиле – слабым. Через 24 часа после ИП интенсивность флуоресценции была на 40% выше, чем у животных контрольной группы (критерий Манна-Уитни, $p = 0,008$, Рис. 5).

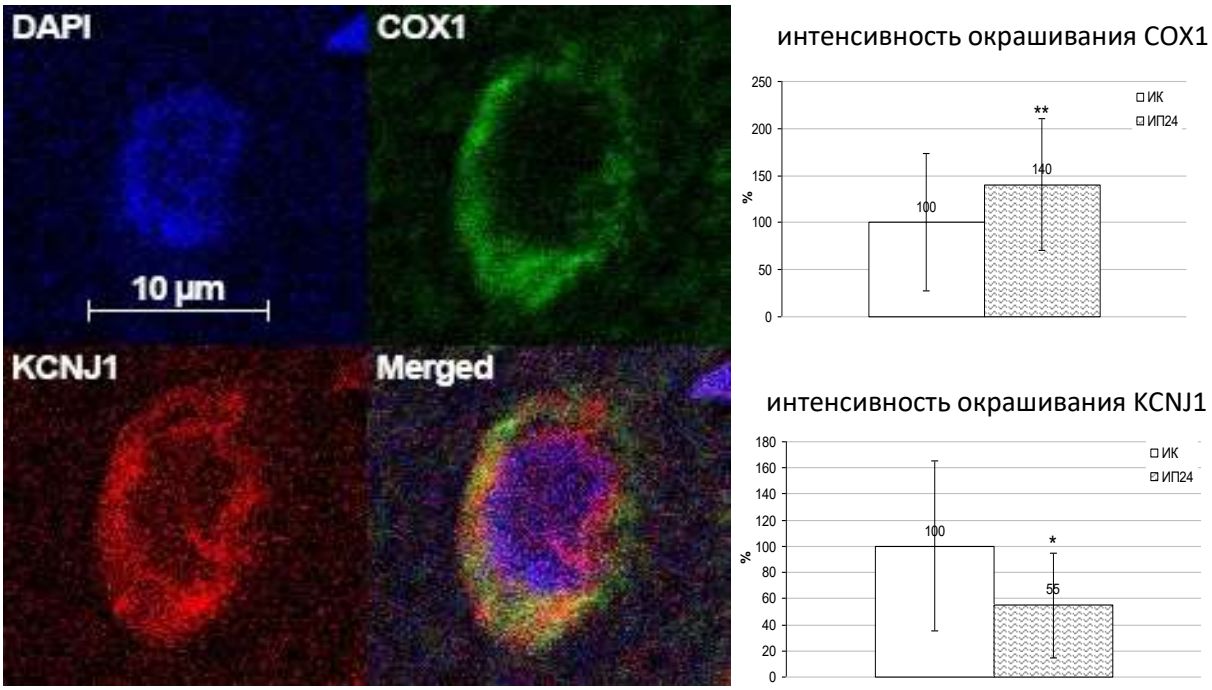


Рисунок 5. 24 часа после проведения ишемического прекондиционирования. Слева – ко-локализация маркера митохондриальной изоформы $K^+_{АТФ}$-каналов KCNJ1 с цитохром с-оксидазой COX1. DAPI – окрашивание ядер, Merged – совмещение окрасок. Видно, что области локализации KCNJ1 и COX1 совпадают. Справа интенсивность окрашивания IV комплекса цепи переноса электронов цитохром с-оксидазы и $K^+_{АТФ}$-каналов, за 100 % приняты значения у интактных животных (Критерий Манна-Уитни, * - $p<0,05$; **. - $p<0,01$).

Выявленная в умеренной степени экспрессия маркера митохондриальной изоформы KCNJ1 была ко-локализована с COX1 (Рис. 5). ИП привела к снижению интенсивности флуоресценции этого маркера на 45% в коре головного мозга в отсроченную фазу ИП, по сравнению с группой интактных животных.

Таким образом, одним из ключевых механизмов реализации защитного эффекта отсроченной фазы ишемического прекондиционирования в мозге крыс является активация $K^+_{АТФ}$-каналов, за которой следует перестройка митохондриального матрикса. Уменьшение плотности митохондриальных $K^+_{АТФ}$-каналов хорошо объясняет, почему после прекондиционирования не происходит снижения потенциала на внутренней митохондриальной мембране в ответ на ишемию (Kim et al., 2006; Katakam et al., 2007). Повышение цитохром с-оксидазы приводит к снижению свободного NO (Torres et al., 2000; Antunes et al., 2007). Нейропротекторный эффект фазы отсроченного прекондиционирования сохраняется неделями (Nandagopal et al., 2001; Perez-Pinzon et al., 1997), и это согласуется с необычайной стабильностью этого фермента (Saikumar and Kurup, 1985). Наш результат, касающийся усиления окраски на COX1, согласуется с ранее опубликованными протеомными данными (Cabrera et al., 2012), результатами нозерн-блоттинга и обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (McLeod et al., 2004), которые продемонстрировали увеличение экспрессии мРНК цитохром с оксидазы в результате отсроченного ишемического прекондиционирования. В фазе отсроченного прекондиционирования на фоне увеличения плотности цитохром с-оксидазы (Deryagin O.G. et al., 2017), чувствительность митохондрий к кислороду будет повышена, и это создаст благоприятные условия для окисления NO до NO2-, снижая биодоступность

оксида азота и, как следствие, уменьшая его повреждающий эффект при ишемии. В крови активность NO-эргической системы скорее отражает общие процессы в организме и складывается из многих составляющих, а у животных с ишемическим инсультом динамика концентраций NO_3^- и NO_2^- и комплексов Hb-NO сопряжены между собой.

Особенности развития ишемии и ишемии-реперфузии в сердце, влияние Семакса.

В настоящее время существует разрыв между высокотехнологичными подходами для терапии ишемических состояний сердца и мозга и неполным пониманием механизмов повреждения клеток во время ишемии. Приоритетной остается реперфузионная терапия, которая привносит реперфузионное повреждение, степень которого прямо коррелирует с длительностью ишемии. Методы экспериментальной коррекции ишемического реперфузионного повреждения клинически не эффективны, поэтому изучение его механизмов и поиск способов его медикаментозной коррекции являются актуальными.

Семакс, фрагмент АКТГ4-7PGP, используется в клинике, в том числе, для терапии больных с ишемическим инсультом (Гусев Е.И., Скворцова В.И., 2001). Для нас было важно, что Семакс способен снижать генерацию NO у животных с ишемией головного мозга (Фадюкова О.Е. и др., 2001). Основным механизмом его нейропротекторного действия считают воздействие на систему нейротрофических факторов (Гривенников И.А., 2006), а исследования влияния Семакса на транскриптом коры головного мозга в условиях ишемии выявили его роль во всех звеньях физиологического ответа, связанных с повреждением, воспалением, репарацией ткани при ишемии (Медведева Е.В. и др., 2014).

В результате комплексного многоуровневого исследованияе свойств пептида Семакс нами впервые показано, что его основной защитный эффект при развитии инфаркта миокарда обусловлен сдерживанием гиперактивации симпатического отдела нервной системы. Прямое измерение катехоламинов в крови обнаружило, что при НИ и ИР концентрация норадреналина через сутки после операции повышается по сравнению с контролем в два раза, а Семакс препятствует этому повышению (Рис. №6).

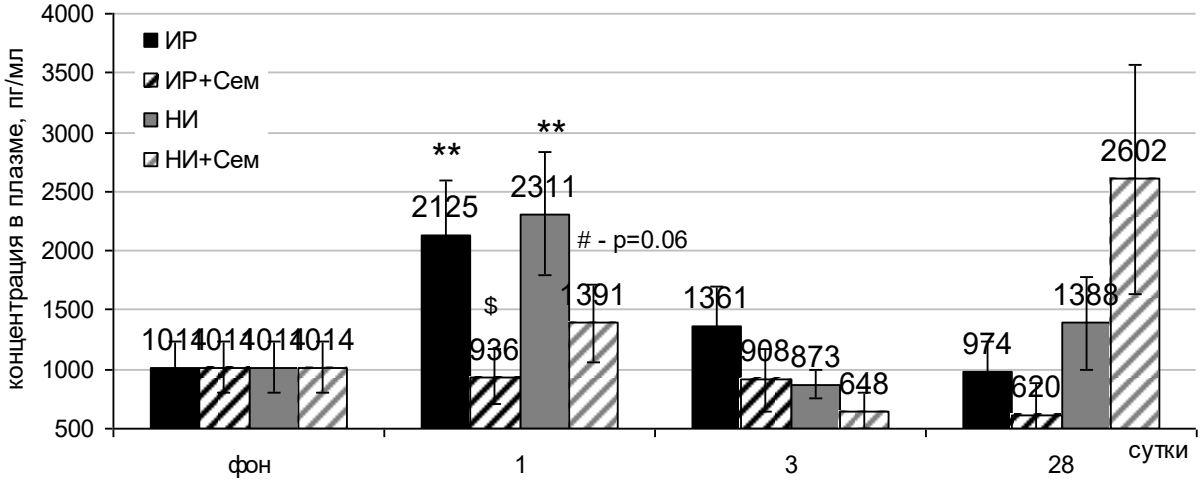
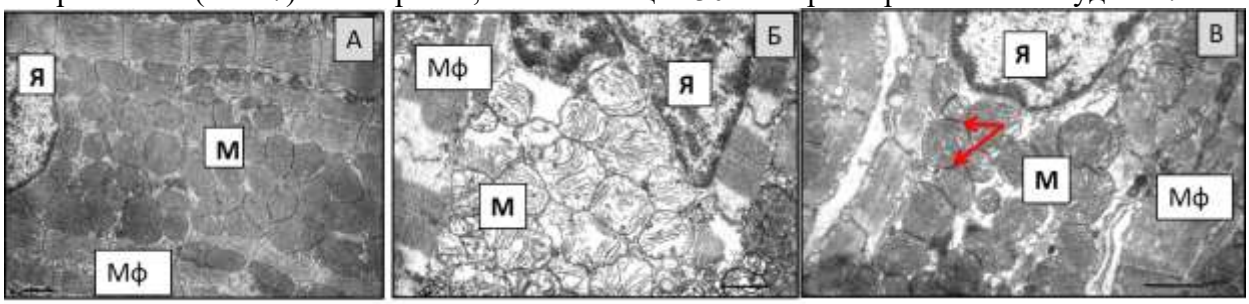


Рисунок 6. Влияние Семакса (Сем) на концентрацию норадреналина в крови крыс с необратимой ишемией (НИ) и ишемией-реперфузией (ИР).

Далее нами были детально исследованы особенности развития ишемии и ишемии-реперфузии и влияние на них Семакса как инструмента для изучения этих особенностей, сдерживающего гиперактивацию симпатической нервной системы.

Подробно охарактеризована **временная точка – 2,5 часа от начала ишемии**, поскольку на это время планировалась реперфузия левой коронарной артерии (ЛКА). К этому сроку в левом желудочке (ЛЖ) необратимые изменения кардиомиоцитов на светооптическом и гистохимическом уровнях (окраска метиленовым синим, ТТХ, гематоксилин-эозином) не выявлялись, а обнаруживались с помощью электронной микроскопии (Рис. 7) в зоне риска, составляющей 30 % от размера левого желудочка.



Риунок 7. Ультраструктура КМЦ интактного миокарда (А), через 2,5 часа после ишемии (Б), через 2,5 часа после ишемии в присутствии Семакса (В). Условные обозначения: Я – ядро, М - митохондрии с плотным матриксом и кристами; Мф – миофибриллы; красные стрелки – межмитохондриальные контакты (ММК). Метка – 1 мкм.

Основные нарушения в этот срок развития НИ на ультраструктурном уровне связаны с изменениями ядра (выраженная конденсация слоя пристеночного хроматина с неровными очертаниями, крупные глыбки хроматина внутри ядра, (Рис. №7, Б) и митохондрий (просветление матрикса и видимое уменьшение числа крист, плотные гомогенные гранулы внутри митохондрий и внутрикристные уплотнения, снижение числа ММК на 100 митохондрий у околососудистого субсарколеммального (58,3 ± 23,8 и 44,4 ± 12,8 контроль по сравнению с НИ, $p<0,05$) и межфибриллярного (42,9 ± 19,5 и 35,5 ± 13,9 контроль по сравнению с НИ, $p<0,05$) пулов митохондрий. Такие изменения свидетельствуют об энергетическом голодании клеток. В то же время изменения сократительного аппарата и отеки саркоплазмы практически не обнаруживались. *Исследования гемодинамики* показали, что в покое у инфарктных крыс после снижаются АДср, - dP/dt и повышается АДЛЖдиас, что также указывает на начало развития функциональных нарушений из-за нехватки энергетических ресурсов (Табл. 3). Как у ложнооперированных животных, так и у крыс с инфарктом миокарда, независимо от применения Семакса изменения параметров работы сердца в ответ на добутамин были одинаковыми: АДЛЖсис увеличилось на 7 – 9 %, АДЛЖср снизилось на 5 – 10 %, АДЛЖдиас уменьшилось на 16 – 32 % относительно фона.

Таблица 3. Параметры системной гемодинамики, характеризующие работу сердца, до и через 2,5 часа после НИ.
* - $p<0,03$; ** - $p<0,01$ по сравнению с исходным значением; # - $p<0,05$, ## - $p<0,01$ ЛО по сравнению с группой НИ; $ - $p<0,05$ НИ по сравнению НИ+Сем. (Данные представлены как среднее арифм. ± станд.откл; U-критерий Манн-Уитни).

		ЛО	ЛО+Сем	НИ	НИ+Сем
АДср., мм рт. ст.	Исходно	138,0 ± 6,2	137,4 ± 15,0	133,7 ± 9,0	141,1 ± 11,9
	После НИ	133,2 ± 11,4	128,0 ± 20,1	**118,5 ± 12,2 ***	**120,0 ± 13,1 ***
ЧСС, уд/мин	Исходно	407,0 ± 53,4	417,2± 26,5	393,0 ± 33,4	403,8 ± 35,9
	После НИ	370,6 ± 53,1	**370,0±31,8 ****	378,8 ± 16,3	**367,5 ± 41,9 ***

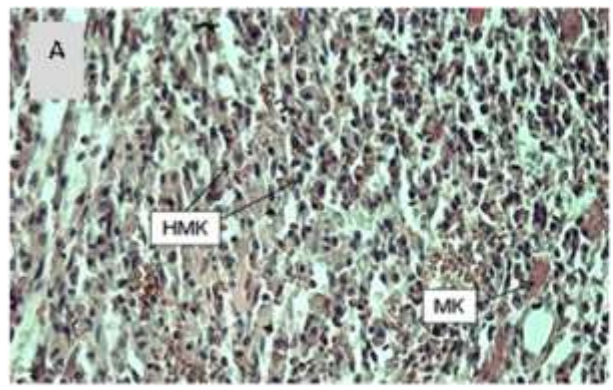
АДЛЖср., мм рт. ст.		76,5 ± 13,3	80,5 ± 8,2	80,0 ± 8,4	80,5 ± 12,4
АДЛЖсист., мм рт. ст.		154,6 ± 14,9	152,6 ± 21,3	136,6 ± 14,8	142,0 ± 10,6
АДЛЖдиаст., мм рт. ст.		12,9 ± 0,8	12,6 ± 1,6	**19,1 ± 2,4 ##**	15,7 ± 4,7
+ dP/dt, мм рт. ст./с		3038,3 ± 334,5	3031,0 ± 434,0	2581,5 ± 388,4	2746,3 ± 157,5
- dP/dt, мм рт. ст./с		2874,6 ± 400,4	2757,2 ± 478,2	**2336,3 ± 264,1 # $**	2427,3 ± 150,8

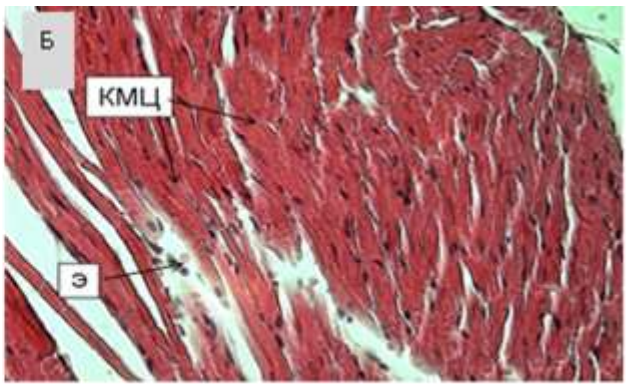
В целом, Семакс, примененный через 15 мин и 2 часа 15 мин от начала ишемии, снизил признаки энергетического голодания кардиомиоцитов (Рис. 7, С) и отсрочил начальные признаки сердечной недостаточности.

Размер поражения и смертность животных. Через трое суток после операции некроз в левом желудочке формировался окончательно. При НИ к этому сроку некроз занимал 18,0 ± 1,9 % левого желудочка, при реперфузии – 12,7 ± 2,9 % ($p<0,05$, критерий Манна_Уитни), что свидетельствует в пользу состоявшейся реперфузии. Через 28 суток сформировался рубец. Массовая_доля рубца при НИ составляла 18,0 ± 1,9%, а при ИР - 18,4 ± 1,8. В первом случае рубец было истонченным, с вкраплением кардиомиоцитов, во втором – более толстый. Смертность при НИ составляла 30-35%, реперфузия значимо увеличивала ее до 35- 50 % (по точному критерию Фишера). Увеличение размера поражения и смертности крыс говорит о развитии реперфузионного повреждения, а также, возможно, аритмий и ставит под сомнение кардиопротекторное действие реперфузии, что активно обсуждается в современной литературе (Kalogeris T. et al., 2017; Buono A. et al., 2019). Семакс не влиял ни в одной из серий экспериментов, ни на смертность, ни на размер поражения сердца.

Через трое суток после ишемии или ишемии-реперфузии в сердце крыс полностью формировалась область некроза с классическими признаками развития крупноочагового инфаркта миокарда и истончением стенки ЛЖ. Отличительной особенностью реперфузионного повреждения является неоднородность процесса: зоны гибели кардиомиоцитов окружены здоровой тканью и инфильтрованы округлыми или вытянутыми клетками с базофильной цитоплазмой (макрофаги и фибробласты) и небольшим количеством клеток с серповидным ядром (скорее всего, нейтрофилы). В этой модели наблюдалось полнокровие сосудов, иногда кровоизлияния с выходом эритроцитов в окружающую ткань. Сами кардиомиоциты были зачастую атрофированными, фрагментированными, со следами цитолиза, и избыточно сокращены. В то же время под эндокардом и около сосудов ткань выглядела более сохранной.

При НИ выявлялась обширная область некроза: кардиомиоциты образовывали эозильную массу, ядра не выявлялись, терялась поперечнополосатая исчерченность. Выжившие кардиомиоциты обнаруживались по перефирии области массовой гибели клеток, иногда под эндокардом и около сосудов, в тех местах, где сохранялось кровоснабжение по коллатеральным сосудам или по сосудам Вьессена-Тебезия. Вокруг зоны некроза в этот срок формировался участок грануляционной ткани с включением клеток, макрофагов и фибробластов, иногда нейтрофилов и лимфоцитов. В грануляционной ткани наблюдали единичные кровоизлияния.





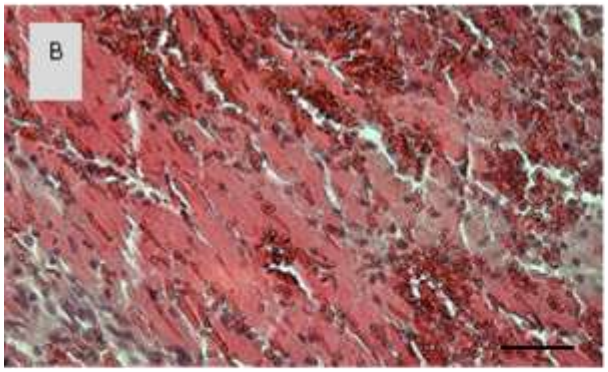


Рисунок 8. Состояние миокарда на 3 сутки после моделирования ишемии-реперфузии: А –грануляционная ткань; Б – периинфарктная область; В – зона некроза. Увеличение *40. КМЦ– кардиомиоциты, Э– эритроцитарная масса, кровоизлияние; В – клетки воспалительного инфильтрата, МК – миоцитарные клетки, НМК – немиоцитарные клетки (фибробласты, иммунные клетки). Масштаб 50 мкм.

ИР увеличивает вовлеченность боковой стенки и перегородки ЛЖ в развитие повреждения сердца. Бальная полуколичественная оценка состояния не затронутых ишемией участков показала, что ИР несколько снижает повреждение кардиомиоцитов, но усиливает признаки воспаления.

Электронномикроскопическое исследование более наглядно иллюстрировало неоднородность процессов, происходящих в области ишемии-реперфузии. ИР через трое суток приводила к формированию ядер с извилистой ядерной мембраной, без существенного изменения структуры хроматина, и к дилатации цистерн саркоплазматического ретикулума. Нам удалось выявить два типа изменения митохондрий: либо во всех зонах кардиомиоцитов наблюдались слабоконденсированные органеллы с большим количеством уплотнений и гранул, либо обнаруживались слабо набухшие митохондрии с просветленным матриксом и малым числом крист, причем во втором случае чаще, чем в первом, изменения сопровождались нарушением организации сократительного аппарата..

При НИ в области передней стенки левого желудочка были выявлены кардиомиоциты с признаками некроза: плазмалемма повреждена, цитоплазма отечна, ядра не определяются, либо определяются тени ядер (ядерная оболочка без хроматина внутри). Обнаруживались признаки повреждения митохондрий с нарушением целостности мембраны, набуханием, утратой крист. Миофибриллы разрушались, сохранные кардиомиоциты не выявлялись, формировалась область детрита, состоящего из миофибрилл, фрагментов мембран, разрушенных митохондрий и структурно неопределяемых масс из остатков клеток после деструкции. В межклеточном пространстве скапливалось большое количество коллагеновых волокон, собранных в пучки, макрофагов, фибробластов.

Электронномикроскопическое исследование боковой стенки и перегородки левого желудочка показало, что при НИ большая часть клеток в них изменена. Для основных изменений характерно появление складчатости ядерной мембраны при неизмененном

хроматине, перинуклеарных и субсарколеммальных отеков, расширенных Т-трубочек и цистерн саркоплазматического ретикулума, утрата границ саркомеров, набухание либо сильная конденсация митохондрий, наличие единичных аутофагосом. В группе ИР дополнительно к вышеперечисленным признакам можно отнести появление ядер с конденсированным хроматином и складчатым контуром ядра, т.е. с начальными признаками апоптоза. Морфометрическая оценка размеров кардиомиоцитов и относительных площадей, занимаемых митохондриями, показала разнонаправленные изменения этих параметров при ИР и при НИ: тенденция к увеличению размеров клеток в передней стенке левого желудочка и уменьшение площади, занимаемой митохондриями в боковой стенке при НИ и обратный результат при ИР (Табл. №4).

Таблица 4. Морфометрические показатели через трое суток после моделирования необратимой ишемии (НИ) или ишемии-реперфузии (ИР). * - p<0,05 по сравнению с НИ или ИР, # - p<0,05 по сравнению с ИК. Цветом выделены противоположные изменения при НИ и ИР.

Необратимая ишемия, 72 часа			
	ИК	НИ	НИ+Сем
Средняя площадь попереч. сечения, % от ИК, зона ишемии	100,0 ± 33,1	126,7 ± 25,2	95,6 ± 28,0 *
Площадь митохондрий, % (боковая стенка)	33,0 ± 1,5	27,0 ±1,5#	32,5 ± 5,0 *
ММК ОЯ, зона ишемии	51,6 ± 3,5	59,0 ± 5,3	41,8 ± 4,7
ММК МФ, зона ишемии	41,3 ± 4,9	39,6 ± 3,9	38,6 ± 4,4
ММК ОСС, зона ишемии	30,4 ± 3,1	38,9 ± 1,0	33,3 ± 0,01 *
Ишемия-реперфузия, 72 часа			
	ИК	ИР	ИР+Сем
Средняя площадь попереч. сечения, % от ИК, зона ишемии	100,0 ± 30,3	73,6 ± 22,7 #$	109,1 261,5 ± 39,9
Площадь митохондрий, % (боковая стенка)	30,0 ± 1,5	39,4 ±4,1#	33,0 ±3,8 *
ММК ОЯ, зона ишемии	47,1 ± 16,0	36,8 ± 23,0	32,6 ± 15,7 #
ММК МФ, зона ишемии	42,9 ± 19,5	36,7 ± 18,5 #	32,4 ± 17,5 #
ММК ОСС, зона ишемии	58,3 ± 23,8	41,1 ± 20,4 #	43,8 ± 21,9 #

Семакс не влиял на морфологические признаки повреждения кардиомиоцитов в области НИ и ИР, однако несколько снижал признаки повреждения и инфильтрацию боковой стенки и перегородки левого желудочка. Основные эффекты Семакса через трое суток после НИ и ИР связаны с влиянием на признаки ишемии клеток, с большей сохранностью ядер, митохондрий и саркоплазматического ретикулума. Кажется, что Семакс оказывает разнонаправленное действие на ультраструктурные изменения кардиомиоцитов в двух моделях. Однако, с нашей точки зрения, механизмы защиты клеток, запущенные во время развития ишемии, достаточно инертны. Маловероятно, чтобы клетка через 2,5 часа от начала ишемии с запуском реперфузии моментально

отключила все механизмы (фосфорилирование, нитрозилирование, активацию АТФ-чувствительных К+ каналов, стресс-белков, и т.д.), а также инактивировала все факторы транскрипции, изменяющие статус клетки и повышающие ее устойчивость к ишемии. Дополнительно в области ишемии накапливаются простагландины, цитокины и другие регуляторные соединения, адаптирующие клетки и ткань к сложившейся ситуации, клетка реагирует на избыточную стимуляцию катехоламинами (Wu J. et al., 2013; Sciarretta S. Et al., 2014; Zhang D.Y. et al., 2014; Chen Q.M., Maltagliati A.J., 2018; Zhang Z. et al., 2018). Пролонгировать механизмы, активированные для защиты клеток ишемией, в условиях реперфузии могут феномены “no-reflow” и “stanning” миокарда: в первом случае участки ишемии возникают из-за активации воспалительной реакции и эндотелия, во втором неработающая часть миокарда способствует нарушению тока крови по коронарным сосудам (Heusch G., 2008; Kalogeris T. et al., 2017; Barzic A. et al., 2020). Возникает ситуация, схожая с острой стадией ишемического прекондиционирования, которая начинается немедленно и длится 2-3 часа (Nandagopal K. et al., 2001); несколькими часами позже развивается отсроченная фаза, которая длится в течение недели и до месяца (Миронова Г.Д. и др., 2007). В сердце, в отличие от мозга, острая фаза хорошо выражена (Barone F.C. et al., 1998). Мы полагаем, что Семакс, обладающий выраженным антигипоксическим и антиишемическим действием (Ашмарин И.П., 1997; Скворцова В.И. и др., 1999; Черкасова К.А., 2001; Фадюкова и др. 2011), а также анальгетическим эффектом (Левицкая Н.Г. и др., 2007) способен затормозить развитие ишемических реперфузионных нарушений, приводящих к гибели кардиомиоцитов (Рис. 9).

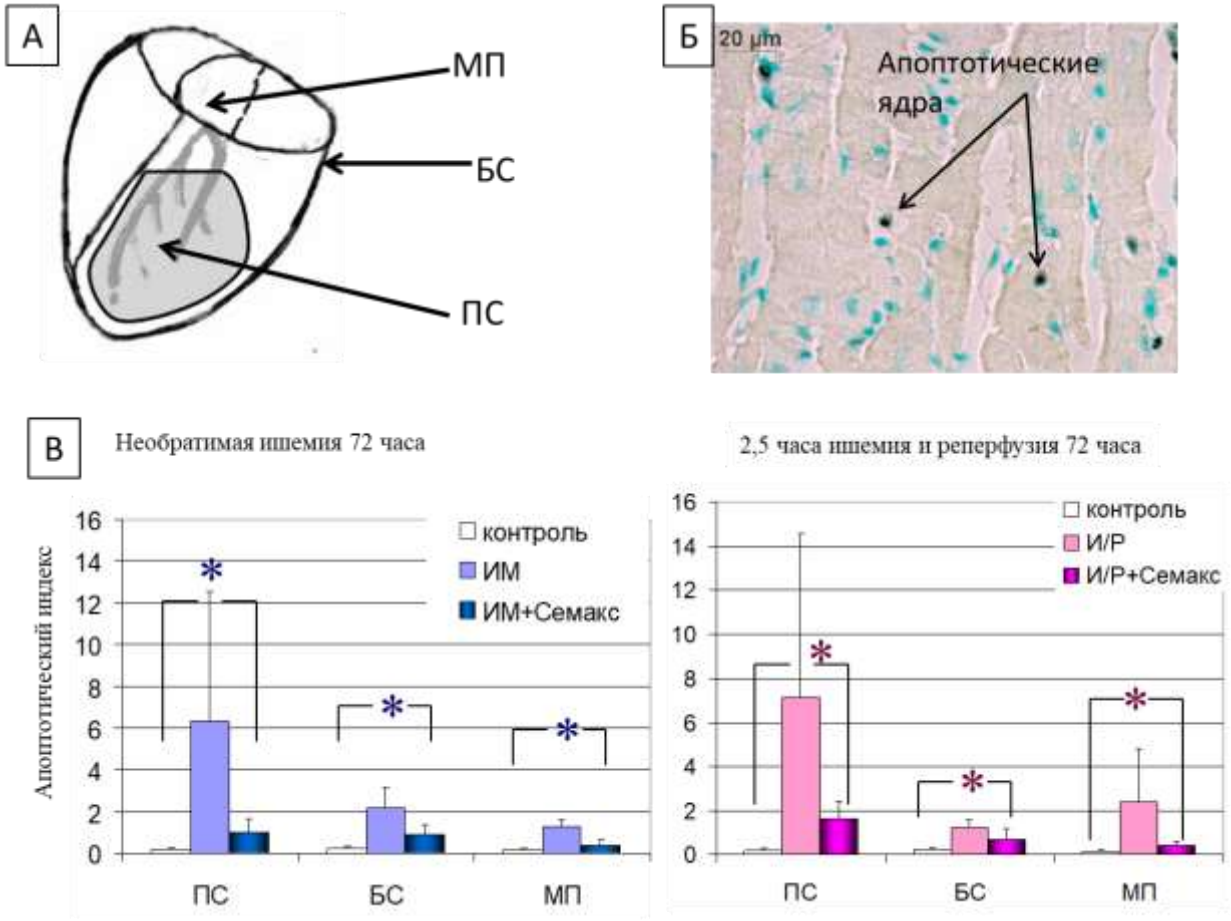


Рисунок 9. Влияние Семакса на апоптоз кардиомиоцитов в области ишемии в передней стенке (ПС), боковой стенке (БС) левого желудочка и в межжелудочковой перегородке (МП) (по результатам TUNEL-анализа). А – схема взятия проб (серым цветом обозначена зона ишемии); Б – пример окрашенного среза, с докрашиванием 0,5%

метиловым зеленым; В – результат статистической обработки данных. * - p<0,05 по критерию Манна-Уитни.

Оценка результатов TUNEL-анализа и иммуногистохимического окрашивания на активную каспазу-3 показали сопоставимое повышение уровня апоптоза, оцененное двумя методами, во всех областях левого желудочка сердца и его снижение с применением Семакса (Рис. 9).

Исследования гемодинамики показали, что после моделирования инфаркта миокарда, как ИР, так и НИ, у животных развиваются признаки сердечной недостаточности (Табл. 5) в равной степени в обеих моделях. В покое у наркотизированных животных Семакс статистически значимо снижал ЧСС на 21 и 24 % при ИР и НИ соответственно, причем при ИР еще значительнее, на 12 и 17 % соответственно, уменьшал индексы сократимости и расслабления и снижал почти в два раза, как при ИР, так и при НИ, диастолическое давление и примерно на 30 % - конечно-диастолическое.

Таблица 5. Параметры системной гемодинамики через трое суток после моделирования необратимой ишемии и ишемии-реперфузии, параметры, характеризующие работу сердца через трое суток после операции. ↓↑ - p<0,05 увеличение или уменьшение гемодинамического параметра в группе НИ или ИР по сравнению с ИК; ⇩ - p<0,05 уменьшение гемодинамического параметра в группе НИ+Сем по сравнению НИ или ИР+Сем по сравнению с ИР, ≈ - без изменений. Данные представлены в виде среднего арифм. ± станд.откл., U-критерий Манн-Уитни.

	ИК	ИР		ИР+Сем		НИ		НИ+Сем	
АДср мм рт. ст.	131,5 ± 3,0	111,7 ± 4,2	↓	97,8 ± 4,8	≈	102,3 ± 4,6	↓	107,6 ± 1,6	≈
ЧСС, уд/мин	363,5 ± 13,8	327,3 ± 12,4	≈	257,4 ± 6,1	⇩	352,3 ± 19,8	≈	260,2 ± 5,1	⇩
АДЛЖср, мм рт. ст.	91,3 ± 2,6	82,1 ± 4,0	≈	72,0 ± 4,2	≈	79,4 ± 4,7	≈	77,0 ± 2,8	≈
АДЛЖсист, мм рт. ст.	163,5 ± 3,0	141,1 ± 4,9	↓	126,0 ± 5,4	≈	126,8 ± 5,7	↓	130,0 ± 3,9	≈
АДЛЖдиаст, мм рт. ст.	3,7 ± 0,4	11,3 ± 1,5	↑	6,1 ± 1,0	⇩	15,7 ± 2,1	↑	7,9 ± 1,1	⇩
АДЛЖкдд, мм рт. ст.	9,0 ± 0,5	21,8 ± 1,3	↑	17,1 ± 1,1	⇩	26,7 ± 0,9	↑	18,9 ± 0,9	⇩
+ dP/dt, мм рт. ст./с	10660,9 ± 422,2	7503,8 ± 218,9	↓	6658,1 ± 242,1	⇩	6814,8 ± 178,1	↓	6722,7 ± 127,4	≈
- dP/dt, мм рт. ст./с	12290,2 ± 783,9	5446,2 ± 159,1	↓	4515,4 ± 182,5	⇩	5222,6 ± 211,7	↓	5414,4 ± 188,7	≈

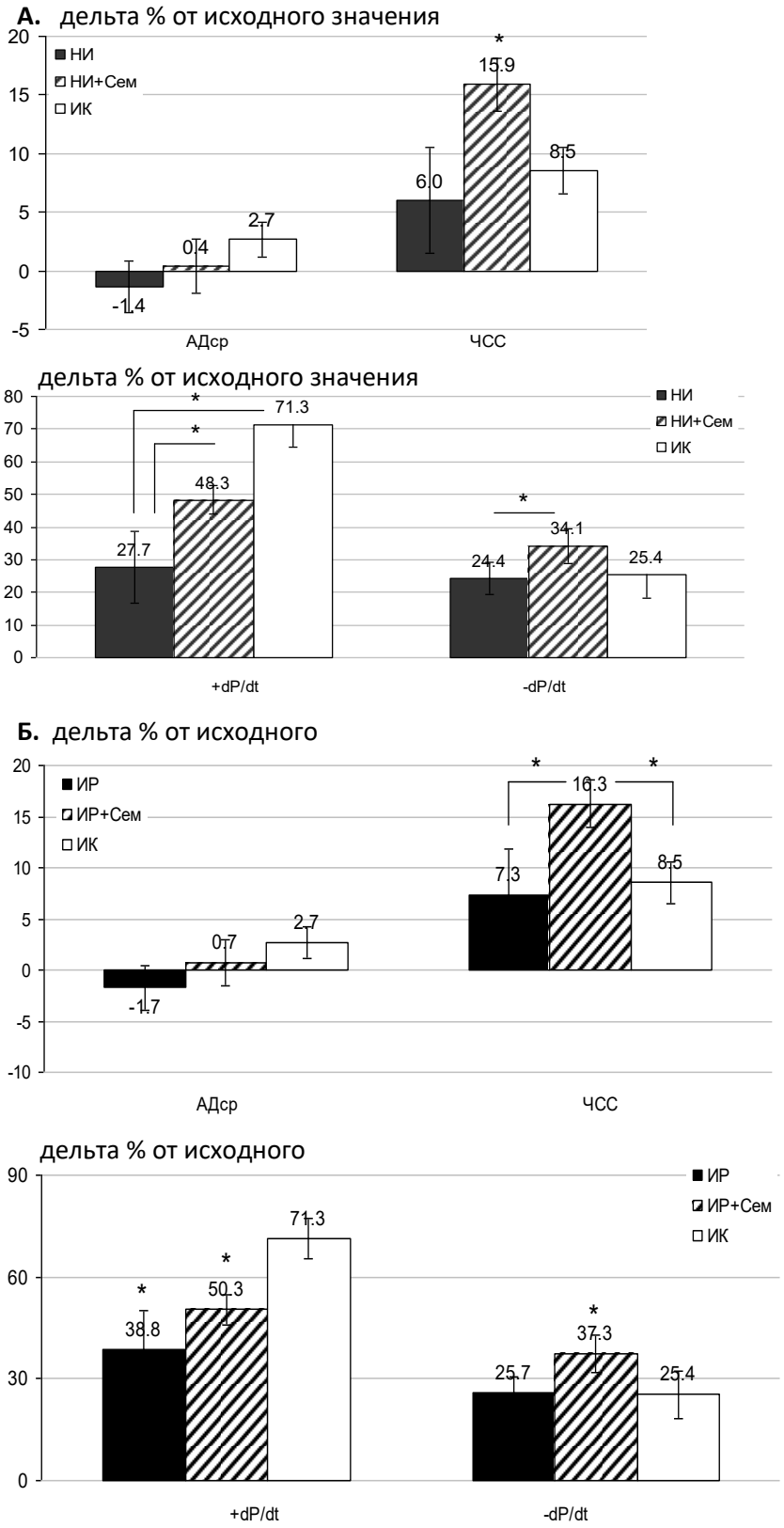


Рисунок 10. Влияние инфузии добутамина в дозе 3 мкг/кг*мин на индексы сократимости и расслабления миокарда у крыс в моделях НИ (А) и ИР (Б). Условные обозначения: * - $p<0.05$ – статистически значимое отличие групп с введением семакса от соответствующих контрольных групп с введением физиологического раствора. Данные представлены в виде среднего арифм. ± станд.откл., U-критерий Манн-Уитни.

Тестирование работоспособности сердца путем внутривенной инфузии агониста β1-адренорецепторов добутамина также не выявило особенностей его реакций в обеих моделях. Инфузия добутамина в накопительном режиме вызывала у контрольных животных дозозависимое повышение ЧСС (максимально на 8,5 % при дозе 6 мкг/кг*мин, рис. 10, 11), работоспособность сердца также возрастала, +dP/dt увеличивался на 71 %, а – dP/dt - на 25 % от исходного уровня. АДср, и показатели давления в левом желудочке – (АДЛЖсис, АДЛЖдиас, АДЛЖср) изменялись несущественно. У животных инфарктных групп (НИ и ИР), сердце отвечало на добутамин повышением ЧСС в той же степени, что и у животных группы ИК. Индексы, определяющие работоспособность миокарда, снижались, причем на макимальную дозу добутамина практически в два раза при НИ и на 30 % при ИР (Рис. 10, А,Б).

Семакс, примененный в острую стадию развития инфаркта, приводил к увеличению ответа ЧСС на инфузию добутамина, большему, чем у ИК, НИ, и ИР практически в два раза (Рис. 10). Индекс сократимости + dP/dt на графике расположился выше на 37 % при НИ и на 23 % ИР, по сравнению со своим инфарктным контролем, но ниже, чем у ИК. Интересно, что Семакс повысил индекс расслабления -dP/dt на величину, большую чем у ИК, и у инфарктных крыс почти в два раза на максимальную дозу добутамина в обеих моделях. Поскольку Семакс не снижает размер поражения, но и не увеличивает его, то можно считать, что работоспособность постинфарктного сердца увеличивается не за счет изменения массы выжившей ткани, а за счет повышения эффективности ее работы.

Таким образом, анализ гемодинамических параметров в покое и при фармакологической нагрузке добутамином показали, что у крыс и с НИ, и с ИР развиваются признаки сердечной недостаточности. При этом Семакс снижает ЧСС и параметры работоспособности сердца при ИР, уменьшает ЧСС при НИ, а в обеих моделях уменьшает диастолическое и конечно-диастолическое давления в левом желудочке в покое у наркотизированных крыс. Эти результаты и результаты нагрузочной пробы добутамином свидетельствуют о том, что Семакс оказывает кардиопротекторный эффект и увеличивает сократительный резерв миокарда.

Ремоделирование миокарда через 28 суток после операции.

Со временем происходит ремоделирование поврежденного миокарда, область инфаркта замещается рубцом, выжившая часть миокарда гипертрофируется и укрепляется в результате разрастания соединительнотканных волокон. В таблице 6 показано, что работоспособная часть левого желудочка, нормированная на вес крысы в инфарктных группах, с НИ и ИР, одинаково ниже, чем у интактных животных. Отличительной особенностью животных с реперфузией является вовлечение в ремоделирование правого желудочка, поскольку его масса и нормированная масса в этой группе значимо выше, чем у контрольных крыс. Такая реакция возможна, если в какой-то момент в этой группе развивается тяжелая сердечная недостаточность в результате “no reflow” или воспаление, затрагивающее правые отделы сердца.

Ультраструктурный анализ ремоделирования левого желудочка при развитии ишемического повреждения выявил увеличение размера кардиомиоцитов за счет сильного разрастания сократительного аппарата, без увеличения относительного объема митохондриома, и ументшение на этом фоне числа межмитохондриальных контактов (Табл. 7). Кардиомиоциты инфарктных крыс в этом случае оказываются в энергетически невыгодных условиях.

Таблица 6. Массовые характеристики отделов сердца крыс через 28 суток после ишемии или ишемии-реперфузии. * - p<0,05 для групп НИ и ИР по сравнению с интактным контролем. Данные представлены как среднее арифм. ± станд.откл; U-критерий Манн-Уитни.

	Масса отделов сердца, мг			Масса отделов сердца(мг)/масса крысы (гр.)		
	рубец	ЛЖ (минус рубец)	ПЖ	рубец	ЛЖ (минус рубец)	ПЖ
Интактный контроль		761 ± 112	204 ± 37		2 ± 0,47	0,47 ± 0,08
Необратимая ишемия	177 ± 19	**598 ± 60***	239 ± 31	0,42 ± 0,06	**1,4 ± 0,14***	0,56 ± 0,1
Ишемия-реперфузия	152 ± 45	**615 ± 65***	**292 ± 69***	0,35 ± 0,11	**1,39 ± 0,1***	**0,67 ± 0,18***

Возможно, такое ремоделирование способствует гибели кардиомиоцитов в течение всей жизни постинфарктных больных. В таблице 7 видно, что Семакс сдерживает развитие гипертрофии, уменьшает относительный объем миофибрилл и увеличивает число ММК межфибриллярного пула митохондрий, т.е. благоприятно влияет на ремоделирование в направлении сохранения энергетического баланса в клетках. Меньший размер кардиомиоцитов при одинаковой массе выжившего миокарда в группах НИ и НИ+Сем, а также снижение апоптоза кардиомиоцитов под влиянием пептида говорит о том, что в сохранившейся части левого желудочка в группе с Семаксом клеток больше, чем у инфарктного контроля. Ложная операция с Семаксом тоже претерпевает ремоделирование, поэтому мы в дальнейшем отказались от использования ЛО как контроля.

Таблица 3. Площадь поперечного сечения кардиомиоцитов, относительные объемы, занимаемые миоибриллами и митохондриями в цитоплазме кардиомиоцитов (в %), число капилляров на 1 кардиомиоцит и число межмитохондриальных контактов через 28 суток после операции и у интактных крыс (ИК) по результатам морфометрического анализа. # - p<0,05 по сравнению с ИК; * - p<0,05 для групп НИ и НИ+Сем по сравнению со своим ложнооперированным контролем; § - p<0,05 между группами НИ и НИ+Сем; & - p<0,05 между группами ЛО и ЛО+Сем. ММК – межмитохондриальные контакты около ядерной (ОЯ), межфибриллярной (МФ) и околососудистой субсарколеммальной (ОСС) зон. Данные представлены как среднее арифм. ± станд.откл;U-критерий Манн-Уитни.

	ИК	ЛО	ЛО+Сем	НИ	НИ+Сем
Средняя площадь поперечного сечения, мкм2	219,0 ± 76,7	**206,2 ± 76,1** **#**	**259,7 ± 112,6** **&**	**330,4 ± 175,5** **#, ***	**238,4 ± 109,2** **§**
Относительный объем	43,1 ± 12,4	40,0 ± 13,6	**45,9 ± 11,0**	**47,2 ± 15,7**	**41,0 ± 12,8**

миофибрилл, %			**&**	*****	***, §**
Относительный объем митохондрий, %	34,5 ± 9,8	35,6 ± 9,4	**30,8 ± 10,6 &**	34,8 ± 11,2	32,3 ± 11,5
Число капилляров на кардиомиоцит	0,84 ± 0,14	0,84 ± 0,13	**0,93 ± 0,17 #, &, ***	0,84 ± 0,16	0,84 ± 0,13
ММК ОЯ	47,1 ± 16,0	**37,7 ± 19,8 #**	43,2 ± 24,0	41,2 ± 14,7	42,9 ± 21,1
ММК МФ	42,9 ± 19,5	44,0 ± 16,9	**36,5 ± 20,1 *, &**	**33,0 ± 13,8 #, ***	**45,0 ± 21,8 §**
ММК ОСС	58,3 ± 23,8	49,8 ± 18,7	**52,6 ± 22,8 #, §**	42,4 ± 13,5	59,4 ± 24,0

Ремоделирование иннервации сердца симпатическим отделом нервной системы изучали через 28 суток после моделирования инфаркта, изменения оценивали в межжелудочковой перегородке, чтобы миминизировать влияние воспаления (Рис. 11).

В интактном контроле относительная объемная плотность нервных окончаний симпатического отдела вегетативной нервной системы равнялась 1,9 %, плотность β1-адренорецепторов – 66 %, β2-адренорецепторов – 86%. α-адренорецепторы в миокарде крыс не определялись, возможно, из-за недостаточной чувствительности метода и низкой плотности этих рецепторов в сердце крыс данной популяции. НИ не вызывала никаких изменений, ИР повышала плотность иннервации до 3,3 ($p<0,01$) и снижала плотность β2-адренорецепторов до 56 %, скорее всего, компенсаторно. Семакс влиял только на плотность иннервации, снижая ее до 2,0 % ($p=0,01$) в модели ИР.

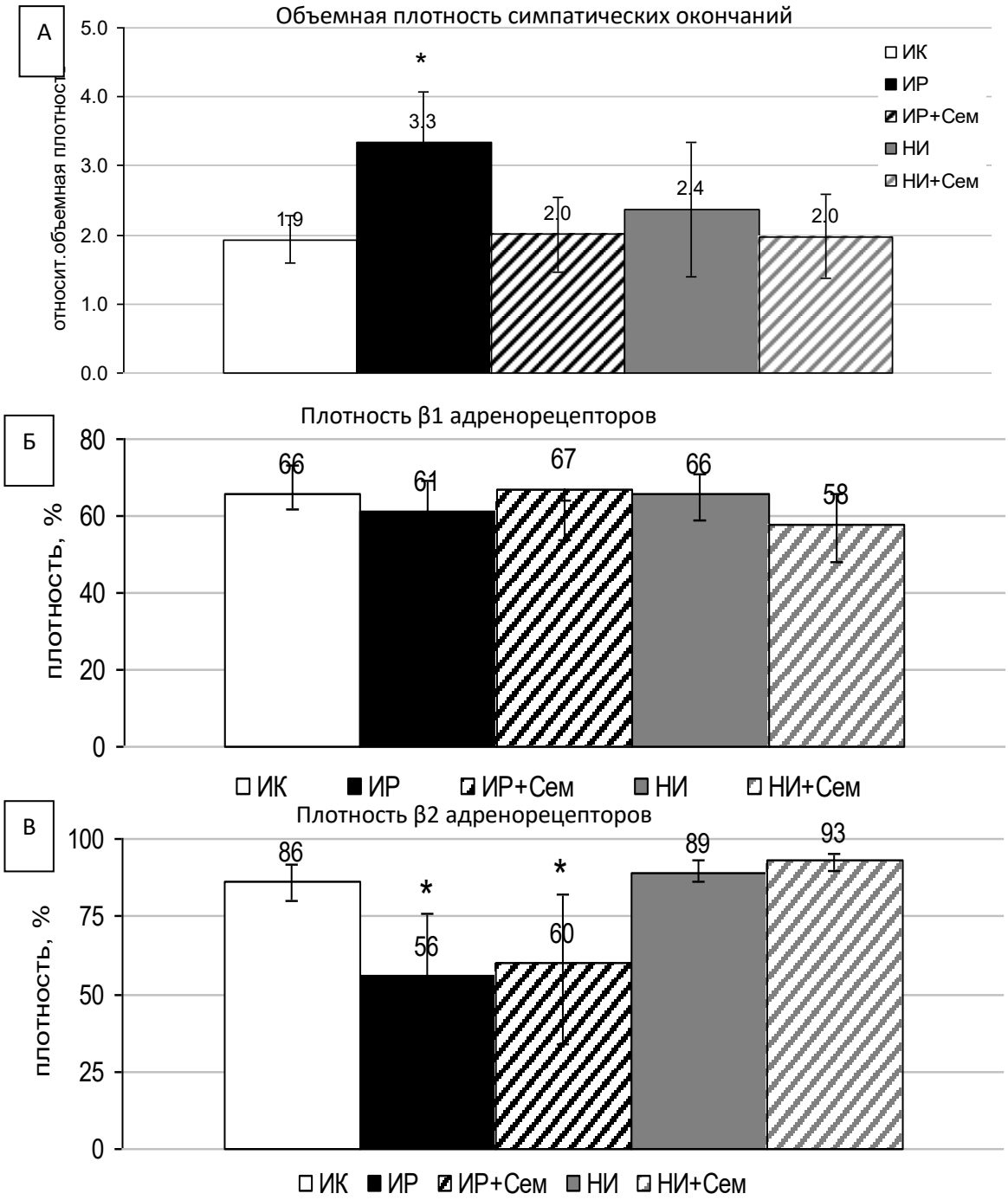


Рисунок 11. Относительная объемная плотность нервных окончаний (А), плотность β1-адренорецепторов (Б), плотность β2-адренорецепторов в межжелудочковой перегородке (В) через 28 суток после моделирования НИ и ИР. Условные обозначения: * - $p < 0,5$ – значимая разница по сравнению с ИК. Для А данные представлены как среднее арифм. ± станд.откл; для Б и В в виде медианы ± квартили U-критерий Манн-Уитни.

Гемодинамические изменения через 28 суток после моделирования НИ в инфарктной группе с Семаксом обнаружили признаки нарушений работы сердца, сравнимые с ИК (Таб. 22). Но, несмотря на то что результаты изменения гемодинамических параметров у двух групп с развитием инфаркта миокарда были практически одинаковы, Семакс сдерживал увеличение АДЛЖдиаст по сравнению с инфарктной группой. Интересно, что у ЛО животных Семакс повышал показатели сократимости и расслабления сердца.

Таблица 4. Параметры системной гемодинамики и параметры, характеризующие работу сердца, через 28 суток после НИ. § - p<0,05 между ЛО и ЛО+Сем, * - p<0,05 для групп НИ и НИ+Сем по сравнению со своими группами контроля ЛО животных по сравнению с исходным значением; $ - p<0,05 НИ по сравнению с НИ+Сем. Данные представлены как среднее арифм. ± станд.откл; U-критерий Манн-Уитни.

	ЛО	ЛО+Сем	НИ	НИ+Сем
АДср, мм рт. ст.	155,3 ± 6,9	153,4 ± 12,3	**139,9 ± 11,0 ***	**131,2 ± 13,6 ***
ЧСС, уд/мин	399,1 ± 0,3	401,5 ± 38,9	353,9 ± 44,1	361,3 ± 29,8
АДЛЖсист, мм рт. ст.	178,2 ± 7,5	184,0 ± 18,5	**159,5 ± 10,6 ***	**150,9 ± 16,8 ***
АДЛЖср, мм рт. ст.	101,6 ± 8,8	98, ± 14,5	106,5 ± 5,9	99,1 ± 11,8
АДЛЖдиаст, мм рт. ст.	12,4 ± 2,3	11,9 ± 2,0	**38,3 ± 7,3* $**	**26,4 ± 9,4* $**
+ dP/dt, мм рт. ст./с	3475,8 ± 239,2	**3734,4 ± 399,4 §**	**2520,2 ± 172,0 ***	**2674,3 ± 315,4 ***
- dP/dt, мм рт. ст./с	3358,2 ± 189,5	**3530,6 ± 356,9 §**	**2320,3 ± 297,5 ***	**2393,7 ± 286,3 ***

Влияние Семакса на уровень NO2-/NO3- в крови крыс с инфарктном миокарда.

Аналогично результату с моделированием ишемического инсульта, ишемия сердца приводила через 2,5 часа к увеличению в крови уровня конечных метаболитов NO (Табл. 9). В норме с мочой в сутки выводилось 2-5 мкмоль нитритов-нитратов, начиная с седьмых суток до 28 суток эксперимента в моче инфарктных и ложнооперированных крыс выведение увеличивалось в 1,7 раза.

Основной эффект Семакса проявляется в сдерживании увеличения концентрации нитритов и нитратов инфарктных и ложнооперированных животных через 2,5 часа после НИ в крови, и, начиная с седьмых суток после операции, в моче.

Таблица 9. Содержание нитратов в плазме крови крыс до и через 2,5 часа после моделирования необратимой ишемии, мкМ/л. * - p<0,05 – различия статистически значимы по сравнению с исходным уровнем в группах НИ и ЛО. Данные представлены как среднее арифм. ± станд.откл; критерий Вилкоксона.

	ЛО	ЛО+Сем	НИ	НИ+Сем
До операции	45,5 ± 6,5	48,3 ± 9,2	40,5 ± 11,5	48,3 ± 7,6
Через 2,5 часа после ишемии	51,8 ± 7,2	53,7 ± 6,7	**47,5 ± 8,1 ***	51,4 ± 6,8

Ишемия-реперфузия в течение 5 мин не приводила к изменению конечных метаболитов NO у инфарктных крыс (Рис. 12). Интересно, что внутрибрюшинное

введение Семакса в дозе 150 мкг/кг через 15 мин и 2 часа 15 мин после ишемии вызывало статистически значимое уменьшение концентрации нитритов и нитратов через пять мин после реперфузии. Через трое суток после реперфузии Семакс на падение концентрации нитритов и нитратов в крови не влиял.

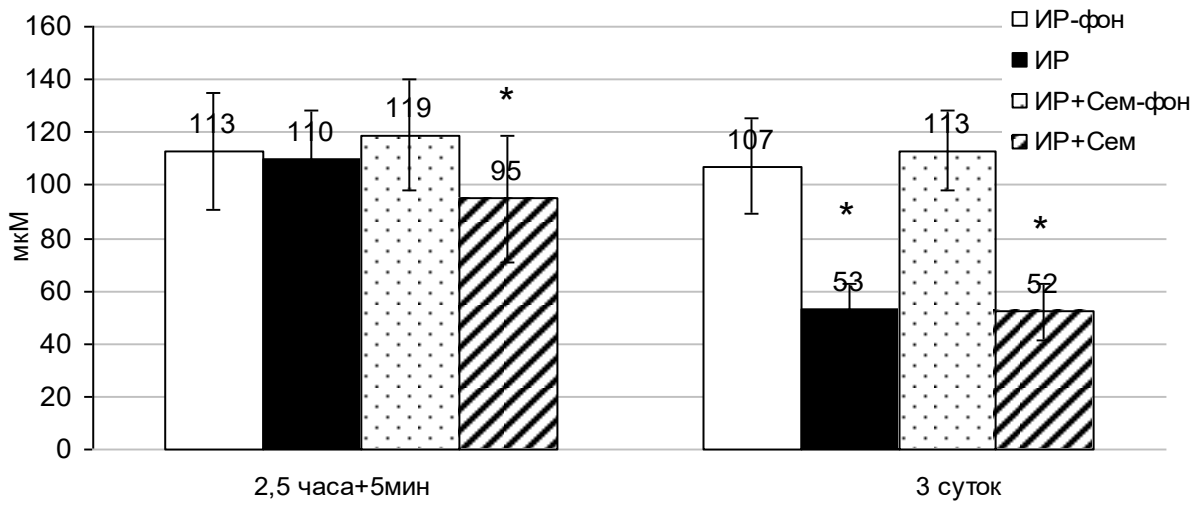


Рисунок 12. Влияние Семакса на концентрацию нитритов и нитратов в сыворотке крови крыс при развитии инфаркта миокарда в условиях 2,5 часов ишемии и 5 минут и 3 суток реперфузии. Данные представлены как среднее арифм. ± станд.откл; критерий Вилкоксона.

Как и при моделировании инсульта в экспериментах с прекондиционированием, повышение уровня конечных метаболитов NO в крови и моче животных отражает изменение их общего состояния и может возникать в острую стадию развития инфаркта в результате активации симпатического отдела нервной системы и нейрональной NOS, его влияния на тонус сосудов и активацию эндотелиальной NOS, а также вследствие высвобождения NO из депо. Несмотря на то, что данный процесс многофакторный, реперфузия снижает концентрацию NO в крови через трое суток после операции, а Семакс, влияя на развитие стресс реакции, сдерживает увеличение NO2-/NO3- через 2,5 часа после ишемии и снижает их концентрацию через 5 мин после реперфузии. Все это свидетельствует в пользу увеличения продукции NO в ответ на активацию симпатического отдела нервной системы в результате ишемии. Позднее может активироваться воспаление и ведущую роль приобретает индуцибельная изоформа фермента, причем начиная с 7 суток метаболиты NO интенсивнее выводятся с мочой. Таким образом, основное действие пептида направлено на стабилизацию метаболитов оксида азота в крови и моче крыс при необратимой ишемии. В реперфузионной модели Семакс вызывает снижение их концентрации через 5 минут после реперфузии.

Таким образом, исследование показало, что через 2,5 часа после перевязки левой коронарной артерии в области ишемии в миокарде крыс нет необратимых изменений клеток и не нарушена функция сердца, но на ультраструктурном уровне накапливаются изменения ядра, митохондрий, сократительного аппарата, свойственные энергетическому голоданию клеток. Реперфузия левой коронарной артерии через 2,5 часа от начала ишемии приводила к возникновению реперфузионного повреждения: развитию генерализованной воспалительной реакции и резкому снижению метаболитов оксида азота в крови. В хронический период происходит изменение ремоделирования иннервации сердца: повышение плотности адренергических окончаний и снижение плотности β2-адренорецепторов, развитие гипертрофии правого желудочка. Через трое суток после моделирования инфаркта миокарда ИР приводила к уменьшению размера клеток,

изменениям объема митохондрий, числа ММК и сократительного аппарата, которые имели противоположную направленность по отношению к признакам ишемизированных клеток. Есть основания полагать, что выявленные с помощью морфометрии противоположные по направленности механизмы изменения клеток имеют одинаковоеые происхождение и возникают как защитные в условиях ишемии.

Таким образом, нами изучен совершенно новый механизм действия пептида Семакс, заключающийся в его способности препятствовать гиперактивации СВНС. Семакс устранял различия ультраструктурных изменений при ишемии и ишемии-реперфузии, снижал апоптоз, повышал выживаемость кардиомиоцитов в областях вне зоны риска, улучшал функциональные способности сердца, уменьшал частоту сердцебиений в покое в острую стадию развития инфаркта, но не влиял на размер поражения и выживаемость крыс,

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение следует подчеркнуть, что вопрос об эффективной защите жизненно важных органов от ишемического повреждения остается открытым. Не вызывает сомнений, что длительность ишемии определяет тяжесть развития патологии (Eltzschig H.K. et al., 2011; Kalogeris T. et al., 2017). В тех случаях, когда ишемию можно предвидеть, используют прекондиционирование, протекторная роль которого подтверждена в эксперименте и клинике (Sprick J.D. et al., 2019; Jovanović A., 2018). Роль митохондриального пула $K^+_{АТФ}$-каналов в развитии феномена ишемического прекондиционировния и его отсроченной фазы, является ключевой.

В литературе рассматривались три возможные механизма повышения устойчивости клеток к ишемии с участием $K^+_{АТФ}$-каналов: 1. перестройка метаболической активности митохондрий вследствие открытия К+АТФ-каналов (LimK.H. etal., 2002), деполяризация, набухание матрикса, активация митохондриального дыхания на фоне усиления метаболизма жирных кислот (Grover G.J. etal., 2000); 2. предотвращение кальциевой перегрузки (MurataM. etal., 2001; KimM.Y. etal., 2006) и уменьшение вероятности образования Ca^{2+}-активируемой митохондриальной поры, открытие которой способствует развитию апоптоза (Миронова Г.Д. и др., 2007); 3. стимуляция продукции активных форм кислорода прекондиционированием и активаторами митохондриальных К+АТФ-каналов до уровня, достаточного для обеспечение значимого регуляторного ответа клетки (AndrukhivA. etal., 2006).

Активированные $K^+_{АТФ}$-каналы за время импульсной тренировки ишемией и реперфузией изменяют ионный состав матрикса митохондрий, продукцию активных форм кислорода и оксида азота (Рис. 13). В настоящий момент нет ясных представлений о роли обратной связи в изменениях метаболической активности в митохондриях и регуляции экспрессии белков клеткой. Мы впервые показали, что в результате открытия $K^+_{АТФ}$-каналов происходит структурная перестройка внутренней мембраны митохондрий: плотность $K^+_{АТФ}$-каналов уменьшается, а цитохром с оксидазы увеличивается почти в два раза, плотность ферментов, синтезирующих NO, не изменяется, как и сукцинатдегидрогеназы. Эти изменения объясняют, почему в прекондиционированных клетках при последующей ишемии не происходит снижения потенциала внутренней мембраны митохондрий (KatakamP.V. etal., 2007; KimM.Y. etal., 2006), поскольку чем меньше $K^+_{АТФ}$-каналов, тем меньше входящий калиевый ток при ишемии, меньше деполяризация мембраны, что является благоприятным условием для эффективной утилизации митохондриями субстратов и синтеза АТФ.

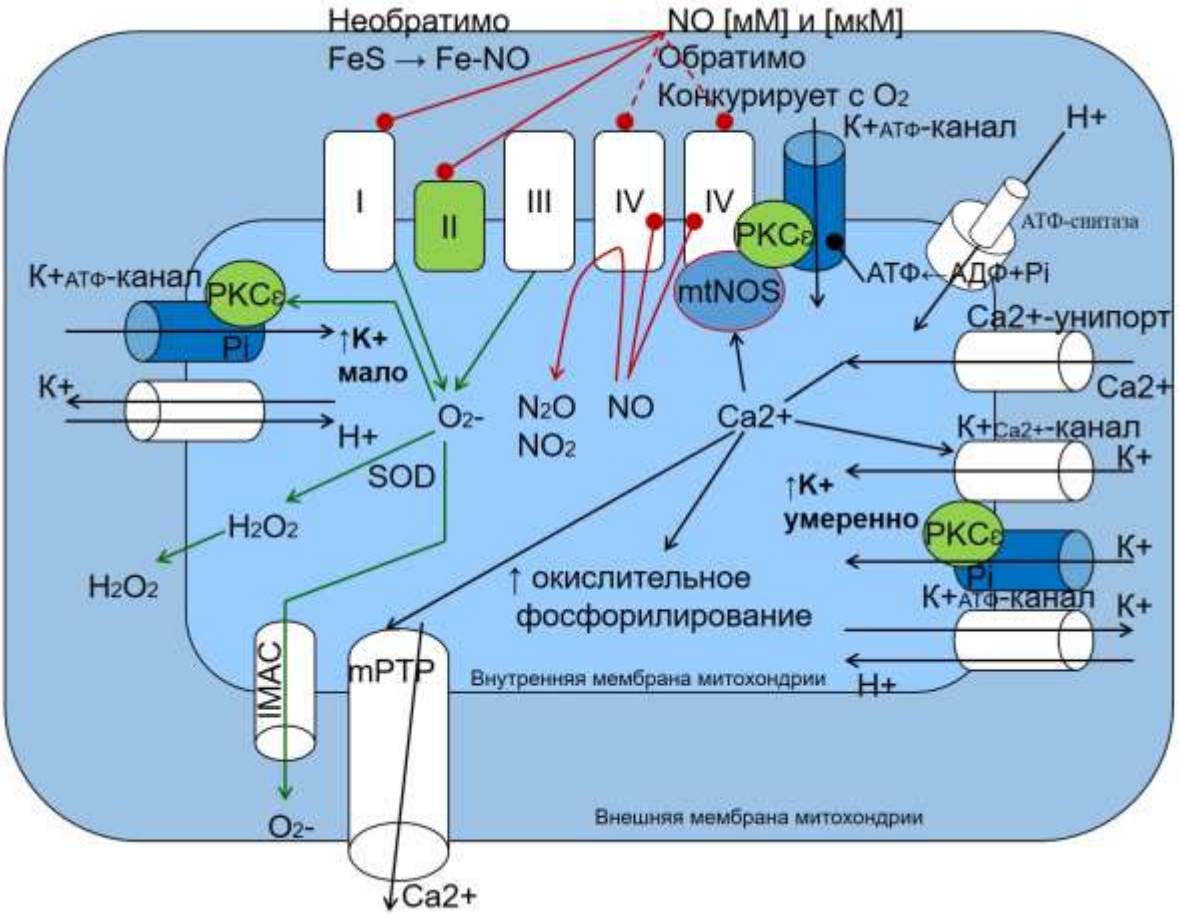


Рисунок 13. Возможная схема механизмов развития феномена прекондиционирования с учетом роли $K^+_{АТФ}$-каналов. Обобщение данных литературы и собственных результатов. I – НАДН-дегидрогеназа (комплекс 1 цепи переноса электронов), II – сукцинатдегидрогеназа (комлекс 2), III – убихинон цитохром с-оксиредуктаза (комплекс 3) IV -цитохром с-оксидаза (комплекс 4), SOD супероксид-дисмутаза, IMAC – анионный канал внутренней мембраны митохондрии, mPTP – митохондриальная пора переходной проницаемости, PKCε – протеинкиназа Cε, mtNOS – митохондриальная NO-синтаза.

Повышение активности цитохром с-оксидазы приводит к снижению продукции NO и уровня нитрозилирования белков. В норме NO конкурентно снижает чувствительность IV комплекса цепи переноса электронов к кислороду, без этого механизма фермент улавливает кислород вне зависимости от его концентрации. NO влияет на функциональную активность белков, включая $K^+_{АТФ}$-каналы, путем нитрозилирования. Суммарный эффект направлен на подавление активности NO-эргической системы в митохондриях, повышение чувствительности к кислороду и числа мест его связывания в условиях ишемии. Регуляторная роль сукцинатдегидрогеназы (респираторный комплекс II) тоже снижается, поскольку в этих условиях меньше вырабатывается активных форм кислорода, способных активировать митохондриальную протеинкиназу Cε (PKCε) (Коричнева и др., 2002), колокализованную с К+АТФ-каналами во внутренней митохондриальной мембране (Jabůreketal., 2006), и через нее открывать $K^+_{АТФ}$-каналы (Garlidetal., 2013). И, наконец, в этих условиях митохондрии приобретают способность поддерживать кальциевый гомеостаз, у них повышена чувствительность к общей активности клетки для обеспечения ее жизнеспособности

В большинстве случаев предвидеть развитие ишемии невозможно, и реперфузия является приоритетной для снижения повреждения ткани, смертности и инвалидизации. Реперфузионное повреждение рассматривают как мишень для терапии, полагая, что из-за злокачественных осложнений реперфузии следует пересмотреть первоочередную необходимость ее применения (Eltzschig H.K. et al., 2011; Kalogeris T. et al., 2017; Barzyc A. et al., 2020).

Наше исследование показало, что через 2,5 часа от начала ишемии в миокарде крыс нет необратимых изменений клеток, а основные признаки нарушений определяются в их биоэнергетической фабрике – митохондриях и ядре. Функционально в этот период сердце остается сохранным. Реперфузия, проведенная через 2,5 часа после ишемии, вызывала снижение нитритов и нитратов в крови крыс, а через трое суток приводила к снижению размера поражения, усилению воспалительной реакции и изменению моделирования. Через 28 суток в этой группе, по сравнению с группой с необратимой ишемией, выявились увеличение массы правого желудочка, разрастание нервных окончаний и снижение плотности β2 адренорецепторов, хотя размер рубца был одинаковым в группах НИ и ИР, функционально работа сердца в обеих моделях не различалась. Изменения в группе с реперфузией свидетельствуют, что по крайне мере в какой-то промежуток времени у животных развивается существенная сердечная недостаточность, возможно, из-за феномена «no-reflow» (Chen O.M. et al., 2018; Buono A. et al., 2019) или прямого повреждения воспалением.

Сравнительное исследование морфологии миокарда показало, что через трое суток после операции кардиомиоциты реагируют на окружающую среду разнонаправленными изменениями: необратимая ишемия проявляет тенденцию к увеличению площади поперечного сечения кардиомиоцитов по сравнению с интактным контролем, а реперфузия приводит к ее уменьшению; при необратимой ишемии уменьшается число ММК, а при реперфузии имеется тенденция к их увеличению; при реперфузии снижается уровень нитритов-нитратов в крови животных, а в ее отсутствие в ишемической модели увеличивается их элиминация с мочой, что отражает повышение их уровня в крови. В боковой стенке и перегородке сердца при необратимой ишемии морфометрически выявляется уменьшение площади, занимаемой митохондриями, а при ишемии-реперфузии обнаруживается тенденция к ее увеличению. По нашему мнению, видимые различия в реакции кардиомиоцитов на ишемию и ишемию-реперфузию хорошо объяснимы, если допустить, что во время ишемии, аналогично прекондиционированию, клетками запускаются механизмы их адаптации к ишемии, которые продолжают действовать при реперфузии, так же, как и при прекондиционировании. Во время ишемии происходят изменения проницаемости ионных каналов, фосфорилирование регуляторных белков, повышение концентрации «стресс-белков» и др., а также запуск транскрипции необходимых для выживания в условиях ишемии белков (Dirnagl U. et al, 2003; Barone F.C., 2005; Gidday J.M., 2006; Tinker A et al., 2018). В отличие от прекондиционирования, у ткани не остается времени на полноценную активацию защитных механизмов, и на нее действует не импульсный стимул ишемия-реперфузия, а только ишемия. Поэтому реперфузия, сопровождающаяся повышением содержания кислорода и поступления питательных веществ, приходится на клетки с «готовностью» к энергетическому голоданию, признаки которой мы наблюдали.

Семакс, примененный нами в этом исследовании как кардиопротектор, действует через снижение гиперактивации симпатического отдела нервной системы. Основные его эффекты выявлены морфологически и реализуются через повышение сохранности митохондрий, ядер и, как следствие снижение повреждений сократительного аппарата клетки. Семакс через 2,5 часа после операции практически устранял ультраструктурные признаки ишемии и различия, выявленные между НИ и ИР с помощью морфометрии. В конечном итоге пептид препятствует апоптозу, в дальнейшем снижает гипертрофию

кардиомиоцитов при сохранении соотношение объемной плотности миофибрилл и митохондрий, увеличивает их число в выжившей части миокарда, поддерживает функцию сердца и ее регуляцию при развитии инфаркта, не влияя при этом на размер повреждения.

Таким образом, в проведенном нами исследовании обнаружены общие закономерности, характерные для реализации феномена прекондиционирования, механизмов защиты клеток от ишемического повреждения и изменения их реакции во время реперфузии. Эта общность обусловлена изменением функционирования митохондрий, обеспечивающих энергетическую устойчивость клеток к ишемии.

Анализ современной литературы показал, что в реализации ишемического поражения, ишемического прекондиционирования, при кардио- и нейропротекции задействованы одни и те же механизмы (Eltzschig HK et al., 2011; Wu J. et al., 2013; Sciarretta S. et al., 2015; Zhang D.Y., Anderson A.S., 2014; Kalogeris T. et al., 2017; Zhang Z. et al., 2018; Jovanović A., 2018; Chen Q.M. et al., 2017; Sprick J.D. et al., 2019; Kulek A.R. et al., 2020; Penna C., 2020; Ramez M. et al., 2020; Sakakima H., 2020; Barzyc A., 2020). Основными сигнальными путями для реализации защитных реакций при ишемии, гипоксии и реперфузии считают PI3K/Akt-, HIF-1- и Nrf2-активируемые каскады, при этом исследования, связанные с оценкой качества митохондрий в поврежденной ткани и репаративным донорством митохондрий быстро набирают силу (Kulek A.R. et al., 2020). Однако при современных подходах многие ключевые моменты остаются неизученными. Например, не ясно, каково участие механизмов, запущенных при ишемии, в реперфузионном повреждении, как долго эти механизмы остаются активированными, как митохондрии реализуют сигналинг о необходимости структурных перестроек, как все эти изменения отражаются на функции органов и почему в некоторых случаях защитный эффект оказывается избирательным, как при действии Семакса, только в отношении выжившей части миокарда, почему прекондиционирование улучшает выживание нейронов и не влияет на глиоз. Указанные вопросы. возникают, исходя из полученных нами данных, и требуют дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. $K^+_{АТФ}$-каналы не участвуют в формировании некроза во время развития ишемического инсульта, поскольку введение неселективного блокатора $K^+_{АТФ}$-каналов глибенкламида за 30 мин до индукции ишемии на размер некротического очага не влияет.
2. Нейропротекторное действие на мозг в отсроченный период ишемического прекондиционирования реализуется в результате активации митохондриальных $K^+_{АТФ}$-каналов и сопровождается уменьшением размеров очага некроза за счет повышения выживаемости нейронов, тогда как на глиоз прекондиционирование не влияет.
3. Активация $K^+_{АТФ}$-каналов в результате прекондиционирования приводит к структурно-функциональным перестройкам внутренней мембраны митохондрий, таким как уменьшение экспрессии белка митохондриальных $K^+_{АТФ}$-каналов, усиление экспрессии цитохром с-оксидазы (COX1). В результате происходит снижение активности NO-эргической системы, что способствует улучшению работы митохондрий при ишемии и объясняет повышение выживаемости нейронов в отставленный период прекондиционирования.
4. Через 2,5 часа от начала ишемии необратимых гистохимических, морфологических и ультраструктурных изменений кардиомиоцитов не происходит, хотя в митохондриях и ядрах этих клеток заметны признаки энергетического дефицита. В функциональном отношении сердце наркотизированных крыс, так же, как и контрольных, справляется с нагрузкой добутамином.

5. Реперфузия после 2,5 часовой ишемии не оказывает кардиопротекторного действия, но вызывает увеличение смертности крыс и постепенное развитие сердечной недостаточности, сравнимое с необратимой ишемией. К особенностям постреперфузионного ремоделирования сердца, по сравнению с необратимой ишемией, относятся гипертрофия правого желудочка, разрастание нервных окончаний в перегородке и уменьшение плотности β2-аренорецепторов.

6. Через 72 часа после ишемии размеры кардиомиоцитов в зоне риска увеличиваются, а митохондрий, так же, как и количество межмитохондриальных контактов в боковой стенке левого желудочка, уменьшаются. Реперфузия вызывает противоположные изменения этих показателей, что, по-видимому, отражает процесс адаптации клеток к условиям ишемии. Семакс препятствует появлению признаков ишемии клеток через 2,5 часа и нивелирует межгрупповые различиям через трое суток после операции.

7. Применение Семакса устраняет гиперактивацию симпатического отдела нервной системы, что в острую стадию ишемии и ишемии-реперфузии улучшает состояние митохондрий, ядер и кардиомиоцитов вне ишемизированной области и способствует более благоприятному ремоделированию. Основное протекторное действие Семакса обусловлено сохранением сбалансированности сократительного и митохондриального аппаратов.

8. Повышение уровня метаболитов NO в крови отражает скорее системные процессы, чем события в ишемизированной ткани, поскольку снижение содержания NO в коре головного мозга животных сопровождается повышением уровня NO2-/NO3- в крови через 5 часов после инсульта, и в этот срок NO связан в большей степени с Т-конформером гемоглобина. При развитии инфаркта миокарда уровень метаболитов NO повышен начиная с 2,5 часов после операции в крови, и с 7 по 28 сутки – в моче. Прекондиционирование, Семакс и реперфузия оказывают защитный эффект, препятствуя повышению уровня NO2-/NO3-.

9. Активация эндогенных протекторных механизмов с помощью прекондиционирования или фармакологического действия пептидного препарата Семакс оказывает защитное действие на ишемизированную ткань, причем в обоих случаях в механизмы защиты вовлечены митохондрии.

СПИСОК НАУЧНЫХ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В ЖУРНАЛАХ SCOPUS, WOS, RSCI, А ТАКЖЕ В ИЗДАНИЯХ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ ДЛЯ ЗАЩИТЫ В ДИССЕРТАЦИОННОМ СОВЕТЕ МГУ, ПО СПЕЦИАЛЬНОСТЯМ: ФИЗИОЛОГИЯ; КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ, ЦИТОЛОГИЯ, ГИСТОЛОГИЯ

1. Deryagin O.G., Gavrilova S.A., Gainutdinov K.L. et al. Molecular bases of brain preconditioning // Frontiers in neuroscience. — 2017. — V. 11. — P. 1-12. (IF= 3.99, Scopus)
2. Дерягин О.Г., Гаврилова С.А., Буравков С.В. и др. Роль АТФ-чувствительных калиевых каналов и оксида азота в защитном эффекте прекондиционирования мозга // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова. — 2016. — Т. 116, №2. — С. 16–22. (IF= 0,746, Scopus, WoS, RSCI)
3. Gainutdinov K.L., Gavrilova S.A., Iyudin V.S. et al. Epr study of the intensity of the nitric oxide production in rat brain after ischemic stroke // Applied Magnetic Resonance. — 2011. — V.40. — P. 267–278. (IF= 0,72, Scopus)
4. Худоерков Р.М., Самойленкова Н.С., Гаврилова С.А. и др. Прекондиционирование как метод нейропротекции при моделировании инфаркта мозга // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. — 2009. — Т. 3, №

2. — С. 26–30. (IF= 1,083, Scopus – с 2019 года, поэтому IF с сайта самого журнала, в базе Scopus пока без него)
5. Самойленкова Н.С., Гаврилова С.А., Кошелев В.Б. Защитный эффект гипоксического и ишемического прекондиционирования при локальной ишемии мозга крыс // Доклады Академии наук. — 2007. — Т. 14, № 2. — С. 283–285. (IF= 0,63, Scopus, WoS, RSCI)
6. Kurenkova A.D., Andreeva L.A., Umarova B.A. et al. The connection between structure modification and anti-inflammatory effects of prolyl-glycyl-proline (pgp) // International Journal of Peptide Research and Therapeutics. — 2017.—V. 24, N 3. — P. 347-353. (IF= 1,06, Scopus)
7. Гаврилова С. А., Марков М.А., Бердалин А.Б. и др. Изменение симпатической иннервации сердца крысы при экспериментальном инфаркте миокарда; влияние пептида Семакс// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2017. — Т. 163, № 5. — С. 570–574. (IF= 0,6, Scopus, WoS, RSCI) 0,57
8. Иванов Е. В., Бердалин А.Б., Волкова Ю.Л. и др. Особенности экспрессии мРНК индуцибельной no-синтазы и инфильтрации воспалительными клетками миокарда крысы в моделях необратимой ишемии и ишемии—реперфузии через 2-4 ч ишемии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2017. — Т. 164, № 9. — С. 268–273. (IF= 0,6, Scopus, WoS, RSCI) 0,57
9. Ахметшина М.Р., Бердалин А.Б., Гаврилова С.А. Динамика воспалительного ответа в инфарктном миокарде крыс в модели ишемии-реперфузии. Морфометрический анализ // Технологии живых систем. — 2015. — Т.12, №1. — С.24–33. (IF= 0,184, WoS, RSCI)
10. Бердалин А.Б., Голубева А.В., Гаврилова С.А. и др. Влияние семакса на ультраструктуру миокарда крыс при необратимой ишемии и ишемии-реперфузии // Технологии живых систем. — 2011. — Т.8, №6. — С.51–58. (IF= 0,184, WoS, RSCI)
11. Манухина Е.Б., Каленчук В.У., Гаврилова С.А., Горячева А.В., Малышев И.Ю., Кошелев В.Б. Органоспецифичность депонирования оксида азота в стенках кровеносных сосудов при адаптации к гипоксии // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. — 2008. — Т. 94; № 2. — С. 198–205. (IF= 0,556, WoS)
12. Голубева А.В., Гаврилова С.А., Липина Т.В. и др. Защитное действие пептида семакс в острую стадию инфаркта миокарда крыс // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. — 2006. — Т. 92, № 6. — С. 732–745. (IF= 0,556, WoS)
13. Гаврилова С.А., Голубева А.В., Липина Т.В. и др. Протекторное влияние пептида семакс на процессы ремоделирования миокарда и развитие сердечной недостаточности у крыс в отставленный постинфарктный период // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. — 2006. — №11. — С.1305–1321. (IF= 0,556, WoS)
14. Akhmetshina M.R., Morozova M.P., Gavrilova S.A. et al. Acceleration of heart function recovery by peptide ix (29–40 mcp-1) after myocardial ischemia-reperfusion in rats // Technologies of Living Systems. — 2019. — Vol. 16, no. 3. — P. 21–37. (IF= 0,184, WoS, RSCI)
15. Ахметшина М.Р., Морозова М.П., Лукошкова Е.В. и др. Замедление воспаления и снижение работоспособности миокарда пептидом x, фрагментом хемокина MCP-1, у крыс в модели ишемии-реперфузии. // Технологии живых систем. — 2019. — Т. 16, № 2. — С. 12–23. (IF= 0,184, WoS, RSCI)
16. Исхакова М.Р., Шарова М.В., Бердалин А.Б. и др. Влияние пептидов ix и x, фрагментов хемокина mcp-1, на изменение массы, смертности крыс и морфологии миокарда в модели ишемии-реперфузии. // Технологии живых систем. — 2017. — Т. 14, № 6. — С. 48–54. (IF= 0,184, WoS, RSCI)

17. Gorbacheva A.M., Berdalin A.B., Stulova N.A. et al. Changes in sympathetic innervation of rat caudal artery in experimental myocardial infarction. Effect of semax peptide. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. — 2016. — Vol. 161, no. 4. — P. 476–480. (IF= 0,6, Scopus, WoS, RSCI)
18. Куренкова А.Д., Умарова Б.А., Гаврилова С.А. Влияние пролил-глицил-пролина (pgp) и его ацетилированной формы (n-acpgp) на проницаемость сосудов кожи крыс. // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. — 2016. — Т. 102, № 9. — С. 95–103. (IF= 0,556, WoS)
19. Гаврилова С.А., Липина Т.В., Загидуллин Т.Р. и др. Протекторное действие лорноксикама на развитие инфаркта миокарда у крыс в условиях ишемии и ишемии-реперфузии / // Кардиология. — 2008. — Т. 48, № 12. — С. 42–48. (IF= 0,10, Scopus, RSCI)

СПИСОК НАУЧНЫХ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В ЖУРНАЛАХ, ВХОДЯЩИХ В ПЕРЕЧЕНЬ ИЗДАНИЙ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ ВАК ПРИ МИНОБРНАУКИ РОССИИ

1. Самойленкова Н.С., Гаврилова С.А., Кошелев В.Б. Нейропротекторный и ангиопротекторный эффекты ишемического/гипоксического прекондиционирования мозга // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2008. — Т. 1, № 25. — С. 82–92. (IF=0,318 RINC)
2. Гаврилова С.А., Самойленкова Н.С., Пирогов Ю.А. и др. Нейропротекторный эффект гипоксического прекондиционирования при фокальной ишемии мозга крыс // Патогенез. — 2008. — Т. 6, № 3. — С. 13–17. (IF=0,505 RINC)
3. Самойленкова Н.С., Гаврилова С.А., Дубина А.И. и др. Роль АТФ-зависимых калиевых каналов в процессе гипоксического и ишемического прекондиционирования у крыс с фокальной ишемией мозга // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2007. — Т. 6, № 4. — С. 68–77. (IF=0,318 RINC)
4. Бердалин А.Б., Гаврилова С.А., Голубева А.В. и др. Влияние семакса на апоптотическую гибель кардиомиоцитов крыс при необратимой ишемии и ишемии-реперфузии// Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. — 2011. — №2. — С.13–20. (IF= 0,125, RSCI)
5. Гаврилова С.А., Голубева А.В., Липина Т.В. и др. Кардиопротекторный эффект пептидного препарата семакс в условиях экспериментального ишемического и реперфузионного повреждения миокарда // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2008. — Т.7, №3. — С.71–79. (IF=0,318 RINC)

СТАТЬИ В СБОРНИКАХ

1. Иванов Е. В., Давыдова М. П., Гаврилова С. А. Особенности экспрессии индуцибельной no-синтазы в сердце крыс в разных моделях инфаркта миокарда // Материалы республиканской научно-практической конференции Кислород и свободные радикалы. — УО ГрГМУ Гродно. Гродно, Беларусь. — 2014. — С. 77–79.
2. Кошелев В. Б. , Гаврилова С. А. , Фадюкова О. Е. и др. Нейропротекторные свойства пептидов семейства меланокортинов // Фундаментальные науки – медицине. — Т. 1. — Минск. — 2013. — С. 371–374.

3. Гайнутдинов Х. Л. , Гаврилова С. А. , Голубева А. В. и др. Изменение интенсивности продукции оксида азота в отделах мозга и в крови крыс после ишемического инсульта : исследование методом ЭПР спектроскопии // Закономерности развития патологических состояний и их коррекция: материалы международной конференции. — Бизнесофсет Минск. — 2009. — С. 51–54.
4. Гаврилова С. А. , Голубева А. В. , Андрианов В.В. и др. Изменение содержания оксида азота в мозге крыс в процессе развития фокального ишемического инсульта // Закономерности развития патологических состояний и их коррекция: материалы международной конференции. — Бизнесофсет Минск. — 2009. — С. 43–46.
5. Гаврилова С. А. , Голубева А. В. , Бердалин А. Б. и др. Семакс снижает уровень апоптоза в сердце крыс в условиях ишемии-реперфузии // Закономерности развития патологических состояний и их коррекция: материалы международной конференции. — Бизнесофсет Минск. — 2009. — С. 47–50.
6. Гаврилова С. А. , Голубева А. В. , Липина Т. В. и др. Защитное действие пептида семакс на миокард крыс в острый и хронический постинфарктные периоды // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. Материалы Российско-норвежского научного симпозиума Защита миокарда: молекулярные, патофизиологические и клинические аспекты. — Т. 7. — СП Минимакс СПб. — 2008. — С. 18–19.
7. Кошелев В. Б. , Гаврилова С. А. , Самойленкова Н. С. и др. Защитные эффекты гипоксического прекондиционирования при острых экспериментальных нарушениях мозгового кровообращения геморрагического и ишемического типов // Проблемы регуляции висцеральных функций. Сборник научных статей. — Ривш Минск. — 2008. — С. 74–78.

ОСНОВНЫЕ ТЕЗИСЫ

1. С. А. Гаврилова, О. Г. Дерягин, Х. Л. Гайнутдинов, С. В. Буравков, В. Б. Кошелев. Механизмы ишемического прекондиционирования мозга: система оксида азота и АТФ-чувствительные калиевые каналы: материалы Всероссийской с международным участием школы-конференции по физиологии и патологии кровообращения, Москва, февраль, 2020. С. 31–32.
2. T. Kh Bogodvid, O. G. Deryagin, S. A. Gavrilova, S. V. Buravkov, V. V. Andrianov, G. G. Yafarova, Kh L. Gainutdinov, and V. B. Koshelev. The role of atp-sensitive potassium channels and nitric oxide in the brain stroke: European Journal of Clinical Investigation, 2019. V. 49, N. 51. P. 161.
3. С. А. Гаврилова, О. Г. Дерягин, В. Б. Кошелев. Молекулярно-физиологические механизмы устойчивости мозга к ишемии в результате прекондиционирования: материлы XV Международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии», Судак, июнь, 2019. С. 129–130.
4. Gavrilova S.A., Deryagin O.G., Gainutdinov Kh.L., Andrianov V.V., Golubeva A.V., Yafarova G.G., Iyudin V.S., Buravkov A.V., Koshelev V.B. Effect of activation and inhibition of K^+-ATP - channels on the NO production in the blood of rats with ischemic stroke: International conference “Modern development of magnetic resonance-2016”. Kazan, November, 2016. P. 130-131.
5. Е. В. Иванов, М. А. Марков, М. П. Давыдова, С. А. Гаврилова. Динамика экспрессии мРНК индуцибельной no-синтазы в миокарде крыс в ранние сроки ишемии и ишемии-реперфузии: материалы 11 Международного

междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии», Судак, июнь, 2015. С. 176–177.
6. В. Б. Кошелев, С. А. Гаврилова, О. Е. Фадюкова, М. П. Морозова, Е. А. Кулага, Л. А. Андреева, Н. Ф. Мясоедов. Пептиды семейства меланокортинов оказывают нейропротекторное действие при экспериментальной ишемии мозга: материалы II научной конференции «Физиологическая активность регуляторных пептидов», Москва, 2015. С. 14–15.
7. А. Б. Бердалин, М. П. Морозова, А. М. Горбачева, А. Н. Стулова, С. А. Гаврилова, В. Б. Кошелев. Ремоделирование иннервации постинфарктного сердца крыс, влияние пептидного препарата Семакс: материалы 11 Международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии», Судак, июнь, 2015. С. 85–86.
8. B. Berdalin, S. A. Gavrilova, A. D. Nikogosova, D. A. Bazhenova, A. M. Gorbacheva, G. F. Gubaidullina, E. O. Lebedeva, A. M. Romanyuk, A. N. Stulova, S. V. Buravkov, V.B. Koshelev. Effect of the peptide drug semax on sympathetic innervation of rat's heart and vessels after experimental myocardial infarction: материалы сборник статей международного симпозиума «Biological Motility: New facts and hypotheses», Пущино, 2014. С. 34–36.
9. С. А. Гаврилова, О. Г. Дерягин, Е. А. Кулага, М. П. Морозова, Л. А. Андреева, С. В. Буравков, В. Б. Кошелев. К вопросу о механизмах нейропротекции при экспериментальном ишемическом инсульте: материалы III Российского Международного Конгресса «Цереброваскулярная патология и инсульт», Казань, 2014.
10. О. Г. Дерягин, С. А. Гаврилова, А. В. Голубева, В. В. Андрианов, Г. Г. Яфарова, Х. Л. Гайнутдинов, В. Б. Кошелев. Роль АТФ-зависимых калиевых каналов и системы оксида азота в реализации нейропротекторного эффекта прекондиционирования: материалы IX Международного Междисциплинарного Конгресса «Нейронаука для медицины и психологии», Судак, июнь, 2013. С. 129–129.
11. С. А. Гаврилова, А. Б. Бердалин, А. В. Голубева, А. Д. Беневоленская, С. В. Буравков, В. Б. Кошелев. Семакс защищает сердце от реперфузионного повреждения через сдерживание активности симпатического отдела вегетативной нервной системы: материалы VI Российского симпозиума «Белки и пептиды», Уфа, 2013. С. 109–109.
12. С. А. Гаврилова, А. Б. Бердалин, М. П. Морозова, А. В. Голубева, М. Р. Ахметшина, М. В. Сидорова, Ж. Д. Беспалова, Т. Л. Красникова, Т. И. Арефьева, С. В. Буравков, В. Б. Кошелев. Тактики защиты сердца от реперфузионного повреждения.Результаты экспериментальных исследований: материалы конференции «Кардиопротекция - от эксперимента к клинической практике», Санкт-Петербург, 2013. С. 3.
13. О. Г. Дерягин, С. А. Гаврилова, В. В. Андрианов, В. С. Июдин, Г. Г. Яфарова, Х. Л. Гайнутдинов, В. Б. Кошелев. Нейропротекция при экспериментальном ишемическом прекондиционировании: роль АТФ-зависимых калиевых каналов и системы оксида азота: материалы VIII Всероссийская конференция с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем», Санкт-Петербург, сентябрь, 2012С. 72–73.

БЛАГОДАРНОСТИ

С большим теплом выражаю глубокую благодарность своим Учителям, своим Ученикам и своим Детям. Они многому меня научили и продолжают учить.

Сердечно благодарю свою семью, всех коллег, друзей, родных, людей, идущих по жизни рядом со мной или просто прикоснувшихся к моей жизни за помощь, за бесценное чудо общения, за жизнь. Спасибо.