

ОБРАЗОВАНИЕ И ВЫБРОС ПРЕДСЕРДНОГО НАТРИЙУРЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА В КАРДИОМИОЦИТАХ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ МЕКСИДОЛА В РАННЕМ ПОСТРЕПЕРФУЗИОННОМ ПЕРИОДЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

БУГРОВА М.Л.¹, ЯКОВЛЕВА Е.И.¹, ЕРМОЛИН И.Л.²

THE EFFECT OF MEXIDOL ON SYNTHESIS AND SECRETION OF ATRIAL NATRIURETIC PEPTIDE IN CARDIAC MYOCYTES IN EARLY POSTREPERFUSION PERIOD IN EXPERIMENT

BUGROVA M.L., YAKOVLEVA E.I., ERMOLIN I.L.

¹Центральная научно-исследовательская лаборатория (зав. лабораторией – профессор И.В. Мухина); ²кафедра гистологии с цитологией и эмбриологией (зав. кафедрой – профессор И.Л. Ермолин) ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава РФ.

Методами иммуноцитохимии, трансмиссионной электронной микроскопии, световой микроскопии исследовали воздействие мексидола на образование и выброс предсердного натрийуретического пептида в кардиомиоцитах крыс в раннем постреперфузионном периоде. Выявили значительное увеличение количества гранул кардиомиоцитов, содержащих предсердный натрийуретический пептид, на фоне сохранения ультраструктуры миокарда. Полученные данные свидетельствуют о стимулирующем влиянии мексидола на синтез и выведение предсердного натрийуретического пептида, связанном с цитопротекторными свойствами препарата в раннем постреперфузионном периоде.

Ключевые слова: предсердный натрийуретический пептид, мексидол, ранний постреперфузионный период.

By using methods of immunocytochemistry, transmission electron microscopy, light microscopy we studied the effect of mexidol on synthesis and secretion of atrial natriuretic peptide in cardiac myocytes in rats in early postreperfusion period. We found significant increase in the number of granules contain atrial natriuretic peptide in cardiac myocytes and preserve myocardial ultrastructure. These materials informed about positive effect of mexidol on atrial natriuretic peptide accumulation and release due to cytoprotective properties of the drug in early postreperfusion period.

Keywords: atrial natriuretic peptide, mexidol, early postreperfusion period.

Введение. Предсердный натрийуретиче-

ский пептид (ПНП) способен снижать артериальное давление и поддерживать водно-солевой баланс путем стимуляции диуреза, натрийуреза [1]. Эффекты ПНП в основном сводятся к антагонизму с ренин-ангиотензин-альдостероновой системой [2]. ПНП синтезируется и накапливается в гранулах секреторных кардиомиоцитов (КМЦ) предсердий и выбрасывается в ответ на механическое растяжение стенок сердца, гипоксию, солевые нагрузки, ишемию миокарда, воздействие лекарственных средств.

В настоящее время ПНП, выделенный из плазмы крови, используется в клинике для диагностики осложнений у пациентов с хронической сердечной недостаточностью, артериальной гипертензией, инфарктом миокарда и сахарным диабетом [3]. Активно исследуется возможность терапевтического применения пептида [4]. В связи с этим, изучение синтеза и выброса ПНП в условиях сердечно-сосудистой патологии является актуальной проблемой.

В терапии постреанимационных осложнений применяют препараты, действия которых направлены на коррекцию метаболических нарушений в условиях гипоксии (антигипоксантами метаболического типа). Среди таких фармакологических средств широкое распространение получил мексидол (сукцинатсодержащее производное 3-оксипиридина) [5, 6]. В экспериментах и в клинике было показано нейро- и кардиопротекторное действие мексидола в постреперфузионном периоде (ПРП) [7]. Однако несмотря на большое количество работ, посвященных изучению воздействия препарата на ультраструктуру клеток различных органов, влияние мексидола на ПНП в условиях ишемии и реперфузии не исследовано.

Цель исследования – изучить процессы накопления и выброса предсердного натрийуретического пептида (ПНП) в гранулах кардиомиоцитов при введении мексидола в условиях раннего постреперфузионного периода у крыс.

Материал и методы исследования. Экс-

Таблица.

Изменение количественных показателей ультраструктуры кардиомиоцитов через 60 минут постреперфузионного периода при введении мексидола, мкм² ((M±SD)

Отдел сердца	Показатель	Интактные	60 мин ПРП	60 мин ПРП с мексидолом
Правое предсердие	Пл. Мх	6,82±2,14	7,58±2,13	8,79±2,55*#
	Пл. Мф	15,50±2,79	15,70±4,51	16,11±3,01
	Пл. СПР	0,31±0,22	0,50±0,29*	0,35±0,38#
	Пл. саркоплазмы	9,77±2,90	8,91±3,38	7,31±2,46*#
Левый желудочек	Пл. Мх	10,68±3,18	11,8±1,86	12,29±2,26
	Пл. Мф	18,08±3,21	15,74±1,76*	15,10±2,79*
	Пл. СПР	0,09±0,07	0,93±0,57*	0,31±0,21*#
	Пл. саркоплазмы	3,56±1,04	3,94±1,75	3,70±1,44

Примечание: * - различия значений достоверны относительно интактных животных; # - различия значений достоверны относительно животных через 60 мин ПРП (p<0,05).

периментальное исследование проводили на 15 нелинейных крысах-самцах, массой 220-250 г. Анализировались 3-и группы животных: интактные (n=5), контрольные (60 мин ПРП, n=5) и опытные (60 мин ПРП с введением мексидола, n=5). В опытной группе мексидол вводили после реанимации внутрибрюшинно в течение первого часа дробно в дозе 25 мг/кг через каждые 20 минут. Все исследования на животных были выполнены в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1984); «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (принятой 18.03.1986г. и подтвержденной 15.06.2006г.); «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза СССР от 13.11.1984г. №724). Была использована модель 10 минутной тотальной ишемии по В.Г. Корпачеву [8]. Для электронно-микроскопического анализа образцы правого предсердия (ПП) и левого желудочка (ЛЖ) готовили по стандартной методике и анализировали в электронном микроскопе Morgagni 268D (FEI, США). Для выявления локализации ПНП на ультратонких срезах осуществляли иммуноцитохимические реакции с поликлональными антителами Rabbit anti-Atrial Natriuretic Factor (1-28) (rat) (Peninsula Laboratories, LLC, Bachem, США), и антителами Protein-A/Gold (15 nm) (EM Grade, Electron Microscopy Sciences, США). Образование и выброс ПНП оценивали по количеству А - и В – типов меченых гранул предсердных КМЦ в полях зрения (38x38 мкм²) по методике: гранулы

А – типа, «зрелые, запасающие», имеют четкую мембрану и осмиофильное содержимое; гранулы В – типа, «растворяющиеся», не имеют мембрану, содержат менее электронно-плотное содержимое (рис. 1) [9]. На электронных микрофотографиях с увеличением x14000 с помощью программы AnalySIS проводили морфометрический анализ площадей митохондрий (Мх), миофибрилл (Мф), саркоплазматического ретикулума (СПР) и свободной саркоплазмы КМЦ ПП и ЛЖ. Для исследования на светооптическом уровне образцы ЛЖ фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и заливали в парафин [10]. Приготовленные на микротоме SM 2000R (Leica, Австрия) срезы 5 – 7 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином и изучали с помощью светового микроскопа Eclips 80i (Nikon, Япония). Все результаты оценивали с помощью критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при p<0,05.

Результаты исследования и их обсуждение. Морфометрический анализ ультратонких срезов ПП опытной группы показал достоверное увеличение числа гранул с ПНП – иммунореактивным материалом по сравнению с интактной и контрольной сериями животных, что свидетельствовало об усилении накопления и выведения пептида. Отличия с интактными крысами были следующие: гранул А – типа увеличилось на 80%, гранул В – типа на 106%, а их общее количество на 87%. Сравнение с контрольной серией показало: число гранул А – типа повысилось на 38%, гранул В – типа на 42%, общее число гранул на 37% (рис. 2).

Гистологический анализ миокарда ЛЖ жи-

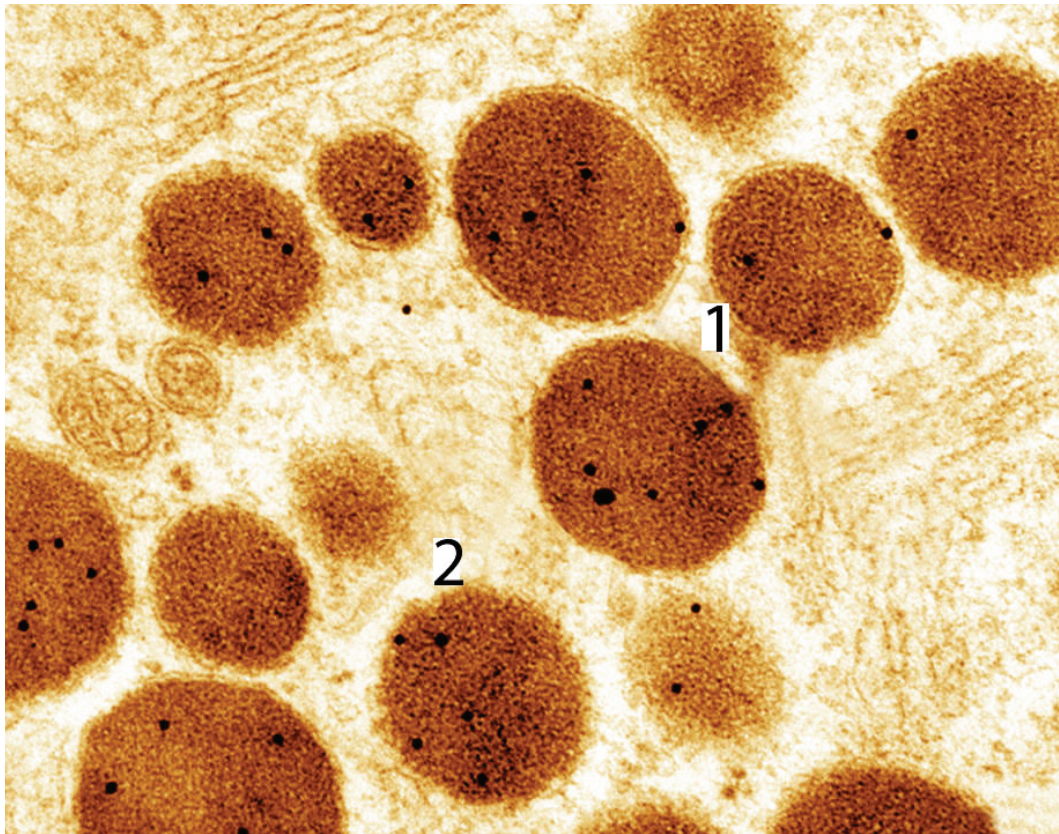


Рис. 1. Иммуноцитохимическое выявление предсердного натрийуретического пептида в гранулах кардиомиоцитов правого предсердия крысы: 1 – гранулы А – типа; 2 – гранулы В – типа. Электроннограмма. Ув. 56000.

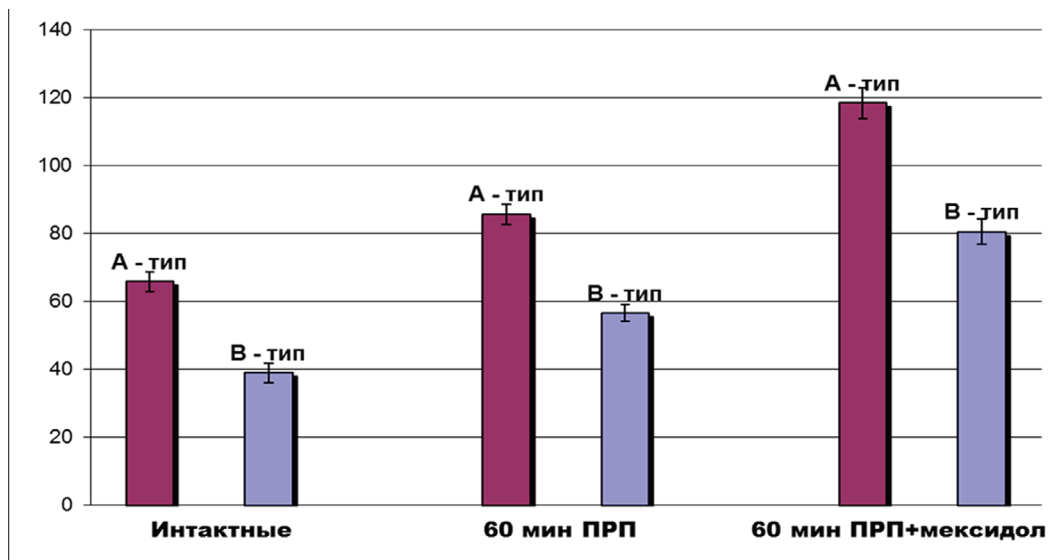


Рис. 2. Количественное распределение гранул с ПНП у интактных, контрольных и опытных животных (по тесту Манна-Уитни).

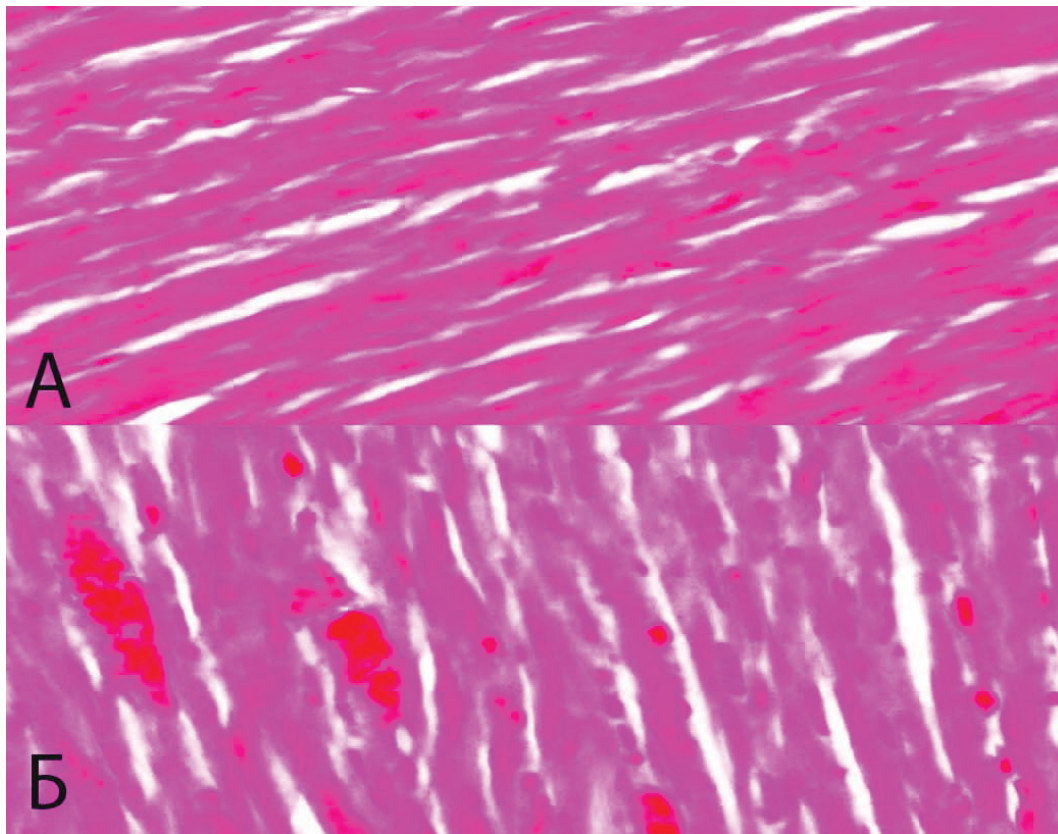


Рис. 3. Миокард крыс опытной (А) и контрольной (Б) групп. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

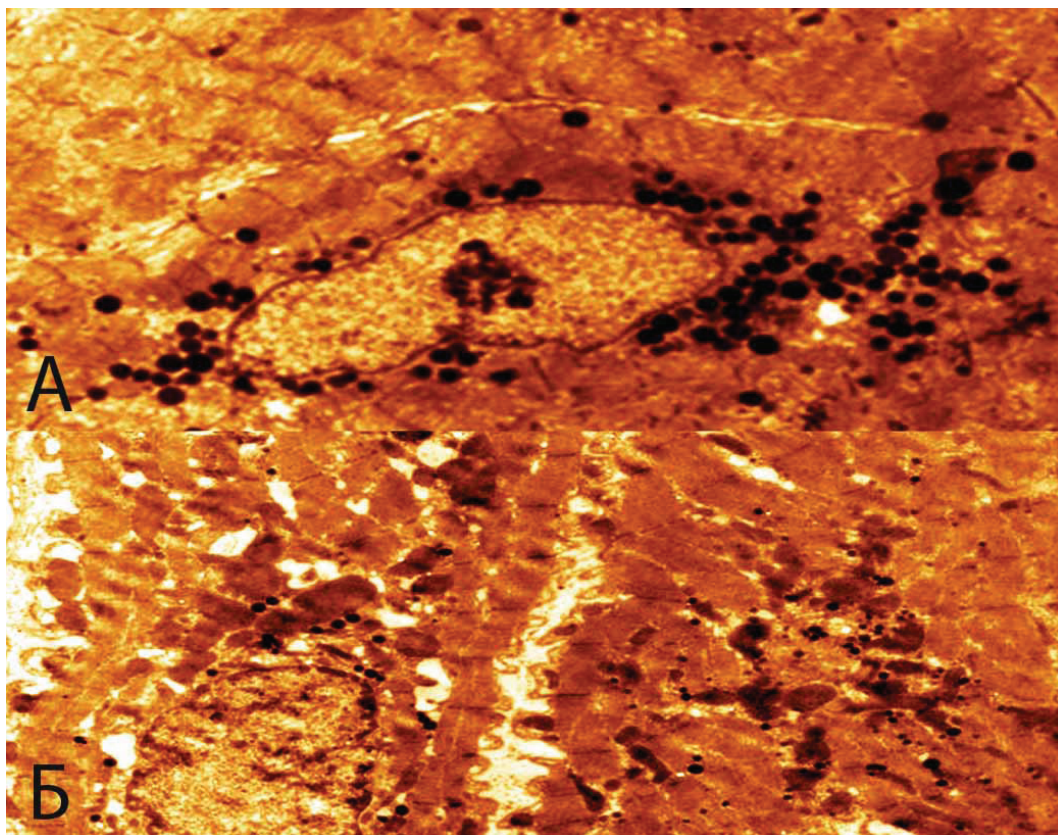


Рис. 4. Ультраструктура миокарда правого предсердия крыс опытной (А) и контрольной (Б) групп. Ув. 5600 (А), 4400 (Б).

вотных опытной серии выявил сходную морфологическую картину с группой интактных животных: КМЦ сохраняли целостность, четко определялись овальные ядра, анастомозы, вставочные диски и поперечная исчерченность. Интерстициальный отек не наблюдался. По сравнению с контрольной группой животных в сосудах не обнаружена агрегация эритроцитов (рис. 3а, б).

Субмикроскопический анализ ПП и ЛЖ группы опытных крыс с введением мексидола не выявил деструктивных изменений. Ядра КМЦ содержали эухроматин и ядрышки, кариолема образовывала незначительные инвагинации. Митохондрии (Мх) в основном сохраняли свою ультраструктуру по сравнению с контрольными животными. Миофибриллы (Мф) визуально были не изменены. Определялись единичные расширенные цистерны саркоплазматического ретикулума (СПР). Внутриклеточный отек не выявлялся. Сарколема сохраняла свою структуру (рис. 4а, б). Гемокапилляры были без видимых изменений.

Морфометрический анализ ультраструктуры КМЦ ПП опытной группы крыс выявил достоверное увеличение объемной доли Мх: на 29% по сравнению с интактной серией и на 16% с контрольной серией. Площадь Мф не изменилась. Площади элементов СПР восстановились до исходного значения. Объемная доля свободной саркоплазмы уменьшилась на 25% от интактной и на 18% от показателя контрольной серии (табл.).

Количественные характеристики ультраструктуры ЛЖ крыс опытной группы изменялись следующим образом. Объемная доля Мх достоверно не отличалась от исходных показателей. Площадь Мф, как и в контрольной серии, была достоверно меньше, чем в интактной серии на 16%. Площадь цистерн СПР уменьшалась почти в 3 раза по сравнению с контролем, но оставалась в 3 раза больше относительно исходного значения. Площадь саркоплазмы достоверно не отличалась от интактной и контрольной серии (табл.).

В проведенных нами исследованиях уже обсуждался положительный эффект факторов ишемии и реперфузии на синтез и выброс ПНП в условиях раннего ПРП через активацию HIF (hypoxia inducible factors) [11]. Расширенные цистерны СПР в КМЦ способствовали захвату кальция, который активировал Ca^{2+} -зависимые K^+ каналы SK4, таким образом стимулируя синтез пептида и формирование гранул [1, 11]. В группе с введением мексидола значительное увеличение образования и выведения ПНП, а также отличие морфологических характеристик по сравнению с контролем были связаны с вазопротекторным и цитопротекторным свойствами препарата. Вазопротекторное действие мексидола характеризовалось улучшением микроциркуляции,

отсутствием агрегации эритроцитов, что согласовывалось с данными исследователей [7]. Цитопротекторный эффект препарата способствовал сохранению ультраструктуры КМЦ: СПР не был расширен в ПП, а в ЛЖ наблюдались расширения цистерн СПР в значительно меньшей степени, по сравнению с контрольной группой. Показано увеличение среднего значения площади митохондрий в миоцитах ПП с сохранением мембранных структур и матрикса, указывавшее на энергизованное состояние органелл, возникающее [12, 13], при аэрации среды, добавлении субстратов окисления или АТФ. Цитопротекторное свойство мексидола обусловлено антиоксидантной активностью 3-оксипиридинов и антигипоксическим свойством янтарной кислоты. Сукцинат, поступая во внутриклеточное пространство, окисляется дыхательной цепью в условиях гипоксии. Производные 3-оксипиридинов снижают микровязкость мембран, стабилизируя липидный компонент, ингибируют процессы перекисного окисления липидов и оказывают влияние на активность мембраносвязанных ферментов [7].

Интересно отметить, что похожая морфологическая картина выявлена в КМЦ изолированного по Лангендорфу сердца крысы с введением мексидола такой же дозы 25 мг/кг [14]. В нашем эксперименте на крысах было показано отсутствие внешних нейро-гуморальных факторов и функционирование сердца на интракардиальном уровне в раннем ПРП [11]. По-видимому, действие препарата в условиях целостного организма в этот период осуществлялось непосредственно на внутриорганном и внутриклеточном уровнях.

Таким образом, в представленном исследовании выявлено стимулирующее влияние мексидола на процессы образования и выброса ПНП в гранулах КМЦ крыс в условиях раннего ПРП.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ogawa T., de Bold A. The heart as an endocrine organ // *Endocrine Connections*. – 2014. – Vol.3. – P. 31 – 34.
2. Максимов В.Ф., Коростышевская И.М., Маркель А.Л., Филюшина Е.Е., Якобсон Г.С. Натрийуретические пептиды сердца и артериальная гипертензия: экспериментальное исследование // *Вестник РАМН*. – 2013. – №1. – С. 4 – 9.
3. Гутор С.С., Казаков В.А., Суходоло И.В., Шипулин В.М., Бабокин В.Е., Огуркова О.Н., Андреев С.Л., Сафонова А.В. Натрийуретический пептид и его предшественники как предикторы прогрессивного послеоперационного ремоделирования левого желудочка у больных ишемической кардиомиопатией // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2013. – т. 12, №6 – С. 25 – 30.
4. Lyu T., Zhao Y., Zhang T., et al. Natriuretic peptides

as an adjunctive treatment for acute myocardial infarction // *Int Heart J.* – 2014. – Vol. 55(1). – P. 8 - 16.

5. Блинов Д.С., Сернов Л.Н., Балашов В.П., Блинова Е.В., Пивкина Л.В., Гогина Е.Д., Ванькова Л.В., Вертянкин М.В., Бойко Г.Г., Красилина Т.В. Антиишемическая активность нового тотечественного антиоксиданта – производного 3-гидрокси-пиридина этоксида // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2011. – №11. – С. 514 - 517.

6. Замотаева М.Н., Чаиркин И.Н., Инчина В.И., Дроздов И.А. Экспериментальное обоснование применения мексидола и 3-оксипиридина фумарата при хроническом повреждении миокарда // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2013. – №2. – С. 176 - 178.

7. Андреева Н.Н. Экспериментальные и клинические аспекты применения мексидола при гипоксии (обзор) // *Медицинский альманах.* – 2009. – №4. – С. 193-197.

8. Корпачев В.Г., Лысенков С.П., Телль Л.З. Моделирование клинической смерти и постреанимационной болезни у крыс // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия/* - 1982. – №3. – С. 78-80.

9. Рахчеева М.В., Бугрова М.Л. Изменение соотношения гранул А- и В- типов, содержащих предсердный и мозговой натрийуретические пептиды, в предсердных миоцитах крыс в условиях вазоренальной гипертензии // *Цитология.* – 2010. – №8. – С. 629 – 633.

10. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. (под ред.) *Микроскопическая техника: Руководство.* М.: Медицина, 1996. 544 с.

11. Бугрова М.Л., Яковлева Е.И., Абросимов Д.А. Взаимосвязь интенсивности синтеза, накопления и секреции предсердного натрийуретического пептида кардиомиоцитов с уровнем регуляции сердечного ритма у крыс в условиях раннего постреперфузионного периода // *Современные технологии в медицине.* – 2012. – №3. – С. 26 – 30.

12. Сударикова Ю.В., Бакеева Л.Е., Цыпленькова В.Г. Энергозависимые изменения ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов человека при алкогольном поражении сердца // *Архив патологии.* – 1999. – №2. – С. 15 – 20.

13. Соловьев Н.А., Яснецов В.В. Экспериментально-клиническое исследование действия мексидола при некоторой патологии. Выяснение возможной локализации и механизма действия // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2006. – приложение №1. – 18 с.

14. Бугрова М.Л., Харьковская Е.Е., Яковлева Е.И. Влияние Мексидола на предсердный натрийуретический пептид в изолированном по Лангендорфу сердце крысы // *Современные технологии в медицине* – 2014. – Т.6., №2. – С. 25 – 31.

REFERENCES:

1. Maksimov V.F., Korostyshevskaya I.M., Markel' A.L., Filyushina E.E., Yakobson G.S. Natrijoreticheskie peptidy serdtsa i arterial'naya gipertenziya: ehksperimental'noe issledovanie // *Vestnik RAMN.* – 2013. – №1. – С. 4 – 9.

2. Gutor S.S., Kazakov V.A., Sukhodolo I.V., SHipulin V.M., Babokin V.E., Ogurkova O.N., Andreev S.L., Safonova A.V. Natrijoreticheskij peptid i ego predshestvenniki kak prediktory progressivnogo posleoperatsionnogo remodelirovaniya levogo zheludochka u bol'nykh ishemicheskoy kardiomiopatiej // *Byulleten' sibirskoj meditsiny.* – 2013. – t. 12, №6 – С. 25 – 30.

3. Blinov D.S., Sernov L.N., Balashov V.P., Blinova E.V., Pivkina L.V., Gogina E.D., Van'kova L.V., Vertyankin M.V., Bojko G.G., Krasilina T.V. Antiishemicheskaya aktivnost' novogo totechestvennogo antioksidanta – proizvodnogo 3-gidroksipiridina ehtoksidola // *Byulleten' ehksperimental'noj biologii i meditsiny.* – 2011. – №11. – С. 514 - 517.

4. Zamotaeva M.N., CHairkin I.N., Inchina V.I., Drozdov I.A. EHksperimental'noe obosnovanie primeneniya meksidola i 3-oksipiridina fumarata pri khronicheskom povrezhdenii miokarda // *Byulleten' ehksperimental'noj biologii i meditsiny.* – 2013. – №2. – С. 176 - 178.

5. Andreeva N.N. EHksperimental'nye i klinicheskie aspekty primeneniya meksidola pri gipoksii (obzor) // *Meditsinskij al'manakh.* – 2009. – №4. – С. 193-197.

6. Korpachev V.G., Lysenkov S.P., Tell' L.Z. Modelirovanie klinicheskoy smerti i postreanimatsionnoj bolezni u krysa // *Patologicheskaya fiziologiya i ehksperimental'naya terapiya/* - 1982. – №3. – С. 78-80.

7. Rakhcheeva M.V., Bugrova M.L. Izmenenie sootnosheniya granul A- i V- tipov, sodержashhikh predserdnyj i mozgovoj natrijoreticheskie peptidy, v predserdnykh miotsitakh krysa v usloviyakh vazorenal'noj gipertenzii // *TSitologiya.* – 2010. – №8. – С. 629 – 633.

8. Sarkisov D.S., Perov YU.L. (pod red.) *Mikroskopicheskaya tekhnika: Rukovodstvo.* M.: Meditsina, 1996. 544 s.

9. Bugrova M.L., YAKovleva E.I., Abrosimov D.A. Vzaimosvyaz' intensivnosti sinteza, nakopleniya i sekretsii predserdnogo natrijoreticheskogo peptida kardiomiotsitov s urovnem regulyatsii serdechnogo ritma u krysa v usloviyakh rannego postreperfuzyonnoy perioda // *Sovremennye tekhnologii v meditsine.* – 2012. – №3. – С. 26 – 30.

10. Sudarikova YU.V., Bakeeva L. E., TSyplenkova V. G. EHnergozavisimye izmeneniya ul'trastruktury mitokhondrij kardiomiotsitov cheloveka pri alkogol'nom porazhenii serdtsa // *Arkhiv patologii.* – 1999. – №2. – С. 15 – 20.

11. Solov'ev N.A., YAsnetsov V.V. EHksperimental'no-

klinicheskoe issledovanie dejstviya meksidola pri nekotorej patologii. Vyyasnenie vozmozhnoj lokalizatsii i mekhanizma dejstviya // Byulleten' ehksperimental'noj biologii i meditsiny. – 2006. - prilozhenie №1. – 18 s.

12. Bugrova M.L., KHar'kovskaya E.E., YAkovleva E.I. Vliyanie Meksidola na predserdnyj natrijureticheskiy peptid v izolirovannom po Langendorfu serdtse krysy // *Sovremennye tekhnologii v meditsine* – 2014. – T.6., №2. – S. 25 – 31.

Авторская справка:

1. Бугрова Марина Леонидовна, к.б.н., доцент. Заведующий отделом электронной микроскопии Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России.

603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1. 89038491238. E-mail: marysmir@mail.ru

2. Яковлева Евгения Ивановна, к.б.н. Старший научный сотрудник отдела электронной микроскопии Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России. 603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1. 89101272285. E-mail: eiyakovleva@mail.ru

3. Ермолин Игорь Леонидович, д.б.н., профессор. Заведующий кафедрой гистологии с цитологией и эмбриологией ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России. 603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1. 89202932126. E-mail: ermolinigor@mail.ru